

Immunologische Charakterisierung neuartiger Chitosan/Bioglas Beschichtungen für biodegradierbare Magnesiumimplantate

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anzelika Schreiber

2019

Die Arbeit wurde im Zeitraum vom 29.09.2015 bis 29.09.2019 unter Leitung von Prof. Dr. Frank Witte im Julius-Wolff-Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, sowie Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien an der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Witte

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Robin Hiesinger

Disputation am: 09.06.2020

Danksagung

Ich möchte meiner Familie für die Unterstützung in allen meinen Bemühungen und Ideen, für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion, für die Kraft und Beteiligung in jeder Lebenssituation danken. Einen herzlichen Dank an Prof. Dr. Witte, der mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und während der Anfertigung der Dissertation immer mit kompetentem Rat zur Seite stand. Nicht zuletzt möchte ich meinen Kollegen für die Herzlichkeit, eine freundschaftliche und harmonische Arbeitsatmosphäre und tatkräftige Unterstützung danken, wodurch die Arbeit noch mehr positive Aspekte und Spaß mit sich brachte.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	3
3. Summary	4
4. Einleitung	5
4.1 <i>Immunreaktion auf Implantation</i>	6
4.2 <i>Magnesium und Wundheilung</i>	9
4.3 <i>Rolle von Makrophagen bei der Immunreaktion gegen alloplastische Materialien</i>	11
4.4 <i>Auswirkungen der Implantatoberflächeneigenschaften auf die Protein-Material Interaktion und die zelluläre Antwort</i>	13
4.5 <i>Korrosion von Magnesium in vivo und in vitro</i>	15
4.6 <i>Materialbesonderheiten</i>	16
5. Material und Methoden	18
5.1 <i>Verwendete Antikörper</i>	18
5.2 <i>Versuchstiere</i>	19
5.3 <i>Implantate/Beschichtungen</i>	19
5.4 <i>Experimentelles Design</i>	20
5.5 <i>Operativer Eingriff</i>	20
5.6 <i>Explantation</i>	21
5.7 <i>Aufarbeitung der Implantatgewebekapseln</i>	21
5.8 <i>Stimulierung der Zytokinproduktion</i>	22
5.9 <i>Aufarbeitung von Blut</i>	22
5.10 <i>FACS/Cytospin</i>	22
5.11 <i>Histologie / Bestimmung der mittleren Dicke der Kapsel</i>	23
5.12 <i>Korrosionsuntersuchung in vitro/ in vivo</i>	23
5.13 <i>q-PCR</i>	24
5.14 <i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	24
5.15 <i>Statistische Methoden</i>	25
6. Ergebnisse	26
6.1 <i>Leukozytenprofil der Gewebekapseln getesteter Implantate</i>	26
6.2 <i>Verstärkte Expression des M2 Phänotyps in Gewebekapseln von WE34 ohne Beschichtung</i>	27
6.3 <i>M1 geprägte Immunreaktion auf Referenzmaterial-F</i>	30
6.4 <i>Implantatgewebekapseln enthalten CD68⁺CD163^{low} und CD68⁻CD163^{low} Makrophagen, die eine analoge konkomitierende TH17-Zell-Kinetik aufweisen</i>	31
6.5 <i>Verstärkte Expression des CD161^{low} Monozytenphänotyps in der RM-F-Kapsel</i>	33

6.6	<i>TH1- und TC1-Zellen fungieren nicht hauptsächlich als INF-γ Quelle für die Makrophagendifferenzierung in M1 Richtung</i>	35
6.7	<i>Ruhender Phänotyp der DCs mit verminderter Primingaktivität dominiert in Fremdkörpergewebekapseln der getesteten Materialien</i>	36
6.8	<i>Siliziumdioxid in der Beschichtung zeigt Auswirkungen auf die Konzentration der Mastzellen in den Implantatgewebekapseln</i>	39
6.9	<i>Dominanz der Kontrollkapsel RM-F in der Größe und Menge der CD45⁺ Leukozyten</i>	39
6.10	<i>Die eruierte Fremdkörperreaktion wird nicht von einer bakteriellen Kontamination induziert und variiert</i>	42
6.11	<i>Verwendete Bioglasbeschichtungen induzieren keinen Korrosionsschutz des WE43 Kerns</i>	42
6.12	<i>Von der Baseline (0-Wert) abweichende Verhältnisse der Leukozyten-Subpopulationen im Blut</i>	44
6.13	<i>Makroskopische Merkmale zur Feststellung der Biokompatibilität der Materialien</i>	46
6.14	<i>Rillen- vs. Granulatographie/ Zeitabhängige Effekte</i>	50
7.	Diskussion	57
7.1	<i>Immunologische und histologische Auswirkungen der Materialien auf den Wirtsorganismus</i>	57
7.2	<i>Das Differenzierungsverhalten der Makrophagen und die Rekrutierungstendenz der Granulozyten sind gewichtige Merkmale zur Charakterisierung der Immunantwort gegen Implantatmaterialien</i>	60
7.3	<i>Kinetik anderer Leukozytenarten</i>	63
7.4	<i>Histologische und systemische Äußerungen der immunologischen Prozesse, sowie die Wirkung der Implantatbeschaffenheit auf die Immunreaktion</i>	66
7.5	<i>Limitationen</i>	72
7.6	<i>Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick</i>	73
8.	Literaturverzeichnis	74
9.	Abkürzungsverzeichnis	81
10.	Verzeichnis der erfolgten und anstehenden Publikationen	82
11.	Anhang	83
12.	Selbstständigkeitserklärung	90

2. Zusammenfassung

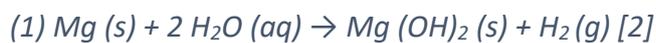
Mit dem Ziel, die Anzahl der operativen Eingriffe so gering wie möglich zu halten, traten in den letzten Jahren biodegradierbare Implantate in den Vordergrund. Die Degradation der eingesetzten Materialien durch physiologische Prozesse des Organismus erübrigt einen zusätzlichen Eingriff zur Entfernung des Implantates. Die Vorteile der magnesiumbasierten Legierungen liegen in den vielfältigen essenziellen Funktionen, die das Element im Körper ausübt. Die Metabolisierung des Materials hängt im Wesentlichen von den immunologischen Prozessen und deren Hauptakteuren ab, den Leukozyten. Die korrosiven Prozesse der Mg-basierten Legierungen beeinflussen zum einen die Differenzierung der beteiligten Zellen, wie auch das periimplantäre Gewebe. Das Aufschlüsseln des immunologischen Profils während der Implantationsstudie, erlaubt die Prozesse, die über den Erfolg der Implantation entscheiden, besser zu verstehen und diese gezielt mit der Intention der Vermeidung der Implantationsabstoßung einzusetzen. In der vorliegenden Arbeit konnten Leukozytenprofile für das immunaktivierende Material Referenzmaterial-F (RM-F), sowie Magnesiumlegierungen (WE43) mit Anteilen an seltenen Erden und (potentiell korrosionsprotektiven) Beschichtungen aus Bioglas/Chitosan (BG) und Bioglas/Chitosan/Siliziumdioxid (BG-Si) erstellt werden. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der Makrophagen-/Granulozytenpräsenz und der Fibrinproportion in der Implantatkapsel, sowie eine Korrelation der oben genannten Populationen und makroskopischen Merkmalen. Der Vergleich der Blutwerte bei der Explantation deutet auf systemische Veränderungen als Folge der Implantation des Referenzmaterials hin. Diese Werte können als Referenz einer starken Immunreaktion zur Testung von neuen Implantatmaterialien verwendet werden. Histologisch-makroskopische Merkmale, die eine Immunreaktion charakterisieren sind nur post mortem feststellbar und daher nicht für eine frühzeitige, nicht-invasive Analyse der Immunreaktion geeignet. Die Korrosionsmerkmale des WE43-Grundkörpers wurden nicht von den verwendeten Beschichtungen beeinflusst, wobei die Immunreaktion in eine proinflammatorisch/neutrale Richtung gelenkt wurde. Daher sind die oben genannten Beschichtungen als Korrosionsschutz für magnesiumbasierte Implantate nicht geeignet.

3. Summary

In the last few years, biodegradable implants got high attention in order to avoid secondary surgery for implant removal. The degradation of the materials by physiological processes of the organism avoids a repeated intervention for implant removal. The benefits of magnesium-based alloys result from a variety of essential functions magnesium (Mg) exerts in the body. The metabolism of the implant material essentially depends on the immunological processes and their main constituents involved, the leukocytes. The corrosive processes of the Mg-based alloys influence the differentiation of the involved cells and the peri-implant tissue. The investigation of the immunological profile in the peri-implant tissue during the implantation period allows a better understanding of the processes, which decide on the success of the implantation, specifically to prevent implantation rejection. In the present study, leukocyte profiles could be evaluated addressing for the immune-enhancing reference material (RM-F) as well as pure WE43 magnesium alloys containing rare earths and (potentially corrosion-protective) coatings of bioglass/chitosan (BG) and bioglass/chitosan/silica (BG-Si). We were able to observe a correlation between the macrophage/granulocyte presence and the fibrin proportion in the implant capsule, as well as to correlate the above-mentioned populations and macroscopic features. Comparing blood values at different explantation time points indicates systemic changes as a result of the implantation of the reference material. These values can be used as a reference of a strong immune response when testing new implants or implant materials. The macroscopic features characterizing the immune reaction are detectable only post mortem. Therefore, these methods are not suitable for an early non-invasive analysis of the immune reaction. The corrosion of the WE43 sample is not reduced by the investigated coatings, however the coatings demonstrate a proinflammatory/neutral immune response. As a consequence, the coatings are not suitable for magnesium-based implants.

4. Einleitung

Die Korrosion biodegradierbarer Implantate und die daraus resultierenden physiologischen und biochemischen Prozesse verkörpern einerseits den Vorteil und andererseits die Herausforderung der Implantate. Die Metabolisierungsfähigkeit eines biodegradierbaren Implantates stellt die ursprüngliche Zweckhaftigkeit desselben dar. Andererseits verliert das Material an Stabilität und beeinflusst das umgebende Milieu durch Korrosionsprodukte. Die Geschwindigkeit der Korrosion ist hierbei maßgeblich. So gilt das Titan mit seiner stabilen Deckschicht aus Titandioxid als ein stark korrosionsbeständiges Material und ist daher als „inertes“, biokompatibles Implantatmaterial stark verbreitet [1]. Die Korrosionsbeständigkeit von Magnesium ist wesentlich geringer. Im wässrigen Milieu kommt es zu einer raschen Passivierung des Materials. Es entsteht eine dünne Schicht aus schwerlöslichem Magnesiumhydroxid um das Implantat herum, die weitere Korrosion leicht verzögert [2]. Ein zweites Produkt der Reaktion ist Wasserstoffgas (Formel (1)).



Die Korrosionsgeschwindigkeit hängt wesentlich von der Materialzusammensetzung des Implantats, der Oberflächenbeschaffenheit aber auch von den Komponenten des Lösungsmittels ab. Bei der Bestimmung der Legierung sollte neben der Korrosionsbeständigkeit auch die Stabilität des zukünftigen mechanischen Implantats sowie die Biokompatibilität beachtet werden. Die Abstimmung der drei Parameter aufeinander stellt meist die größte Herausforderung dar. Das persistente Verbleiben eines alloplastischen Objektes (im Sinne von körperfremdem Ersatzmaterial) im Organismus ruft eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems hervor. Von welcher Natur die Immunreaktion ist, hängt von einer Vielfalt an Kriterien des eingesetzten Materials ab. Potentiell immunsuppressive, bakterizide, Osteozytenproliferation-fördernde Substanzen wie Chitosan, Bioglass 45S5 und Siliziumdioxid [3], [4], [5] wurden als Beschichtungsmaterial zur Reduktion der initialen Korrosion der WE43-Legierung benutzt, um ein „Stealth-Effekt“ ähnliches Persistieren des Implantates im Organismus zu ermöglichen und dabei seine vorteilhaften Eigenschaften für die Heilung zu nutzen. Das Ziel war es, ein immunologisches Profil der Wirtsreaktion auf Bioglas/Chitosan Beschichtungen mit und ohne Siliziumzusatz in Verbindung mit Magnesiumkorrosion zu erstellen um folgende Fragen charakterisieren zu können:

1. Zellverhalten

- Wie verändert sich das Differenzierungsverhalten der Makrophagen (M1/M2 Verhältnis) und Rekrutierungsverhalten der Granulozyten unter Einwirkung von WE43, Bioglas/Chitosan und Bioglas/Chitosan/Silizium enthaltener biodegradierbarer Implantate?
- Wie verhalten sich andere Leukozyten?

2. Translation von Erkenntnismustern

- Kann das durchflusszytometrisch erstellte Profil auf das makroskopische und histologische Erscheinungsbild des periimplantären Gewebes übertragen werden?
- Gibt es systemische Indizien einer Immunreaktion?
- Können diese Merkmale zur frühzeitigen validen Erkennung einer starken Immunreaktion beitragen?

Um die Fragestellungen unter 1 und 2 beantworten zu können bedarf es der Aufklärung der in Folge beschriebener Prozesse im Zusammenhang mit der Implantation.

4.1 Immunreaktion auf Implantation

Ein chirurgischer Eingriff mit begleitender Zerstörung unterschiedlicher Zellschichten stellt eine initiale vorübergehende Unregelmäßigkeit im Körper eines Organismus dar. Bei normalen Umständen (ohne eines dauerhaften Aufenthalts eines Fremdkörpers) kommt es grob zur vorübergehenden lokalen Alkalisierung durch Zellschrott [6], [7] und Aktivierung des Immunsystems, was zum Abräumen der defekten Zellen und Neutralisierung möglicher Pathogene, sowie einer abschließenden Wundheilung, Erliegen der Immunantwort und der Einstellung des physiologischen leicht sauren pH-Milieus führen würde [8]. Das persistente Verbleiben eines alloplastischen Objektes im Organismus ruft eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems hervor. Basierend auf zahlreichen Untersuchungen in diversen Spezies konnte ein allgemeines Schema der Abläufe und Prozesse nach einer Implantation in lebenden Organismen definiert werden. Grob wird dieses in acht Phasen unterteilt: Verletzung → Blut-Material-Interaktion → vorläufige Matrixbildung → Akute Entzündung → Chronische Entzündung → Entstehung des Granulationsgewebes → Fremdkörperreaktion → Faserkapselbildung [9], [10]. Die Phasen sind variabel je nach chemischen und physikalischen Eigenschaften des eingesetzten Materials, seiner Lokalisation und Dauer des Aufenthalts, Form des Implantats, Oberflächenbeschaffenheit, Ladung und sonstigen Merkmalen. Residente Zellen, sowie durch die Blutgefäßverletzungen eingewanderte Zellen stellen den ersten zellulären Kontaktpartner der proteinbehafteten Implantate dar. Meist sind es ubiquitär im Körper vorkommende Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, sowie durch die Extravasation während des chirurgischen Eingriffs eingewanderte polymorphnukleäre Zellen und Monozyten. Mastzellen besitzen sehr vielfältige Funktionen. Nach der Aktivierung z.B. durch Implantation, sezernieren sie eine breite Palette an Mediatoren wie Histamin, Prostaglandin, Leukotriene, sowie eine Reihe an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die unter anderem vasoaktiv wirken, indem sie die Gefäßpermeabilität steigern und die Rekrutierung von Leukozyten an den Inflammationsherd fördern. Dabei spielt Histamin eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung und der Anhaftung der Phagozyten (Makrophagen/Monozyten und Granulozyten) an die implantierten

Materialien [11]. Mastzellen können je nach Stimulus sowohl pro-, als auch anti-inflammatorisch wirken [12]. Dendritische Zellen wurden im Zusammenhang mit Implantatmaterialien bisher ungenügend untersucht. Die Vielfalt dieser Zellart und die Fähigkeit sich in andere Subklassen abhängig vom Stimulus umzuwandeln, erschwert die Definition der Rolle der DCs während der Immunreaktion gegen implantierte alloplastische Objekte. Prinzipiell sind diese Zellen die potentesten Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und übernehmen die Rolle der Induktoren der erworbenen Immunantwort, indem sie die T-Zellen spezifisch, durch Präsentation der phagozytierten Proteine auf den MHC-II-Molekülen, aktivieren. Auch diese Zellen können die Immunreaktion fördern, aber auch eine Toleranz gegenüber Trägern der aufgenommenen Peptide induzieren [13]. Bisher ist bekannt, dass dendritische Zellen in implantierten Bereichen präsent sind [14]. 25% der am Inflammationsort einwandernden Monozyten differenzieren sich in Richtung der DCs und wandern mit aufgenommenen Partikeln zu nahegelegenen Lymphknoten [15], [14]. Dort akkumulieren diese bis Tag 4 im T-Zellbereich (Paracortex) und exprimieren dabei reichlich kostimulatorischer Moleküle sowie MHCII-Komplexe [15]. Residente DCs nehmen geringe Mengen an Fremdmaterial auf und bleiben überwiegend am Applikationsort [15]. Zudem zeigen dendritische Zellen eine phänotypische Änderung von einem aktiven Phänotyp in früheren Zeitpunkten der Implantation (6 Tage) zum tollerogenen, jedoch nicht anergem Phänotyp mit geringer Expression an kostimulatorischen Molekülen sowie MHCII im weiteren Verlauf (14 Tage) am Implantationsort. Das tollerogene Auftreten wird von erhöhten Mengen an IL-10 und TGF- β begleitet [14]. Zudem wird die Toleranz zu Selbstantigenen von dendritischen Zellen unterhalten. Diese nehmen am Inflammationsort bzw. Implantationsort autologen Zellschrot auf und wandern zu lymphatischen Organen, wo sie zur negativen Selektion der Lymphozyten beitragen, sowie regulatorische T-Zellen induzieren. Die peripheren Antigene werden überwiegend von migrierenden SIRP α^+ DCs (CD8 α CD11b $^+$ SIRP α^+) und plasmazytoiden DC (pDC) präsentiert [16]. Neutrophile Granulozyten zeigen ähnlich zu den Mastzellen einen breiten Wirkspektrum mit der Phagozytose von alloplastischen Partikeln, Sekretion diverser Effektormoleküle wie Chemokine und Zytokine, und einer Art Opsonisierung von Oberflächen implantierter Materialien [17], die durch ihre räumliche Ausdehnung (< 10 μ m) für die Phagozytose nicht geeignet sind [18]. Die Opsonisierung erfolgt beim apoptotischen Niedergang (NETosis) [18] der Granulozyten, dabei werden NETs (neutrophil extracellular traps) aus granularem Protein und Chromatin ausgebildet [19]. Zusammen mit anderen Proteinen und Leukozyten, sowie Fibrin spielt die Opsonisierung potentiell eine Rolle bei der Immunreaktion und Ausbildung einer fibrösen Kapsel um das Implantat herum. Unter anderem seitens Neutrophilen induzierte respiratorische Burst trägt außerdem der Degradation der implantierten Materialien bei. Die Sekretion der Zytokine und Chemokine unterstützt weitere Leukozytenrekrutierung und moduliert den Verlauf der Immunreaktion. Auch diese Zellen können die Immunreaktion in pro- und anti-inflammatorische Richtung lenken, durch das Produzieren von TH1

und TH2 Zytokinen: INF- γ und IL-4 [20]. Diese Zytokine beeinflussen aktiv die Differenzierung der Hauptakteure der Immunreaktion gegen fremdartige Materialien – der Makrophagen. So wie dendritische Zellen treten auch Makrophagen je nach Zytokinmilieu-Kontext in unterschiedlichen Phänotypen auf. Es wären zu nennen: die aus dem Blut eingewanderten Monozyten, die sich in DCs oder Makrophagen differenzieren, residente Makrophagen, klassisch aktivierte M1 Makrophagen, alternativ aktivierte M2 Makrophagen mit einer breiten Aufspaltung des zweiten Subtyps in M2a, M2b, M2c, M2d mit variablen Funktionsspektren, sowie regulatorische Makrophagen und implantationsrelevante Fremdkörperriesenzellen (Details unter 4.3) [21]. Die Klassifikation der reichlich vertretenen Leukozytenart wird stetig erweitert und stellt eine Herausforderung aufgrund des wandelbaren Phänotyps der Population dar. Grob skizziert, gewährleisten diese Zellen die Säuberung des periimplantären Bereichs, die Wundheilung im postoperativen Gewebe, Regulierung der Immunreaktion durch Sekretion vielfältiger Effektormoleküle [22], sowie Ausbildung oder Vermeidung einer Fibrinkapsel, die zu der Separation des Materials vom Wirtsgewebe und Implantatversagen führen kann. Auch diese Zellen reagieren auf die provisorische Matrix aus adherierten konformationskonformen oder abgewandelten Proteinen, Komplementsystembestandteilen (IgG, C3b), aktivierten Plättchen, Fibrin, Endothelzellen und allerlei Zellschrott auf der Oberfläche der Implantate. Die oben genannten ersten 4 Phasen der Immunreaktion gegen Implantate treten innerhalb von Sekunden bis wenigen Tagen ein. Die folgenden Phasen können abhängig von dem Ausmaß der Verletzung Wochen bis Monate lang andauern. In der chronischen Phase der Immunantwort kommen aktivierte Lymphozyten, aufgrund des persistierenden Reizes seitens des implantierten Materials, zum Inflammationsort und regulieren neben den gegenwärtigen Leukozyten den weiteren Verlauf der Immunreaktion durch Zytokinsekretion. Makrophagen sezernieren weiterhin zusammen mit Fibroblasten eine Vielfalt an Mediatoren, die unter anderem die Vaskularisierung des Gewebes induzieren und die Granulation fördern. Die Gewebsregeneration mit dem Ziel des Verschlusses der Wunde tritt innerhalb des ersten Tages nach Verletzung ein (siehe 4.2) [23].

Die Fremdkörperreaktion wird durch die Anwesenheit von Fremdkörperriesenzellen charakterisiert. Wie oben bereits erwähnt, zählen diese zu den Makrophagen und zeigen im Gegenteil zu anderen Arten der Riesenzellen eine diffuse Verteilung der Kerne im fusioniertem Zytoplasma (Details unter 4.3). Eine Reihe induktiver Prozesse der Entstehung der Fremdkörperriesenzellen (foreign body giant cell, FBGC) wird in der Literatur diskutiert. Eines der Ursachen ist die „frustrierte Phagozytose“, bei der die Phagozyten aufgrund der Größenunterschiede der Zelle und des Implantats versagen das Material zu phagozytierten und daraufhin fusionieren. Zum anderen wird an der Materialoberfläche den adherierten Proteinen wie α M-, β 1-, β 2-integrinen, CD44, sowie dem RGD-Abschnitt des Vitronektins eine fusionsinduktive Wirkung zuerkannt [21]. Ein weiterer Stimulus ist das Zytokin IL-4, welches von

TH2 Zellen und Granulozyten sezerniert wird [24]. Während der Immunreaktion sezernierte Effektormoleküle fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen an den Zelloberflächen. Einige dieser Adhäsionsmoleküle werden ebenfalls in Zusammenhang mit der Fusion von Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen gebracht. Studien haben einen signifikanten Zusammenhang von INF- γ vermittelten Induktion von LFA-1 (CD11/CD18) und ICAM-1 Molekülexpression und Fusion der Makrophagen gezeigt [25]. Bisher ist nicht genau definiert, ob die Fremdkörperriesenzellen sich aus M1, M2 oder Monozyten entwickeln [21].

Die letzte Phase des Reaktionsschemas auf fremde Substanzen, die Bildung einer fibrösen Kapsel um das implantierte Material, ist auch variabel. Abhängig von der Gewebsart im Sinne des regenerativen Vermögens der beteiligten Zellen, der Lokalisation der Implantation (Zellart, Durchblutung), dem Maß der Zerstörung (Zustand des Stroma-Gerüsts) sowie systemische Komorbiditäten, kommt es entweder zur Regeneration des ursprünglichen Gewebes oder zur fibrösen Kapselbildung. Das zerstörte Gewebe wird entsprechend mit Parenchymzellen oder mit Bindegewebe vervollständigt [23].

4.2 Magnesium und Wundheilung

Alle Prozesse während der Implantation tragen einen hochgradig dynamischen Charakter und finden meist parallel zu einander statt. Neben dem immunologischen System wird konkomitierend die Koagulationskaskade und das Wundheilungssystem aktiviert. Sei es im Kontext einer Implantation oder einer konventionellen Verletzung, ist ein Organismus darauf ausgerichtet die Verletzung zu eliminieren, indem es die Blutung stoppt, die Wunde reinigt und die Prozesse der Wundheilung aktiviert. Die Wundheilung wird wie viele andere Prozesse im Organismus in Phasen eingeteilt. Je nach Quelle umfasst dieser Prozess 3 bis 5 Phasen. In der ersten Phase, der „exsudativen Phase“, kommt es grob zum temporären provisorischen Verschluss der Verletzung durch die Koagulation, Ödematisierung des periimplantären Gewebes, Rötung, Schwellung aufgrund der austretenden Lymphe und des Blutes, sowie durch die von Histamin induzierte Vasodilatation und erhöhte Endothelpermeabilität, die die Einwanderung der Leukozyten in das beschädigte Gewebe gewährleistet [26]. Die Hämostase ist ein verschachtelter Prozess, der von zahlreichen Gerinnungsfaktoren reguliert und in primäre und sekundäre Phasen eingeteilt wird [27]. In der primären Phase übernehmen die Thrombozyten den groben Verschluss der Wunde. Die Gefäßpermeabilität wird durch Vasokonstriktion gemindert. In der sekundären Phase, der plasmatischen Hämostase, wird die Verstärkung des Thrombozytenpfropfes mit Fibrinfäden und eingeflochtenen Erythrozyten durch die Aktivierung der Gerinnungsfaktorenkaskade eingeleitet. Mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade (Hämostase) wird gleichzeitig die Fibrinolyse eingeleitet [28], die temporal versetzt abläuft und erst in der dritten Phase der Wundheilung, der Granulationsphase

oder proliferativen Phase, einsetzt. Die zweite Phase der Wundheilung, die resorptive Phase, beinhaltet grob die Säuberung der Wunde durch Phagozyten und die Proliferation der Fibroblasten [26]. Die Fibrinolyse in der dritten Phase der Wundheilung geht mit dem Ersatz des temporären Thrombozyten-Fibrin-Pfropf durch Einlagerung von kollagenen Bindegewebsfasern und einer verstärkten Vaskularisierung des Gewebes einher. Das Granulationsgewebe entsteht und die Wunde wird zusammengezogen. In der Reparationsphase wird die Wunde vollständig geschlossen. Die Kollagenfasern verdichten sich und es kommt zu einer Epithelisation durch Keratinozyten-Migration [26]. Die fördernde Wirkung von Magnesium bei den Prozessen der Wundheilung wurde schon früh erkannt. Der Effekt zeigt sich sowohl intrinsisch als auch extrinsisch. Bereits 1942 nutzte A. T. Andreasen den Vorteil eines Magnesiumsulfat-Verbandes bei nassen, infizierten Wunden von Diabetespatienten, sowie schmutzigen Schusswunden und anderen Wunden jeglicher Art an diversen Körperstellen [29]. Selbst im Gesicht- und Kieferbereich wurde eine schnelle Abheilung, Granulation und geringe Narbenbildung unter Verwendung von Magnesiumsulfat erzielt. Aktuelle Studien mit einer oralen Applikation von Magnesiumoxid zeigen eine signifikante Reduktion von Ulkuslänge, -Breite und -Tiefe bei Patienten mit einem diabetischen Fußgeschwür [30]. Zusätzliche Vorteile einer solchen Behandlung zeigten sich in einer signifikanten Reduktion des C-reaktiven Proteins (CRP) (Akute-Phase-Protein), sowie Steigerung der totalen antioxidativen Kapazität (TAC) [30]. Die Ursachen für die effizientere Wundheilung liegen in der verbesserten Kollagenproduktion, gesteigerten Proliferation und Migration von Endothelzellen [31], [32] sowie elastizitätsunterstützenden Eigenschaften von Magnesium [33]. Eine verminderte extrazelluläre Magnesiumkonzentration mindert die proliferativen und die migratorischen Fähigkeiten der Zellen. Neben den vorteilhaften Eigenschaften von Magnesium für die Wundheilung, konnte auch eine hemmende Wirkung auf Prolyl- und Lysylhydroxylasen und damit eine für die Implantation essenzielle antifibrotische Wirkung beobachtet werden [34]. Auch die Granulationsphase der Wundheilung wird erheblich von Magnesium beeinflusst, indem es die proinflammatorischen Zytokine der M1 Makrophagen inhibiert und die Differenzierung der MSCs (mesenchymale Stammzellen) fördert [35]. Castiglioni S. et al. spezifizierte den antiinflammatorischen Effekte auf die Reduktion der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des Toll-like-Rezeptors (TLRs), sowie zuvor erwähnte Reduktion der Produktion der inflammatorischen Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies [36]. So unterstützt eine schwache Immunreaktion eine schnelle Abheilung des Gewebes. Neben den Makrophagen können auch andere Leukozyten die Wundheilung beeinflussen. Die eosinophilen Granulozyten können die Fibrinogenese durch die Sekretion von unter anderem dem Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) [37], [38] und Zytokinen wie TGF β 1 und IL-13 [39] sowohl fördern, als auch durch die Sekretion von Plasminogen (auch Profibrinolysin) reduzieren [40]. Dabei scheint Fibrin, Fibrinogen oder fibrinbildungsfördernde proteolytische Enzyme eine attrahierende Wirkung auf eosinophile Granulozyten auszuüben [40]. Eine Korrelation zwischen der Reduktion der

Magnesiumkonzentration im Blut und der simultan steigenden Menge an Histamin und eosinophilen Granulozyten im Blut konnte ebenfalls bereits beobachtet werden [41].

4.3 Rolle von Makrophagen bei der Immunreaktion gegen alloplastische Materialien

Makrophagen werden basierend auf unzähligen Studien weiterhin als die wichtigste Zellart während der Immunreaktion gegen alloplastische implantierte Materialien angesehen. Abgesehen vom unterschiedlichen Funktionsprofil besitzen alle Makrophagen ein enormes modulatorisches Aktionsspektrum über direkten Zell-Zell-Kontakt, Sekretion spezifischer Zytokine und Chemokine, sowie ROS Produktion und Phagozytose. Unbeachtet der vielen Subpopulationen der Makrophagen, kommt eine grobe Tendenz der M1 und M2 Makrophagen in Bezug auf die Implantation und Entstehung einer fibrösen Kapsel aus bisherigen Studien zustande. Eine anhaltende Dominanz der M1 Makrophagen resultiert meist in einer Fremdkörperreaktion mit FBGCs und einer fibrösen Kapsel [42], [43], [44]. Jedoch gibt es auch Indizien einer Fibrin induktiven Fähigkeit seitens der M2 Makrophagen [45], sowie seitens M2 Makrophagen induzierenden Zytokins IL-4 [24]. Die Klassifikation der beiden Populationen (M1 und M2) ist an die Produzenten (TH1 und TH2-Zellen) der induktiven Zytokine INF- γ und IL-4 angelehnt. Eingehende Untersuchungen der Funktionen und der Oberflächenmarker identifizieren eine weit komplexere Gliederung der Population. Durch weiterschreitende Entwicklung der Methoden, sowie der Antikörperspektren für unterschiedliche Spezies wurden aktuell weit mehr als die zwei Makrophagenpopulationen definiert. Dabei scheinen einige Subtypen ein stärkeres Fibrose stimulierendes Potential zu besitzen als andere. M2a und M2c Zellen werden als profibrotische Zellen angesehen [42], wobei M2a Makrophagen zudem zu der Rekrutierung von Basophilen, Eosinophilen und TH2 Zellen beitragen. M2c Zellen fördern die Rekrutierung der Eosinophilen und der TH0 Zellen [46]. M2d Zellen, auch antifibrotische Makrophagen genannt, sollen eine fibroseprotektive Wirkung besitzen. Die Studien bezüglich der Fibrose-induktiven Kapazität der M2 Makrophagen sind jedoch sehr rar. Viele Studien berichten auch von einer M2 induzierten konstruktiven Gewebsumstrukturierung, die den regenerativen Prozessen förderlich wirkt [42], [43], [44]. Betrachtet man grob die Funktionsspektren der einzelnen Subpopulation während einer Immunreaktion, wird die Wichtigkeit beider Agenten (M1 und M2) ersichtlich. So wird das zerstörte Wirtsgewebe, sowie mögliche Pathogene nach einer Implantation von M1 Makrophagen entfernt, die Wunde dadurch gereinigt und für den Heilungsprozess vorbereitet. Später in der Immunreaktion sezernieren alternativ aktivierte M2 Makrophagen Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und β IG-H3, induzieren Fibrinogenese und die Restrukturierung der extrazellulären Matrix [47]. Je nach Subtyp können diese auch Polyamine und Proline synthetisieren, zellwachstumsfördernd wirken, kollagen-

und gewebereparierend agieren [47]. Verlängert sich die Aktivitätsdauer der M1 Makrophagen, so kommt es zu einer stärkeren lokalen Zerstörung des Gewebes, einer verlängerten proinflammatorischen Immunreaktion, sowie einer progressiven Myofibroblastenrekrutierung und Proliferation [48], was in einer fibrösen Einkapselung und Narbenbildung resultiert. Eine M2 dominierte persistente Immunantwort wirkt sich in einer verstärkten Aktivierung von Fibroblasten und Isolierung des implantierten Materials durch eine fibröse Kapsel vom umgebenden Gewebe [48]. Daraus folgt, dass beide Populationen (M1 und M2) für eine erfolgreiche Implantation ohne Symptome einer Fremdkörperreaktion und Abstoßung benötigt werden. Besonders gilt es für biodegradierbare Materialien, deren Stützfunktion einer temporären Natur ist und die vom Körper aktiv abgebaut werden sollen [21]. Zu einer erfolgreichen Regeneration gehört auch eine gute Blutversorgung des Gewebes. Auch hier benötigt man M1 und M2 Makrophagen für eine erfolgreiche Angiogenese und Vaskularisierung [45]. M2b Makrophagen, auch als regulatorische Makrophagen bezeichnet, verhindern unter anderem Autoimmunreaktionen und regulieren die Immunantwort in supprimierender Weise [49], ebenso durch die Rekrutierung der regulatorischen T-Zellen [46]. Neben den allgemeinen Formen der M1 und M2 Subpopulationen zeigen sich die Makrophagen auch in krankheitsspezifischen Formen, wie z.B. Atherosklerose-assoziierte M4, Mhem, und Mox [46] oder für Tumorerkrankungen spezifische TAMs (Tumor assoziierte Makrophagen) [50]. Kaum erforschte CD163^{low} Makrophagen werden überwiegend im Kontext der Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn diskutiert, wo diese die Differenzierung von T-Zellen zu dem Inflammatorische Th-17 Phänotyp delegieren sollen [51]. Th-17 Zellen wiederum zeigen einen Zytokin-Spezifikum, das die Induktion des M1 sowie M2c-Fänotyps induzieren kann [52].

Auch Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Betrachtung einer Immunreaktion gegen implantierte Materialien. Diese gehören zu den ersten zellulären Interaktionspartnern der Implantate. Während ca. 25% der eingewanderten Monozyten sich in DCs differenzieren, bilden sich aus den restlichen 75% Makrophagen, die nach der Phagozytose am Implantationsort verbleiben, aus [15]. So wie bei DCs und Makrophagen, gibt es auch bei Monozyten eine Reihe unterschiedlicher Subklassen. Kaum untersuchte CD161 exprimierende Monozyten zeigen eine verstärkte Produktion von IL-1 β und IL-12 [53]. Im Zusammenhang mit Implantaten werden diese proinflammatorischen Zytokine unter anderem mit Periimplantitis assoziiert [54], [55].

All diese Makrophagen-/ Monozytenpopulationen reagieren jedoch auf die Qualität und Quantität der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche der Implantate und stellen somit lediglich eine Folgereaktion auf die Blut-Materialinteraktion dar. Magnesium bewirkt eine Polarisation der Makrophagen in eine M2 Richtung. Diese wird von einer erhöhten Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und IL-10, wundfördernden Effekten und Suppression von NF- κ B begleitet und resultiert in einer dünneren Kapsel um das Implantat herum [56]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert die Expression

einer Reihe an proinflammatorischen Zytokinen der M1 Makrophagen [57]. Auch ein supprimierender Effekt gegenüber M1 Makrophagen seitens Magnesium wurde bereits beobachtet [35].

4.4 Auswirkungen der Implantatoberflächeneigenschaften auf die Protein-Material Interaktion und die zelluläre Antwort

Die ersten Interaktionspartner der Implantate im Wirtsorganismus stellen neben Wassermolekülen die Blutplasmaeigenschaften, sowie die Proteine der extrazellulären Matrix dar, zu denen unter anderem Akute-Phase-Proteine, Koagulationsfaktoren, Immunglobuline, Komplementfaktoren und Lipoproteine zählen [58], [59].

Die Quantität, Qualität und die Verteilung der adhären Proteine werden von vielen physikalischen und chemischen Materialeigenschaften wie die Topographie der Oberfläche (Nano- und Mikrostruktur), Hydrophilität, Porosität, Ladung des eingesetzten Materials [60] und seit neusten Studien auch die Flexibilität beeinflusst [61].

Betrachtet man das topographische Merkmal, so spielt nicht nur die Rauheit selbst, sondern auch die Ausrichtung (Organisation) und die Feinheit des Reliefs eine entscheidende Rolle [62]. Die Steigerung der Rauheit im Nanometer- aber auch im Mikrometerbereich resultiert in einem erhöhten Proteinadsorptionspotential [63], [64], [65]. Bedingt durch die vergrößerte Fläche eines rauen bzw. porösen Implantats, vergrößert sich auch die Kontaktfläche für Proteine. Die Proteine adhären bevorzugt an den maximalen Auslenkungen der Erhebungen oder an den Übergängen von der Erhebung zu der Vertiefung [66]. Eine Computer Simulation der Adsorption von Lysozym auf einer im Nanometerbereich gerillten Oberfläche ergab eine anfängliche Adsorption der Proteine auf den Peaks der Wellenstruktur und eine anschließende Abwärtswanderung und Akkumulation in die Vertiefungen der Rillen [67]. Die Organisation des Reliefs: geordnete Ausrichtung oder chaotische Verteilung, zeigen zusätzlich Einwirkungen auf die Adhäsion der Zellen an implantierte Materialien. Untersuchungen zeigen eine ausgeprägte Zelladhäsion auf diffus strukturierten Oberflächen, wohingegen geordnete Topographie in einer milden Fremdkörperreaktion (FBR) mit einer feinen Kapsel resultiert [43]. Auch eine glatte Implantatoberfläche resultiert meist in stärker ausgeprägten fibrösen Kapseln [68]. Außerdem konnte eine Ausrichtung der adherierten Zellen auf gleichmäßig geordneten parallel verlaufenden Rillen beobachtet werden [69], was durch die Akkumulation der Proteine entlang der Rillen zustande kommt. Einige Proteine fördern die Aktivierung des Immunsystems, andere wiederum tarnen das Implantat davor [58]. Nicht nur das implantierte Material beeinflusst die Proteinadsorption im physikalischen Milieu, die Proteinmerkmale selbst, aber auch deren Konzentration, haben einen modulatorischen Effekt. So besitzen große Proteine eine größere Menge potentialer Kontaktflächen mit dem alloplastischen Objekt, dies wird jedoch von einer hohen Perfusionsrate kleiner

hochkonzentrierter diverser Proteine nach dem „Vroman Effekt“ im Erstkontakt überboten, so dass kleinere Proteine an die Implantatoberfläche binden und erst später von großen Proteinen ersetzt werden [61]. Die Bindung der Proteine an die Oberfläche der Implantate kann außerdem in einer Konformationsänderung der Proteine und einer ergänzenden Epitoppalette für einwandernde Immunzellen [60], jedoch auch eine erhöhte Kontaktfläche der Proteine für die Implantatoberfläche resultieren [61]. So spielt auch die Stabilität der Proteine eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion der Proteine zum Implantat und der zellulären Immuninteraktion gegen das eingesetzte Material.

Betrachtet man die Tatsache, dass die Wassermoleküle die ersten Kontaktpartner der Implantatoberfläche darstellen, wird die Wichtigkeit der Benetzbarkeit der Materialoberfläche für die Proteinadsorption und den weiteren Verlauf der Wirtsreaktion auf das Implantat deutlich. Eine nanostrukturierte Oberfläche zeichnet sich aufgrund der Lufteinschlüsse innerhalb des Reliefs, ähnlich den Beinen des Wasserläufers, durch ihre Hydrophobizität aus [70]. Es gilt, je hydrophober eine Oberfläche ist, desto stärker ist ihr Proteinadsorptionspotential [61]. Dieses Merkmal kann jedoch nicht separat von anderen chemischen und physikalischen Materialeigenschaften betrachtet werden, es unterstützt mehr die allgemeine Tendenz des Materials. Betrachtet man eine planare Glasoberfläche und eine vergleichbar glatte PEG Beschichtung, so ergeben sich ähnlich hohe Hydrophilitätsverhältnisse im Vergleich zu stark hydrophoben PEG nanostrukturierten Oberfläche. Dabei zeigten Proteinadsorptionsuntersuchungen eine signifikant stärkere Adsorption beim Glas im Vergleich zu den beiden PEG Oberflächen [70]. Jedoch im Vergleich zur glatten PEG Beschichtung, zeigt die nanostrukturierte Oberfläche quantitativ größere Adsorptionswerte [70]. Am Beispiel von PEG wird auch ersichtlich, dass nicht die Quantität der adsorbierten Proteine, sondern die Qualität die Immunantwort auf das eingesetzte Material moduliert. So zeigt die häufig benutzte Beschichtung PEG eine hohe Adsorptionsrate von Apolipoprotein J (Clusterin), welches das „Stealth-Effekt“ gegenüber der Wirtsimmunität ausmacht [58]. Die Benetzbarkeit der Oberfläche hat nicht nur modulatorische Effekte in der Protein-Material Interaktion. Es zeigt auch direkte Wirkungen auf die Immunzellen. So rufen hydrophobe Oberflächen eine verstärkte Aufnahme von injizierten Nanopartikeln, eine verstärkte Expression der kostimulatorischen- und MHC-Moleküle seitens DCs hervor [71], was auf die Aktivierung der Zellen hindeutet.

4.5 Korrosion von Magnesium *in vivo* und *in vitro*

Die *in vivo* und *in vitro* ablaufende Korrosion unterscheidet sich gravierend. Die *in vitro* Korrosion mit stabilen Umgebungsparametern und definierten Komponenten erlaubt eine Passivierung des Magnesiums unter Entstehung von einer Magnesiumhydroxidschicht ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) auf der Oberfläche und somit Reduktion der Korrosion. Den erforderlichen pH-Wert für eine stabile Magnesiumhydroxidschicht, von 9 bis 11, induziert das Magnesium selbst durch Hydroxidionen, die während der kathodischen Reaktion ($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$) entstehen. Die *in vivo* Korrosion unterliegt einer ganz anderen Dynamik. Die hohe Chloridionenkonzentration (über 30 mmol/l) in physiologischen Flüssigkeiten verhindert die Entstehung der korrosionsreduzierenden ($\text{Mg}(\text{OH})_2$)-Schicht durch die Umwandlung von Mg und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ zu leicht wasserlöslichem Magnesiumchlorid, entsprechend der folgenden Formeln: $\text{Mg}(\text{s}) + 2\text{Cl}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{MgCl}_2$ und $\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{s}) + 2\text{Cl}^- \rightarrow \text{MgCl}_2$ [72], [73]. Die Zusammensetzung der entstehenden Korrosionsprodukte auf der Implantatoberfläche wurde schon im Jahre 1975 von Fontenier und Kollegen grob definiert. 60% der Produkte bilden Phosphate von Magnesium und Ammonium, 20% nimmt Magnesiumcarbonat ein und jeweils zu 10% besteht die Schicht aus Magnesiumhydroxid und Calciumcarbonat [74], [75]. Der pH-Wert wird durch verschiedene Mechanismen permanent gepuffert, wodurch die benötigte alkalische Umgebung gehemmt wird und die Passivierung durch die Entstehung von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Schicht verhindert wird. Die starke Perfusion des Gewebes gewährleistet einen schnellen Abtransport der entstehenden Korrosionsprodukte, sowie Wasserstoffgases und Ionen und somit Wiederherstellung des physiologischen Normalzustandes [73]. Die Anwesenheit der Proteine in physiologischen Konditionen wird in vielen wissenschaftlichen Artikeln kontrovers diskutiert. Die Vielfalt der Proteine, sowie die Eigenschaften der Implantate selbst, wie die Oberflächenbeschaffenheit mit deren Rauigkeit und Hydrophobizitätseigenschaften, die Ladung, sowie die Vielfalt an Legierungen erschweren die Bestimmung des Einflusses der einzelnen Proteine auf die Korrosionsgeschwindigkeit der vielfältigen Mg-Implantate enorm. Der Einfluss selbst ist jedoch unumstritten, sei es durch den Beitrag zu einer protektiven Schicht oder als Opsonisierung für die bessere Erkennung des Implantates und der Korrosionsprodukte durch Immunzellen, die die protektive Schicht entweder durch Anhaften stabilisieren oder durch Phagozytose abtragen. Hier gibt es auch einige wenige *in vitro* Untersuchungen mit einzelnen Zelllinien, die jedoch abhängig von der verwendeten Linie von korrosionsprotektiven (Osteoblasten) [76] aber auch korrosionsfördernden [77] Effekten berichten. So scheinen die von Makrophagen produzierte reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) korrosionsfördernd zu agieren, wobei Magnesium deren Sekretion und damit die Korrosion beschleunigen soll [77]. Diese Studien sind jedoch gegenüber der *in vivo* Studien stark benachteiligt, durch die Verwendung einzelner Zelllinien gegenüber dem dynamischen, simultanen Agieren einer Vielfalt an Zellpopulationen *in vivo*.

4.6 Materialbesonderheiten

WE43 vereint in sich gute mechanische Eigenschaften mit hervorragender Korrosionsbeständigkeit [78] sowie ausgezeichneten Biokompatibilitätsmerkmalen [79], [80] und wird bereits in der Klinik eingesetzt. Es ruft keine Hautsensibilisierung hervor, was mit Untersuchungen entsprechend der Magnusson-Kligman Testungen in Meerschweinchen getestet wurde [81]. Für orthopädische Einsätze bietet WE43 eine gute Alternative mit einer höheren Implantatstabilität und Osseointegration [82]. Die seltenen Erden, die als Härter in WE43 Legierung verwendet werden, können im Knochen [83] sowie Blut, Hirn [84], Milz und Lunge [85] akkumulieren. Die Wirkung der seltenen Erden im Körper wurde bisher ungenügend erforscht. Bereits vorliegende Studien sind kontroverser Natur und beinhalten Kurzzeitstudien [86], [87], die einerseits neuroprotektive, antioxidative und in Verbindung mit Chitosan wachstumsfördernde und begünstigende Effekte für die angeborene Immunität und Krankheitsresistenz darlegen [87], [88]. Andererseits jedoch werden allgemein zytotoxische [86], organschädigende, beeinträchtigende systemische Effekte, Redox-Ungleichgewicht-induzierende, ROS und Nitritbildung fördernde, zytogenetisch schädigende und potenziell nephrogene systemische Fibrose (NSF) induzierende Eigenschaften beobachtet [87]. Langfristige Untersuchungen stehen noch aus. Die Zusammensetzung der seltenen Erden Anteile variiert und kann nahezu alle der 17 benannten Elemente beinhalten [86]. Den größten Anteil der WE43 Legierung nimmt jedoch Mg mit ca. 92% ein. Magnesium ist ein fundamentales Element für lebende Organismen. Es übernimmt vielseitige Aufgaben in diversen physiologischen Prozessen. Auf natürlichem Wege, über die Nahrung aufgenommen, wird es im ganzen Körper verteilt und metabolisiert. Das Wirkungsspektrum des Kations reicht vom Humoralen-, über das Nerven- und Immunsystem, es agiert im Energie-, Protein- und Fettstoffwechsel [89], [90]. Den zweit- und dritthäufigsten Anteil stellt Yttrium (Y) (ca. 4%) und Neodymium (Nd) (ca. 2%) dar [86]. Die restlichen ca. 2% der Legierung nehmen weitere chemische Elemente der 3. Nebengruppe des Periodensystems in verschiedenen Mischungsverhältnissen ein. Während des Produktionsprozesses können zudem eisen- oder manganhaltige Verunreinigungen entstehen [86].

Chitosan wird bereits vielfältig in medizinischen Ansätzen benutzt. Das Applikationsspektrum umfasst unter anderem regenerative Therapien (Knochenwiederaufbau) [91], [92], [93], [94], den therapeutischen Bereich, mit unter anderem Adjuvant-Funktion für Krebstherapien [95] und Carrier-Funktion für eine mannigfaltige Breite an Medikamenten [96], als Wund- und Brandversorgungsmaterial [3], sowie in Form von Beschichtungen für Implantate und Stents [97]. Die Einwirkung von Chitosan auf das Immunsystem wird stets als lokal restringiert und moderat bezeichnet, wobei der Acetylierungsgrad und die molekulare Masse die immunogenen Eigenschaften

stark beeinflussen [98]. Überwiegend wirkt es temporär rekrutierend auf Granulozyten und Monozyten [99].

Bioglass 45S5, in erster Linie für orthopädische Zwecke im Bereich der Prothetik entwickelt, zeigt eine starke Adhärenz zum Knochen [100] und Weichgewebe, steuerbar durch den prozentuellen Anteil von Siliziumdioxid [101]. Später wurde auch eine Angiogenese fördernde Wirkung beobachtet [102], sowie eine konzentrationsabhängige antibakterielle Wirkung, die nicht von der Konzentration der einzelnen Bestandteilen (darunter Siliziumdioxid) abhängig ist [4]. Die Interaktion von Bioglas mit dem Immunsystem wurde bisher schwach erforscht. Jedoch gibt es Nachweise, dass Bioglas die Differenzierung der Makrophagen in M2 Richtung lenkt und die Entzündung nach einer Verletzung hemmt, indem es Makrophagen zu einer verstärkten Produktion von entzündungshemmenden und angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert und die Zahl der neutrophilen Granulozyten verringert [103].

Siliziumdioxid, wie zuvor erwähnt, ein Bestandteil von Bioglass 45S5, spielt eine wesentliche Rolle bei der Interaktion des umgebenden Gewebes mit dem Implantat [101]. Die Verwendungsmöglichkeiten von Siliziumdioxid in der Klinik sind sehr vielfältig. Silika kann sowohl rein, in Form von Nanopartikeln, beispielsweise als Medikamententräger (Carrier), als auch in Verbindung mit anderen Stoffen in Biogläsern, Star Gels, mesoporous Silika Materialien, sowie in Beschichtungen verwendet werden [5]. Das Potential zur Ausbildung einer Apatitschicht in Körperflüssigkeiten macht das Material begehrt im Bereich der Knochenregeneration [5]. Abhängig von der Darreichungsform kann es auf das Immunsystem aktivierend [104], toxisch [105] aber auch supprimierend [106] wirken.

5. Material und Methoden

5.1 Verwendete Antikörper

Tab. 1: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse.

Spezifität	Klon	Format	Hersteller
Panel 1			
CD45	OX-1	BV711	BD Biosciences
CD161a	10/78	BV786	
RT1B	REA564	VioBlue	Miltenyi Biotec GmbH
CD68	REA596	APC-Vio770	
CD11a	REA237	PE	
Granulocytes	REA535	PE-Vio770	
ED2	ED2	FITC	BioRad
Fixable Viability Dye eFluor® 506		eFluor® 506	eBioscience
CD172a	OX41	APC	
Panel 2			
CD45	OX-1	BV711	BD Biosciences
CD8a	OX-8	BV605	
IFN- γ	DB-1	Alexa Fluor® 647	
CD45RA	OX-33	BV786	Miltenyi Biotec GmbH
TCR γ/δ	REA547	VioBlue	
CD3	REA223	APC-Vio770	BioLegend
CD4	W3/25	Alexa Fluor® 488	
Fixable Viability Dye eFluor® 506		eFluor® 506	eBioscience
IL-17A	eBio17B7	PE-Cyanine7	
Foxp3	FJK-16s	PE	
Panel 3			
CD8a	OX-8	BV605	BD Biosciences
CD45RA	OX-33	BV786	
RT1B	REA564	VioBlue	Miltenyi Biotec GmbH
Granulocytes	REA535	PE-Vio770	
CD3	REA223	APC-Vio770	BioLegend
CD45	OX-1	Alexa Fluor® 700	
CD4	W3/25	Alexa Fluor® 488	eBioscience
CD161	10/78	PerCP-eFluor® 710	
CD172a	OX41	APC	Anaspec
DAPI			

5.2 Versuchstiere

12 Wochen alte weibliche Lewis Ratten (Harlan Laboratories) mit dem Gewicht von 180-300 g wurden für die Arbeit verwendet. Alle tierexperimentalen Arbeiten wurden gemäß der Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die europäischen und nationalen ethischen Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren wurden eingehalten.

5.3 Implantate/Beschichtungen

Es wurden zwei Bioglasbeschichtungen getestet. WE43 fungierte als Substrat für die verwendeten Beschichtungen. WE43 wurde mit definierten Zusätzen von Yttrium, Y: 3.7-4.3%; Seltene Erden: 2.4-4.4%; Zirconium, Zr: 0.4% und Magnesium, Mg (Rest) ohne Mischmetall von N.Hort, HZG Geesthacht hergestellt. Die weitere Bearbeitung der Scheiben (8 mm Diameter; 2 mm Dicke) erfolgte am Strangpresszentrum der TU Berlin. Die Analyse (Elektronenmikroskopie, TEM) des Substrates, die Entwicklung der bioglasbasierten Oberfläche sowie das Beschichten erfolgte im Lehrstuhl Biomaterialien (WW7), Department Werkstoffwissenschaften, Friedrich Alexander Universität Erlangen - Nürnberg (FAU) unter Leitung von Prof. Dr. Ing. Aldo R. Boccaccini und Lehrstuhl Korrosion und Oberflächentechnik (WW4), Department Werkstoffwissenschaften, Friedrich Alexander Universität Erlangen - Nürnberg (FAU) unter Leitung von Prof. Dr. Sannakaisa Virtanen.

Die Grundbestandteile der beiden verwendeten Beschichtungen sind gleich. Es werden bioaktive Glaspartikel (Glas Puder 45S5 - Schott, Germany) mit einem Durchmesser von 2-4 μm verwendet. Die organische Chitosanmatrix (0.5 g/l Chitosan in 1 Vol% Essigsäure, 20 Vol% Wasser und 79 Vol% Ethanol mit einem mittleren Molekulargewicht, 75-85% deacetyliert, Sigma Aldrich) dient dabei als Basismaterial, das die Partikel auf der Implantatoberfläche zusammenhält. Bei experimentellen Untersuchungen wurde die optimale Konzentration an Bioglasbestandteilen definiert. In beiden Beschichtungen wurde 1 g/l an Bioglaspartikeln (BG) verwendet. Korrosionsversuche haben gezeigt, dass die Zugabe von Siliziumdioxid-Partikeln (SiO_2) eine stabilere Struktur gewährleistet. So wurden bei der zweiten Beschichtung Siliziumdioxid-Partikel in der Konzentration von 0,25 g/l verwendet. Für eine gleichmäßigere Beschichtung wurden die Implantate mit DMEM behandelt. Die Beschichtung erfolgte anschließend mittels elektrophoretischer Abscheidung (EPD). Alle verwendeten Implantate wurden vor dem Einsatz einer gamma-Sterilisation unterzogen.

Als Positivkontrolle, die eine starke Immunreaktion hervorrufen sollte, wurde das Referenzmaterial-F (RM-F) verwendet. Die Polyurethanscheiben mit den gleichen Abmessungen wie die anderen verwendeten Materialien enthielten 0.75% Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC), das zytotoxisch wirkt

und aus diesem Grund als Positivkontrolle nach Isonorm 10993 (Norm zur Beurteilung von Medizinprodukten) empfohlen wird.

Die unbeschichteten Implantate wurden zunächst mit dem Schleifpapier (ATM GmbH) mit einer 800 Korngröße auf einem MetaServ™ 250 Grinder-Polishers (Buehler) geschliffen und einzeln in einem Ultraschallbad mit Ethanol 30 Sekunden lang von den Schleifresten befreit. Anschließend wurde der Schleifvorgang wiederholt unter Verwendung einer feineren Korngröße von 1200. Nach dem wiederholten Ultraschallbad in Ethanol wurden die Proben bei 50°C in einem Vakuumschrank getrocknet und einzeln bis zur Verwendung vakuumiert und verpackt.

5.4 Experimentelles Design

Um die Immunantwort um das eingesetzte Implantat im Zeitverlauf darstellen zu können, wurden sechs Zeitpunkte bestimmt, die sowohl die akute, als auch die chronische Immunantwort erfassen. Die Explantationen wurden am Tag 1, 3, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Sechs Tiere wurden pro Zeitpunkt und Material verwendet. Vier Implantate aus demselben Material wurden pro Tier verwendet (zwei Implantate subkutan und 2 intramuskulär).

5.5 Operativer Eingriff

Zur Analgesie wurden die Tiere mit 0,04 mg/kg Temgesic (Buprenorphin) eine halbe Stunde vor dem Eingriff subkutan behandelt. Anschließend wurde die Narkose in einer Isofluranbox mit 5% Isoflurankonzentration eingeleitet. Das narkotisierte Tier wurde gewogen, die Hautareale dorsal thorakal und abdominal geschoren und das Tier auf einer sterilen Wärmematte fixiert. Die Narkoseerhaltung erfolgte über eine Maske mit 2-2,5% Isofluran und 1 l/min Sauerstoff. Anschließend erfolgte die Antibiose mit Clindamycin (60 mg/kg), mehrfache Desinfektion mit einer alkoholischen Jodlösung (Braunoderm) und Augenschutz mit Augensalbe (Bepanthen). Das Tier wurde thorakal mit einem ca.0,5 cm langen Hautschnitt median entlang der Wirbelsäule geöffnet. Subkutan wurden zwei Taschen links und rechts des Schnittes mittels einer stumpfen Schere stumpf präpariert und jeweils mit einem Implantat versehen. Die Taschen, sowie die Haut wurden anschließend mit Einzelheften verschlossen (Coated Vicryl USP 5-0). Abdominal wurde ein weiterer ca.0,5 cm langer Schnitt entlang der Wirbelsäule gesetzt, die Faszie durchgetrennt und stumpf lateral der Hautinzision erneut zwei Muskeltaschen im Musculus gluteus präpariert. Nach dem Platzieren der Implantate in die Muskeltaschen wurden diese jeweils mit einem U-Heft genäht. Die Haut wurde anschließend mit einer intrakutanen Naht verschlossen. Die Wunden wurden erneut desinfiziert (Braunol) und das Tier bis

zum Aufwachen beobachtet. Postoperativ erfolgte die Analgesie der Tiere über das Trinkwasser 3 Tage lang mit Tramadol 2,5 mg/kg. Alle 7 Tage erfolgte das Wiegen der Tiere, sowie die Beobachtung des Allgemeinzustandes bis zur Euthanasie.

5.6 Explantation

Bei der Explantation wurde dorsomedial im thorakalen und lumbalen Bereich ein Hautschnitt durchgeführt, der lateral erweitert wurde. Die Haut wurde in beiden Lokalisationen abpräpariert und die Kapsel mit dem Implantat vorsichtig herauspräpariert. Die Implantate wurden für die Korrosionsbestimmungen zunächst bei -80°C eingefroren. Herzblutproben wurden bei der Finalisierung isoliert und in einem heparinbeschichteten Röhrchen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt. Um eine bakterielle Kontamination der Wunde auszuschließen, wurden kapselgroße Gewebeproben aus dem implantatnahen Bereich für eine qPCR-Untersuchung entnommen, mittels welcher das Vorhandensein von bakterieller RNA bestimmt bzw. ausgeschlossen werden konnte.

5.7 Aufarbeitung der Implantatgewebekapseln

Alle Schritte (mit Ausnahme der Inkubationen bei Raumtemperatur und bei 37°C) wurden auf Eis und mit eiskalten Medien und Puffern durchgeführt. Jeweils eine subkutane und eine intramuskuläre Kapsel wurde separat voneinander in je 500 µl Kollagenase-Puffer: Desoxyribonuklease (bovine pancreas 2 mg/ml), Collagenase P (Clostridium histolyticum 2,3 U/mg), Hyaluronidase (bovine 2,5 mg/ml), HEPES 0,24 g/ml (alle von Sigma-Aldrich), Sodium Pyruvate for cell culture 11,5 mg/ml (AppliChem Panreac) verdaut. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ eine Stunde lang. Die restlichen beiden Kapseln wurden für die histologischen Untersuchungen verwendet. Nach dem Verdau wurde der Kollagenase-Puffer abgewaschen, die Zellzahl wurde bestimmt, die Kapseln in zwei Hälften geteilt und für die durchflusszytometrische Messung mit Antikörpern aus der Tab. 1 gefärbt. Eine Hälfte der Gewebekapsel je Lokalisation wurde nach dem Verdau gewaschen und für die Diskrimination der toten Zellen mit FVD behandelt. Die Zellen wurden mit CD32 (BD Pharmingen™) blockiert. Es folgte eine extrazelluläre Färbung, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit Leucoperm™ (Bio-Rad) und eine intrazelluläre Färbung des lysosomal gelegenen Proteins CD68 entsprechend des Panels 1 (Tab. 1). Die ergänzende Färbung zur Detektion der Expression der Marker CD4, CD8, CD43 und CD86 auf Leukozyten wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt (Panel Anhang Tab. 3). Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen, Autofluoreszenz und Bestätigung der Spezifität alle verwendeten Antikörper, sowie der Gatingstrategie wurden Isotypkontrollen und FMOs durchgeführt. Die Aufarbeitung der zweiten Kapselhälfte ist unter Punkt 5.8 erläutert.

5.8 Stimulierung der Zytokinproduktion

Die zweite Hälfte der subkutanen und der intramuskulären Gewebekapsel wurde nach dem Verdau für die Zytokindetektion mittels Durchflusszytometrie unspezifisch stimuliert. Dazu wurden die Zellsuspensionen der jeweiligen Kapselhälften 1 Stunde lang mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) (Sigma-Aldrich) und Ionomycin (500 ng/ml) (Ionomycin, Calcium Salt, Streptomyces globatus - CAS 56092-82-1 - Calbiochem) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre, 5% CO₂, 21% O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Brefeldin A (3 µg/ml) weitere 3 Stunden bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit FVD für die lebend/tot Unterscheidung gefärbt, mit einer nachfolgenden extra- und intrazellulären Färbung nach Panel 2 (Tab. 1). Für die Vermeidung der unspezifischen FC-vermittelten Färbung wurden die Zellen mit anti-CD32 (BD Pharmingen™) nach Herstellerangabe blockiert. Die Fixierung und die Permeabilisierung der Gewebszellen vor der intrazellulären Färbung für die Detektion der Zytokine und des Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgte entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung von Invitrogen™ eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate und Diluent Solutions.

5.9 Aufarbeitung von Blut

Das Blut wurde für die durchflusszytometrische Analyse auf 150 µl portioniert. Die Erythrozyten wurden mit eBioscience™ 10X RBC Lysis Buffer (Multi-Species) entsprechend der Herstellerangaben lysiert und extrazellulär mit dem Panel 3 (Tab. 1) gefärbt. Zur Unterscheidung der lebenden und der toten Zellen wurde direkt vor der Messung DAPI beigemischt.

5.10 FACS/Cytospin

Die erarbeitete Gatingstrategie wurde mittels FACS evaluiert. Dazu wurden Kapselzellen entsprechend des Panel 1 (Tab. 1) gefärbt und anschließend gemäß der Gatingstrategie einer Sortierung (FACSARIA II SORP) unterzogen. Die einzelnen Zellpopulationen wurden unter Verwendung von Cellspin-Zubehör von THARMAC mittels einer Cytospin™ 4 Zytozentrifuge (ThermoFisher Scientific) auf Cytoträger (THARMAC) zentrifugiert. Für die morphologische Beurteilung der Zellen wurden die Cytoträger mit Diff-Quik Farbeset (Henry Schein Animal Health) gefärbt, mit Vitro-Clud (R. Langenbrinck GmbH) eingedeckelt und mikroskopisch (Leica DMRB Mikroskop) untersucht. Die Aufnahmen wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl (Zeiss) erstellt.

5.11 Histologie / Bestimmung der mittleren Dicke der Kapsel

Wie zuvor erwähnt, wurden zwei der vier Kapseln (1x subkutan und 1x intramuskulär) für die histologischen Untersuchungen verwendet. Nach der Explantation wurden die Gewebekapseln einer schonenden Kryokonservierung unterzogen. Die isolierte Kapsel wurde lateral aufgeschnitten und das Implantat entfernt, ohne die Ausgangsform zu beschädigen. Mittels Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura) wurden die Proben in Tissue-Tek® Cryomold® Kryoeinbettformen (Einmalformen) der gleichen Firma planar platziert und auf einem stickstoffgekühlten Metallblock schonend eingefroren. Aus den entstandenen Gewebsblöcken wurden mittels des Kryostats Leica CM1950 (Leica Biosystems) 5 µm dicke Kryoschnitte generiert. Die auf HistoBond® microscope slides (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) aufgebrachten Gewebsschnitte wurden mit Picro Sirius Red Stain nach Herstellerangaben mit leichten Abwandlungen gefärbt. Kurz: die Schnitte wurden in 0,5% Sirius Red Lösung (Sigma-Aldrich) für 2 Stunden inkubiert und in 0,5% Essigsäure kurz in zwei Schritten gespült. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe (von 70% bis 100% je zwei Minuten mit Wiederholung des letzten Schrittes) wurden die Schnitte zwei Mal in Xylol inkubiert und mit Vitroclud eingedeckt. Von jedem Präparat wurden Durchlicht-Mosaikafnahmen (10x Vergrößerung) am Axioskop 40 (Zeiss) angefertigt und mittels ImageJ die mittlere Dicke der Kapsel bestimmt.

5.12 Korrosionsuntersuchung *in vitro*/ *in vivo*

Zur Bestimmung des Korrosionsprogresses der verwendeten WE43 Implantate (mit und ohne Beschichtung) nach Ablauf der sechs Zeitpunkte, wurden die Korrosionsprodukte mittels Chrom(VI)-oxid- Lösung (20%) (Bernd Kraft GmbH, Duisburg) abgelöst. Dazu wurden WE43 Implantate 20 Minuten (10 min pro Seite) in 20 % Chrom(VI)-oxid inkubiert. Die beschichteten Proben wurden doppelt so lange mit der Chrom(VI)-oxid- Lösung (20%) behandelt (20 min pro Seite) um neben den Korrosionsprodukten auch die Beschichtungen abzutragen. Nach dem Ablösen der Korrosionsprodukte wurden die Implantate 60 sec in destilliertem Wasser und anschließend 40 Sekunden in 100 % Ethanol (AppliChem Panreac) gewaschen. Die Proben wurden 24 Stunden abgedampft und gewogen. Die Bestimmung der Korrosionsrate (CR in mm/Jahr) erfolgte nach der bereits veröffentlichten Formel [107]: $CR = \frac{8,76 \times 10^4 \times \Delta GV}{A \times t \times Dichte}$. Für die Bestimmung der Delta GV wurde ein Subtrahend der Gewichte vor der Implantation und nach der Chrom (VI)-oxid-Behandlung gebildet. Die Dichte von WE43 beträgt 1,8 g / cm³.

Die Korrosionsrate *in vitro* wurde nur von einem Zeitpunkt bestimmt: 72 Stunden. Zum Imitieren der *in vivo* Bedingungen wurden die Implantate bei 37°C, 10,5% Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid und einer Perfusionsgeschwindigkeit von 0,33 ml/min in einer 12 Kanal Kammer mittels Ismatec IPC

ISM934C IP digitalen 24-Kanal-Peristaltikpumpe korrodiert. Als Perfusionsmedium wurde Dulbecco's PBS (gibcoR by lifetechnologies™) verwendet. Das Perfusionsvolumen betrug 21 ml – entsprechend dem Blutvolumen einer Ratte. Der Durchmesser der Stopper-Schläuche wurde entsprechend der benötigten Fließgeschwindigkeit ausgewählt ($d = 1.02$). Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Korrosionsrate erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie *in vivo*. In den Überständen aus den Perfusionsversuchen wurden zusätzlich folgende Kriterien untersucht: pH-Wert (pH-Meter, SevenCompact™ S220 / Mettler-Toledo, Gießen), Osmolalität (Gefrierpunktsmometer, Gonotec, Berlin) und Leitfähigkeit (Konduktometer, SevenCompact™ S230 / Mettler-Toledo, Gießen).

5.13 q-PCR

Für die RNA-Isolation wurden zwei Verfahren fusioniert. Die Isolation erfolgte nach Chomczynski und Sacchi [108]. Die letzten Waschschriffe und die Elution erfolgten unter Verwendung vom NucleoSpin RNA Plus Kid (Macherey-Nagel GmbH & CO.KG). Die RNA-Sauberkeit und -Konzentration wurde mittels Implen NanoPhotometer P-Class 360 bestimmt. 100 ng RNA wurden mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Herstellerprotokoll in Mastercycler® Gradient (Eppendorf) zur cDNA umgeschrieben. Die Analyse der cDNA wurde mit einem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) unter Verwendung von SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Analyse und die Auswertung der Daten wurde die LightCycler® 480 SW 1.5.1 Software verwendet. Folgende Oligonucleotide wurden benutzt: 16S rRNA Gen (Forward) 5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTC-3'; 16S rRNA Gen (Reverse) 5'-ACGTCRTCCMACCTTCCTC-3' für die Detektion der konservierten Abschnitte des bakteriellen 16S rRNA Gens; und als Haushaltsgen das ubiquitär eukaryotisch vorkommende 18s rRNA (Forward) 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' und 18s rRNA (Reverse) 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3' (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH). Der Ausschluss einer bakteriellen Kontamination erfolgt über die Berechnung der relativen Expression des Ziel- und des Referenz-Gens mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

5.14 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Definition der Oberflächenmuster der verwendeten Materialien, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Implantate vor und nach der Implantation angefertigt. Um die Korrosionsmerkmale der Proben vergleichen zu können wurden Aufnahmen der mit Chrom(VI)-oxid behandelten Proben von WE43, BG und BG-Si angefertigt. Leitende Proben wie WE43, BG und BG-Si wurden ohne Vorbehandlung untersucht. Nichtleitende Proben, wie die Positivkontrolle, wurden zunächst in einer JEOL JFC-1200 Fine Coater nach Herstellerangaben 30 Sekunden lang unter einem Argon-Druck von 8

Pa mit Gold bedampft, um eine feine leitfähige Oberschicht zu erzeugen. Die Topographie der Proben wurde anschließend mit einem JCM-6000Plus NeoScope™ (SEM, Jeol, Tokyo, Japan) bei einer anodischen Ladung von 15 kV mittels Sekundärelektronendetektion (SE) abgebildet. Es wurden jeweils eine Übersichtsaufnahme mit einer Vergrößerung von 50 µm und Detailaufnahmen mit der Vergrößerung von 500 µm erstellt. Für die Aufnahmen wurde die Sekundärelektronen (SE) JCM-6000 Software Ver.2.4 verwendet.

5.15 Statistische Methoden

Die Auswertung der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung von Kaluza Analysis Software/Beckman Coulter 1.5a. Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung von GraphPad PRISM Version 5.0b durchgeführt. Dabei wurde das prozentuelle Verhältnis der einzelnen Populationen innerhalb eines Dotplots betrachtet. Dabei gilt: ein Dotplot wird als 100% angesehen, so dass die insgesamt gemessene Menge der Zellen keinen Einfluss auf die Größe der Populationen innerhalb eines Dotplots ausübt. Zur Aufklärung der Abhängigkeit der Zielvariablen (ausgewählten Zellpopulationen) von den gegebenen Einflussvariablen (Faktor 1= Zeit; Faktor 2 = Material) wurde sich der Two-way ANOVA (zweifaktorielle Varianzanalyse) bedient mit einem Bonferroni post-test. Der Nachweis der Normalverteilung erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests bedingt durch die kleine Stichprobe. Zur Auswertung der mittleren Expression der bakteriellen mRNA in Proben aus dem implantatnahen Bereich wurde der t-Test verwendet. Zum Auswerten der ordinalskalierten makroskopischen Daten wurden den makroskopisch definierten Merkmalen einer Ausprägung, in diesem Fall die „Schwellung, Ödematisierung, Einblutung, Gasbildung, Vaskularisierung, Serombildung“ steigend numerische Werte zugeordnet - entsprechend dem Maß der Ausprägung. So bekam ein Tier, dass keine Ausprägung des Merkmals aufwies, die Nummer 0 zugewiesen. Bei leicht aufgetretenem Merkmal, wurde die Nummer 1 verteilt. Eine mittlere Ausprägung bekam die Ziffer 2. Das stärkste Auftreten des Merkmals erhielt die Nummer 3. Neben den oben genannten makroskopischen Merkmalen wurden folgende Kriterien betrachtet: Fibrinausbildung, das Verwachsen der Kapsel mit umgebendem Gewebe, Anhaftung der Kapsel an das Implantat, sowie Schorfbildung. Da all diese Kriterien nominalskaliert sind und man lediglich bestimmen kann, ob das Merkmal bei unabhängigen statistischen Einheiten auftritt oder nicht, wurden auch hier eine Kodierung der Variablen vorgenommen. So wurde dem Auftreten des Merkmals die Ziffer 1 zugeordnet und dem Ausbleiben der Ausprägung die Ziffer 0.

6. Ergebnisse

6.1 Leukozytenprofil der Gewebekapseln getesteter Implantate

Nr.	Subpopulationen	Zellmarker												Leukozytenart
		CD68	CD163	CD161	CD172a	RT1b	Granulozyten	CD11a	CD45	CD86	CD43	CD4	CD8	
1	CD68 ⁺ CD163 ^{low}	+	low	+/low	+	+/low	+/low	+/low	+	+	+	+	-/low	Makrophagen
2	CD68 ⁻ CD163 ^{low}	-	low	-	+	+/low	-/+/low	+/low	+	+	+	+	-/low	
3	CD68 ⁺ CD163 ⁻	+	-	+/low	+/low	-/+/low	+/low	+	+	+	Low/-	+	-/low	
4	CD68 ⁺ CD163 ⁺	+	+	-	+	+/low	-/low	-	+	+	+	+	+/low	
5	CD68 ⁻ CD163 ⁺	-	+	-	+	+/low	-/low	low	+	+	-/low	+	-/low	
6	eosinophile Granulozyten	-	low	-	+	+	-	low	+	+	+	-	+	Granulozyten
7	neutrophile Granulozyten	-	-	-	+/low	-	+	+	+	low	-/low	-	-	
8	basophile Granulozyten	-	-	low	low/+	-	+	low	low	low	-/low	+	-	
9	NK-Zellen	-	-	+	-	-	-	+/low	+	-	-	-	low/-	Natürliche Killerzellen
10	NK-T-Zellen	-	-	low	-	-	-	-	low	-	-	-	+	
11	CD68 ⁻ CD172 ^{hi} CD161 ^{hi}	-	-/low	+	+	+/low	low	+	+	+	-/low	+	low	Dendritische Zellen
12	CD68 ⁺ CD172 ⁻ CD161 ^{hi}	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	low	
13	CD68 ⁻ CD172 ^{low} CD161 ^{hi}	-	-	+	low	-	+/low	+	+	+	-/low	+	-	
14	CD68 ⁻ CD172 ^{low} CD161 ⁻	-	-	-	low	-	+	+	+	+	-/low	+	-	Monozyten
15	RT1b ⁺ CD161 ⁻	-	-/low	-	+	+	low	low	+	+	low	+	low	
16	RT1b ⁻ CD161 ⁺	-	-	low	+	-	+	+	+	low	-	low	-	
17	RT1b ⁺ CD161 ⁺	-	-/low	low	+	+	+/low	+	+	+	-/low	low	low	
18	CD172 ^{hi} RT1b ⁻ CD161 ⁻	-	low	-	+	-	+	+/low	+	+	low	+	-	Lymphozyten (ohne NK-Zellen)
19	T-Zellen	-	-	-	-	-	-	+/low	low	-/low	-/low		+/-	
20	B-Zellen	-	-	-	-	low	-	-/low	+	-/low	-	-	-	Mastzellen
21	Mastzellen	-	-	-	low	-	-	-	+	-	-	-	-	

Tab. 2: Charakterisierung der detektierten Subpopulationen aus den Gewebekapseln mittels durchflusszytometrischer Untersuchung auf der Basis von oberflächlichen und intrazellulären Markern. Die Expression der Marker CD86, CD43, CD4 und CD8 wurde in einer ergänzenden Untersuchung eruiert (Anhang Tab. 3).

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Gewebekapsel im subkutanen und intramuskulären Bereich mit Panel 1 aus der Tab. 1 erlaubte die Detektion von 21 distinkten Populationen (Tab. 2) auf der Basis von externen- und intrazellulär gelegenen Markern. Alle Gewebekapseln enthalten die aufgeführten Populationen unabhängig vom getesteten Material. Mittels Isotypkontrollen und FMOs konnte die Gatingstrategie und die Spezifität der Antikörper bestätigt werden. Anhand von Pan-Markern (z.B.: Makrophagen-Marker CD68) und phänotypischen Merkmalen konnten die Zellpopulationen zu spezifischen Subpopulationen zusammengefasst werden.

6.2 Verstärkte Expression des M2 Phänotyps in Gewebekapseln von WE34 ohne Beschichtung

Der Vergleich der durchflusszytometrischen Daten von vier getesteten Materialien (WE43, RM-F, BG und BG-Si) unter Verwendung von Panel 1 (Tab. 1) im Verlauf von Tag 1 bis Tag 28 zeigte eine stärkere Ausprägung des CD163 exprimierenden M2 Phänotyps in den subkutanen und intramuskulären Kapseln von WE43 im Vergleich zu den restlichen getesteten Materialien (Abb. 1 A). CD68⁺CD163⁺ Zellen treten signifikant stärker in der WE43 Kapsel im Vergleich zu BG-Kapseln am Tag 14, 21 und 28 in der subkutanen Lokalisation auf. Verglichen mit den BG-Si Kapseln sind Signifikanzen am Tag 21 und 28 detektierbar. RM-F Kapseln zeigen eine geringere Präsenz der Population als die WE43 Kapseln am Tag 14 und 28. Außerdem konnten signifikant mehr CD68⁺CD163⁺ Zellen in der RM-F Kapsel im Vergleich zur BG-Si am Tag 21 und im Vergleich zu BG am Tag 28 detektiert werden. Die CD68⁺CD163⁺ Zellen zeigen eine stärkere Präsenz in der WE43 Kapsel im Vergleich zu RM-F, BG und BG-Si ab Tag 14 in der subkutanen und der intramuskulären Lokalisation. Zusätzlich konnte ein Expressionspeak am Tag 3 in der WE43-Kapsel intramuskulär detektiert werden, der signifikant höher als in allen anderen Kapseln der getesteten Materialien war. Am Tag 7 ist der Expressionsunterschied lediglich zwischen WE43 und BG Kapseln signifikant. Die CD163 exprimierenden Zellen zeigen einen vergleichbaren Phänotyp mit einem großen Zellkern, viel Zytoplasma mit basophilen Vakuolen und feinen Ausläufern. CD68⁺ Zellen sind lediglich größer und zeigen eine dichtere Ausläuferformierung. Die verstärkte Ausprägung des M2 Phänotyps in WE43 unbeschichteten Kapseln korreliert mit einer signifikant geringeren Menge der neutrophilen Granulozyten in derselben (Abb. 1 B). Am Tag 3 und 14 enthalten WE43 Kapseln signifikant weniger neutrophiler Granulozyten als RM-F, BG und BG-Si Kapseln in der subkutanen Lokalisation. Am Tag 7 und 21 ist die Expression des Neutrophilen-Markers in der WE43 Kapsel signifikant geringer als in BG-Si Kapseln. Intramuskulär sind die Unterschiede zwischen WE43 und allen restlichen Materialien am Tag 7 und 28 signifikant. Zusätzlich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen WE43 und RM-F sowie WE43 und BG am Tag 14 und zwischen WE43 und BG am Tag 21 in derselben Lokalisation.

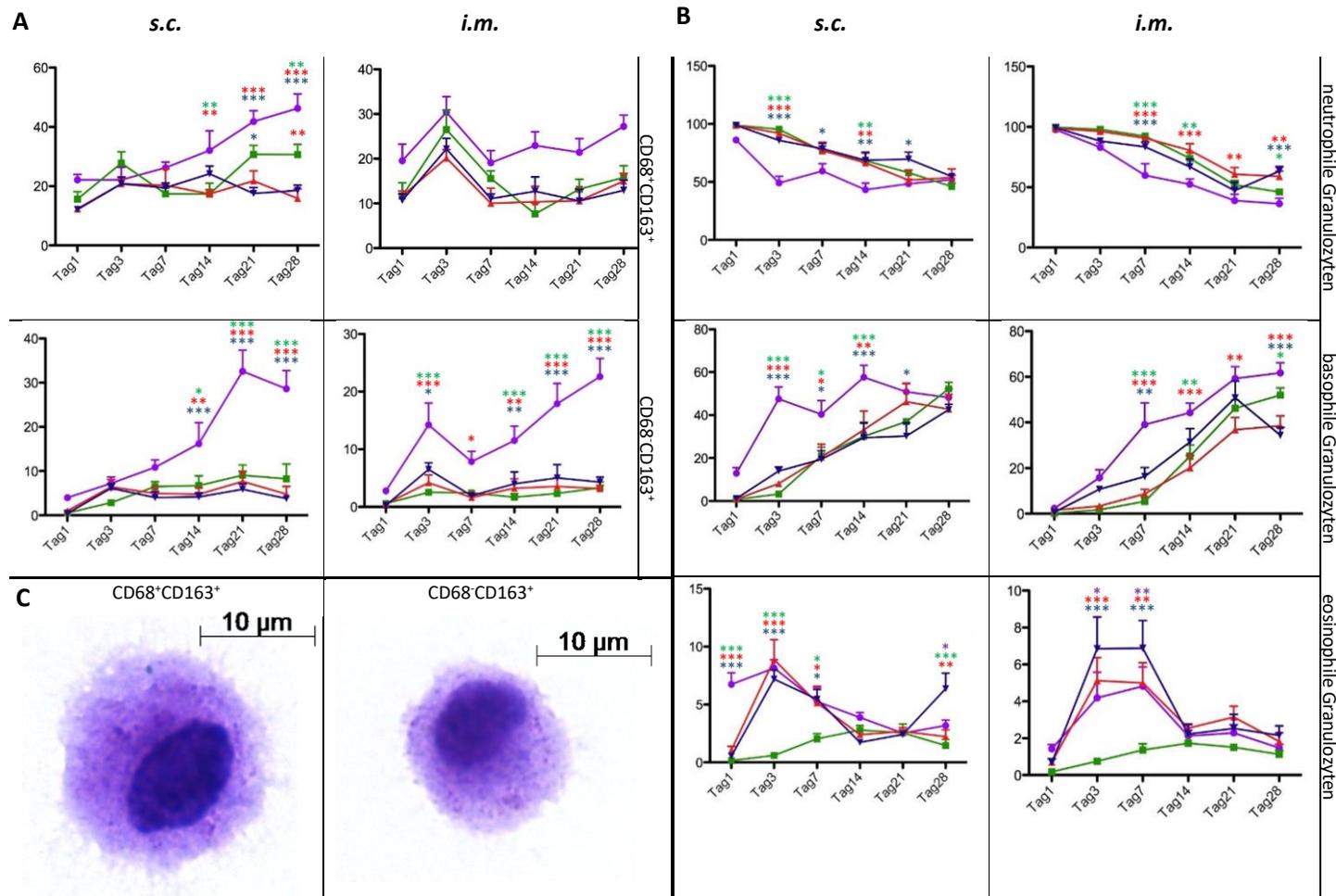


Abb. 1: Kinetik der CD163 positiver Zellen und Granulozyten-Subsets von 4 Materialien im 28-Tages-Verlauf. Kapselzellen wurden zur entsprechenden Zeitpunkten nach 5.7 bearbeitet und mit Panel 1 (Tab. 1) gefärbt. Je Lokalisation, Zeitpunkt und Material beträgt n=6. Je Population sind beide Lokalisationen (s.c. und i.m.) dargestellt. (A) Mittelwerte von %Gated von CD68⁺ CD163⁺ und CD68⁻ CD163⁺ Zellen. (B) Kinetik der Granulozyten-Subpopulationen in den Kapseln (%Gated). (C) Mikroskopische Aufnahme der CD68⁺CD163⁺ und CD68⁻CD163⁺ Zellen (nach 5.10). Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant) *.

Auffällig ist außerdem die teilweise höchst signifikante Zunahme der basophilen Granulozyten in der WE43 Kapsel im Vergleich zu den anderen Materialien (Abb. 1 B). Am Tag 3, 7 und 14 exprimieren Referenzkapseln (RMF) sowie die Kapseln der beschichteten Materialien BG und BG-Si subkutan signifikant geringere Mengen an basophilen Granulozyten. Am Tag 21 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen WE43 und BG-Si Kapseln. Im intramuskulären Bereich finden sich signifikante Unterschiede zwischen WE43 und den restlichen Materialien am Tag 7 und 28. Darüber hinaus ist die Präsenz der Basophilen in der WE43 Kapsel am Tag 14 signifikant höher als in der RM-F und der BG-Kapsel. Am Tag 21 sind die Expressionen zwischen WE43 und BG signifikant unterschiedlich. Ein gemeinsames Merkmal der WE43-Kapsel und der Kapseln der beschichteten Materialien im Vergleich zu dem Positivmaterial RM-F ist ein signifikant starker Anstieg der eosinophilen Granulozyten. Im Zeitintervall von Tag 1 bis Tag 7 ist der Anstieg in der WE43 Kapsel s.c. und von Tag 3 bis Tag 7 in den beschichteten Materialien in der subkutanen Region signifikant höher als in den RM-F- Kapseln (Abb. 1 B). In der BG-Si-Kapsel subkutan tritt außerdem ein signifikanter Anstieg am Tag 28 im Vergleich zu WE43, RM-F und BG-Kapseln. Intramuskulär ist ein signifikanter Expressionspeak am Tag 3 und 7 in den Kapseln von WE43, BG und BG-Si im Vergleich zu RM-F detektierbar.

6.3 M1 geprägte Immunreaktion auf Referenzmaterial-F

Die Positivkontrolle, gewählt auf Basis der ISO 10993 zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten, ruft eine Immunreaktion hervor, die von M1 Makrophagen ($CD68^+CD163^-$) dominiert wird. In der subkutanen Kapsel von RM-F-Tieren treten an allen getesteten Tagen mehr in M1-Richtung differenzierte Zellen auf, als in den BG-Kapseln (Tag 1, 3, 7, 14, 21, 28) (Abb. 2 A). Zwischen der RM-F- und der BG-Si-Kapsel sind signifikante Expressionsunterschiede am Tag 1, 3, 7 und 21 und zwischen RM-F und WE43 am Tag 1 zu verzeichnen. In der intramuskulären Lokalisation gibt es signifikante Unterschiede zwischen RM-F und dem unbeschichteten Material WE43 am Tag 7 und 21 (Abb. 2 A). Am Tag 7, 14, 21 und 28 ist die Expression des M1 Phänotyps bei BG und am Tag 7, 21 und 28 bei BG-Si geringer als bei RM-F. In der WE43-Kapsel steigt der M1 Phänotyp am Tag 28 und zeigt signifikante Unterschiede zum beschichteten Material BG subkutan und BG-Si intramuskulär. Phänotypisch unterscheiden sich die $CD68^+CD163^-$ Zellen von den $CD163^+$ Zellen durch ein geringeres Durchmesser und ein reduziertes Zytoplasmavolumen, jedoch mit vergleichbarer Vakuolen- und Ausläuferdichte (Abb. 2 B).

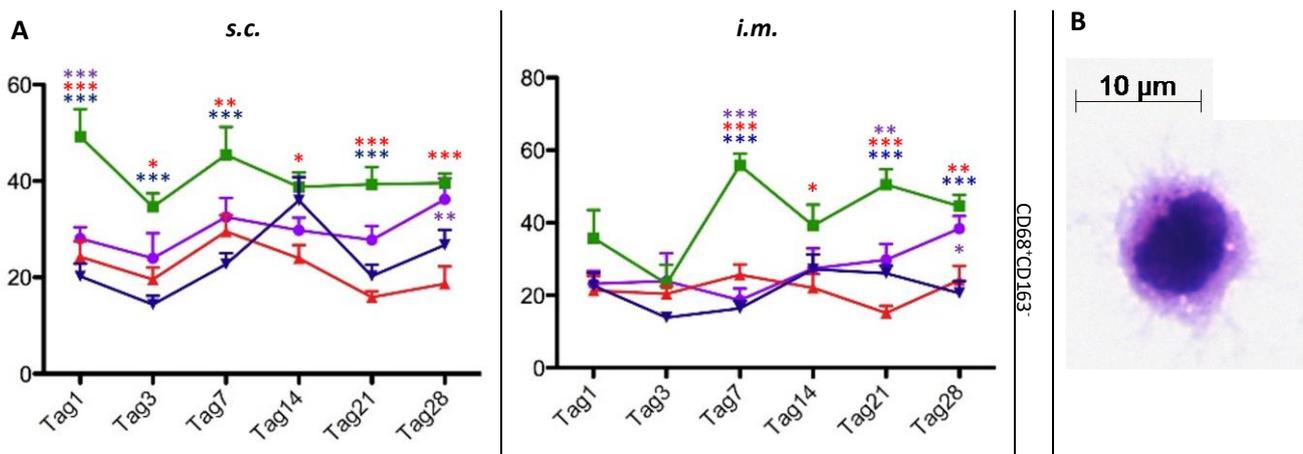


Abb. 2: Expression der M1-Makrophagen im 28-Tages-Verlauf. (A) Mittelwerte der Prozentsätze (%Gated) der $CD68^+CD163^-$ Makrophagen ($n=6$) in subkutanen und intramuskulären Kapseln von WE43, RM-F, BG und BG-Si. Legende: \bullet WE43 \blacksquare RM-F \blacktriangle BG \blacktriangledown BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*. (B) 100-fache Mikroskop-Aufnahme einer $CD68^+CD163^-$ Zelle (nach 5.10).

6.4 Implantatgewebekapseln enthalten CD68⁺CD163^{low} und CD68⁻CD163^{low} Makrophagen, die eine analoge konkomitierende TH17-Zell-Kinetik aufweisen

Die durchflusszytometrische Untersuchungen der Gewebekapseln von WE43, RMF, BG und BG-Si mit 9 Farben (Panel1 Tab. 1) ergab zwei Populationen mit einer schwachen Expression des CD163 Antigens: CD68⁺CD163^{low} und CD68⁻CD163^{low} (Abb. 3 A). Beide Populationen zeigen einen ähnlichen Verlauf innerhalb der getesteten 28 Tage. Die beschichteten Proben verursachen verstärktes Auftreten der CD68⁺CD163^{low} und CD68⁻CD163^{low} Zellen in der subkutanen und der intramuskulären Lokalisationen im Vergleich zu der Positivkontrolle RM-F und der unbeschichteten WE43 Legierung. Die Unterschiede sind im subkutanen Bereich bei den CD68⁺CD163^{low} Zellen signifikant am Anfang: Tag 1, 3 und 7 zwischen RM-F und BG-Si und am Tag 1 und 3 zwischen RM-F und BG, sowie in der Endphase am Tag 21 und 28 zwischen RM-F, BG und BG-Si. WE43 zeigt signifikante Unterschiede zu BG-Si s.c. am Tag 1, 7, 21 und 28 und zu BG am Tag 14, 21 und 28. Im intramuskulären Bereich ist der Expressionsunterschied in den letzten experimentellen Tagen am stärksten. Am Tag 7, 21 und 28 ist dieser zwischen dem Positivmaterial RM-F und den beschichteten Proben BG und BG-Si signifikant. Bei WE43 unbeschichtet treten signifikante Abweichungen zu BG-Kapseln am Tag 14, 21 und 28 und zu BG-Si am Tag 28. Die CD68⁻CD163^{low} Population verhält sich ähnlich in den Kapseln der getesteten Proben. Im subkutanen Bereich zeigt die RM-F Kapsel eine signifikant geringere Expression der CD68⁻ Zellen am Tag 1, 21 und 28 als BG und am Tag 21 und 28 als BG-Si. Die WE43-Kapseln enthalten signifikant geringere Mengen der CD68⁻CD163^{low} Zellen am Tag 1, 21 und 28 als BG-Kapseln und am Tag 21 und 28 im Vergleich zu BG-Si-Kapseln. Im intramuskulären Bereich ist die geringere Expression der CD68⁻CD163^{low} Population am deutlichsten zwischen RM-F und den beschichteten Materialien zu sehen. Statistisch signifikant sind diese am Tag 7, 21 und 28. WE43-Kapseln enthalten signifikant geringere Mengen der CD68⁻CD163^{low} Zellen am Tag 21 im Vergleich zu BG und am Tag 28 im Vergleich zu BG-Si. In der intramuskulären Lokalisation gibt es einen Tief der CD68⁺CD163^{low} und CD68⁻CD163^{low} Populationen in der RM-F-Kapsel am Tag 7. Die Expression der beiden Populationen ist hier auch im Vergleich zu WE43 signifikant geringer. Anhand der Expressionsstärke der beiden Marker: CD68 und CD163, konnten somit insgesamt vier Populationen definiert werden: CD68⁺CD163^{low}, CD68⁻CD163^{low}, CD68⁺CD163⁺ und CD68⁻CD163⁺ (Abb. 3 C). CD4⁺IL-17⁺ Zellen (Th17-Zellen) zeigen einen zu den CD163^{low} Zellen analogen Verlauf innerhalb der getesteten 28 Tagen (Abb. 3 B). Die RM-F-Kapsel enthält signifikant geringere Mengen an TH17-Zellen im Vergleich zu BG-Si am Tag 14 subkutan und intramuskulär und im Vergleich zu BG am Tag 14 intramuskulär. WE43-Kapseln enthalten signifikant größere Mengen der CD4⁺IL-17⁺ Zellen im Vergleich zu allen anderen getesteten Materialien am Tag 1 subkutan und im Vergleich zu BG-Si intramuskulär. Am Tag 14 zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen WE43 und BG-Si intramuskulär.

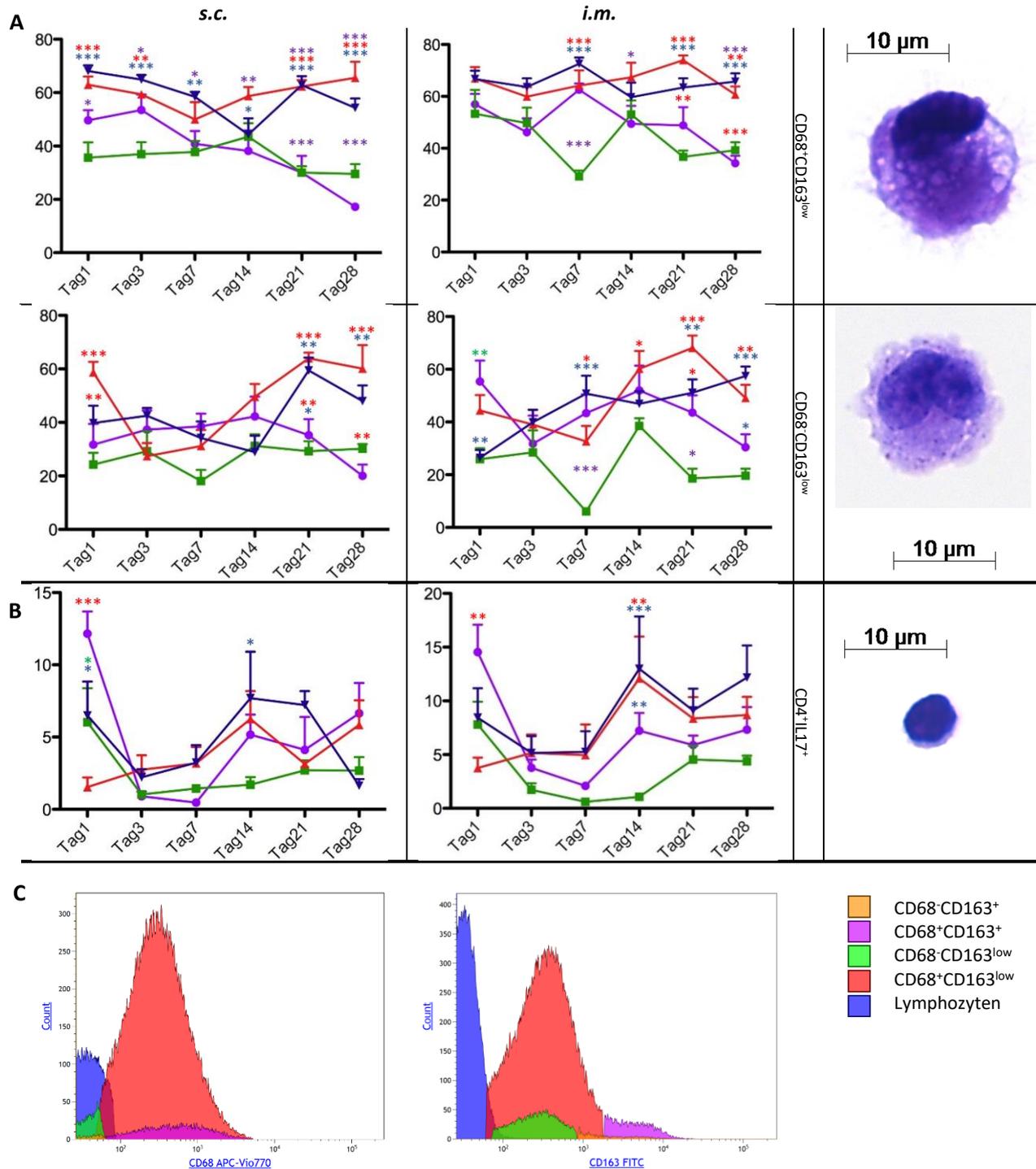


Abb. 3: Verlauf der CD68⁺CD163^{low} und CD68⁺CD163^{high} Makrophagen, sowie TH17-Zellen von Tag 1 bis Tag 28 in Implantatgewebekapseln von 4 Materialien: WE43, RM-F, BG, BG-Si. Die Zellen wurden nach 2.7 bearbeitet und mit Panel 1 und 2 (Tab. 1) gefärbt. Der Stichprobenumfang beträgt je Lokalisation, Zeitpunkt und Material sechs (n=6). (A) %Gated von CD68⁺CD163^{low} und CD68⁺CD163^{high} Zellen im subkutanen und intramuskulären Bereich sowie mikroskopische 100x Aufnahmen der beiden Populationen (nach 2.10 bearbeitet). (B) Kinetik der TH17-Zellen im 28-Tages-Verlauf (%Gated) mit einer mikroskopischen Abbildung der Zellart (100x). Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*. (C) Histogramm aller CD163 exprimierender Makrophagen-Subpopulationen untersucht auf CD68 Expression links und CD163 Expression rechts. Als Negativkontrolle fungiert die Lymphozytenpopulation, die für beide Marker negativ ist.

CD68⁺CD163^{low} Zellen zeigen ein basophiles Zytoplasma mit einem dunkelvioletten dichten Kern, der etwa 1/3 des Zytoplasmas einnimmt (Abb. 3 rechts). Die Zellen sind mit ca. 15 µm sehr groß und weisen wie CD163⁺ Zellen dendritenähnliche Ausläufer. Das Zytoplasma ist mit großen hellen Vakuolen versehen. CD68⁻CD163^{low} Zellen sind geringfügig kleiner mit blassem graublauem Zytoplasma, einem bohnenförmigen Kern und ubiquitärer Verteilung von kleinen basophilen und weißen Vakuolen. Die Th-17 Zellen zeigen mit ca. 6 µm Zellgröße ein lymphozytäres Äußeres mit einem dichten großen Zellkern und geringem basophilem Zytoplasmarrand (Abb. 3 rechts).

6.5 Verstärkte Expression des CD161^{low} Monozytenphänotyps in der RM-F-Kapsel

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Implantatgewebekapseln hinsichtlich der Monozyten ergab eine Dominanz der CD161^{low} Monozyten in der Kapsel des Referenzmaterials im Vergleich zu WE43, BG und BG-Si (Abb. 4 B). CD161⁻ Monozyten hingegen zeigen eine reduzierte Präsenz in den Kontrollkapseln verglichen mit den restlichen getesteten Materialien. Die Differenz ist im intramuskulären Bereich stärker ausgeprägt als subkutan (Anhang Abb. 22). Der Expressionsunterschied der RT1b⁺CD161⁻ Monozyten in RM-F-Kapseln ist im Vergleich zu WE43-Kapseln an allen getesteten Tagen außer am Tag 7 signifikant. Im Vergleich zu BG-Kapseln sind die Werte in der RM-F-Kapsel signifikant niedriger am Tag 1, 14, 21 und 28. Verglichen mit BG-Si-Kapseln sind signifikant geringere Mengen am Tag 1, 3, 21 und 28 detektiert worden. Außerdem finden sich signifikante Unterschiede in der gleichen Population zwischen WE43 und BG-Si am Tag 1 sowie zwischen WE43 und BG am Tag 1, 3 und 28. Für beide Marker (RT1b und CD161) negative Monozyten sind verstärkt in den Kapseln von WE43, BG und BG-Si ab Tag 7 bis 28 vorhanden im Vergleich zum Referenzmaterial. Am Tag 1, 3, 14, 21 und 28 treten RT1b⁺CD161^{low} Monozyten in der Kapsel von RM-F im Vergleich zu WE43 signifikant stärker auf. An allen getesteten Tagen wurden signifikante Expressionsunterschiede der RT1b⁺CD161^{low} Population zwischen RM-F und BG detektiert. Der Vergleich von BG-Si und RM-F ergab signifikant stärkere Expression der RT1b⁺CD163^{low} Population in der RM-F Kapsel an allen getesteten Tagen außer am Tag 1. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WE43 und BG-Si in derselben Population am Tag 1 detektiert werden. Die Monozyten mit dem Phänotyp RT1b⁻CD161^{low} zeigten eine signifikant stärkere Expression in der RM-F Kapsel im Vergleich zu WE43, BG und BG-Si in letzteren getesteten Zeitpunkten an folgenden Tagen: 7, 14, 21, 28. Die Gatingstrategie, die die Detektion der vier Monozytenpopulationen erlaubt, ist in Abb. 4 A dargestellt.

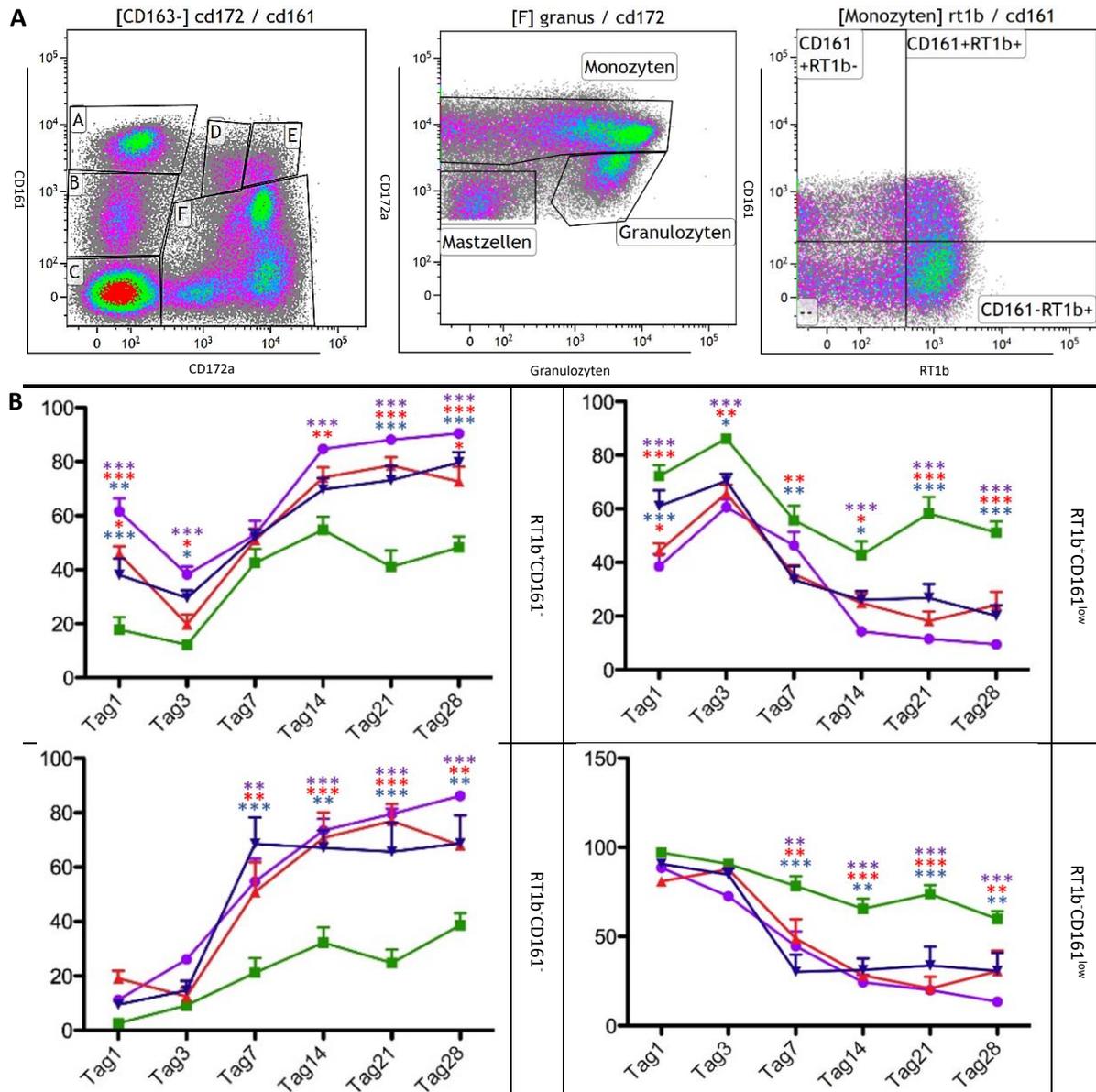


Abb. 4: Monozyten-Subpopulationen im 28-Tages-Verlauf aus der intramuskulären Lokalisation und die Gatingstrategie für Monozyten. (A) Gatingstrategie der CD68⁺CD163⁻ Monozyten. Links: alle CD68⁺CD163⁻ Zellen. A: NK-Zellen; B: NK-T-Zellen; C: Lymphozyten/B-Zellen; D: CD172^{hi} DCs; E: CD172^{low} DCs; F: Monozytenenthaltene Populationen. Mitte: Mastzellen, Granulozyten und Monozyten. Rechts: RT1b⁺CD161⁻, RT1b⁺CD161^{low}; RT1b⁻CD161⁺, RT1b⁻CD161^{low} Monozyten. (B) %Gated von Monozyten-Subpopulationen im Verlauf von 28 Tagen (n=6) intramuskulär. Legende:
 ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant) *.

6.6 TH1-und TC1-Zellen fungieren nicht hauptsächlich als INF- γ Quelle für die Makrophagendifferenzierung in M1 Richtung

Als Quelle von INF- γ zur Differenzierung der Makrophagen in M1 Richtung in der Gewebekapsel von RM-F scheinen nicht die TH1-Lymphozyten zu fungieren. Die Menge der INF- γ exprimierenden Zellen ist in Kapseln aller getesteten Materialien (RM-F, WE43, BG und BG-Si) vergleichbar. Lediglich am Tag 1 zeigen die WE43 Kapseln eine signifikant stärkere Expression des Zytokins in TH1-Zellen als in BG und BG-Si-Kapseln im subkutanen und intramuskulären Bereich (Abb. 5 A). Intramuskulär finden sich signifikante Unterschiede zusätzlich am Tag 14 zwischen WE43 und RM-F, sowie zwischen RM-F und BG. Am Tag 28 sind Signifikanzen zwischen BG und BG-Si, sowie am Tag 14 und 28 zwischen RM-F und BG-Si in derselben Lokalisation detektierbar. Die TC1 –Zellen verhalten sich ähnlich. Im subkutanen Bereich konnte ein signifikant stärkeres Aufkommen der CD8⁺INF- γ ⁺ Zellen in der WE43 Kapsel im Vergleich zu BG und BG-Si Kapseln ermittelt werden (Abb. 5 B). Im intramuskulären Bereich gibt es keine Unterschiede zwischen den Materialien. NK- und NK-T-Zellen treten verstärkt in der RM-F Kapsel auf (Abb. 5 C). Im intramuskulären Bereich ist die Differenz stärker als subkutan. Eine signifikant höhere Anzahl von NK-T-Zellen kommt in Gewebekapseln des Referenzmaterials am Tag 14, 21 und 28 i.m. vor im Vergleich zu Kapseln des unbeschichteten WE43. Zwischen RM-F und den beschichteten Materialien BG und BG-Si konnten signifikante Unterschiede am Tag 28 festgestellt werden. Zudem gibt es auch signifikante Unterschiede in der gleichen Lokalisation zwischen WE43 und BG-Si am Tag 14 im subkutanen (Anhang Abb. 21) und intramuskulären Bereich. RM-F und BG-Si enthalten signifikant voneinander abweichende Mengen der NK-T-Zellen am Tag 14 im subkutanen Bereich (Anhang Abb. 21). Die natürlichen Killerzellen verhalten sich ähnlich. In der RM-F Kapsel kommen i.m. signifikant mehr NK-Zellen am Tag 14, 21 und 28 als in WE43, BG und BG-Si-Kapseln vor. WE43 und BG Kapseln exprimieren zusätzlich am Tag 7 signifikant geringere Mengen des Markers in der gleichen Lokalisation. Im subkutanen Bereich zeigen sich Unterschiede am Tag 7 zwischen dem Referenzmaterial und BG, sowie zwischen RM-F und WE43 (Anhang Abb. 21).

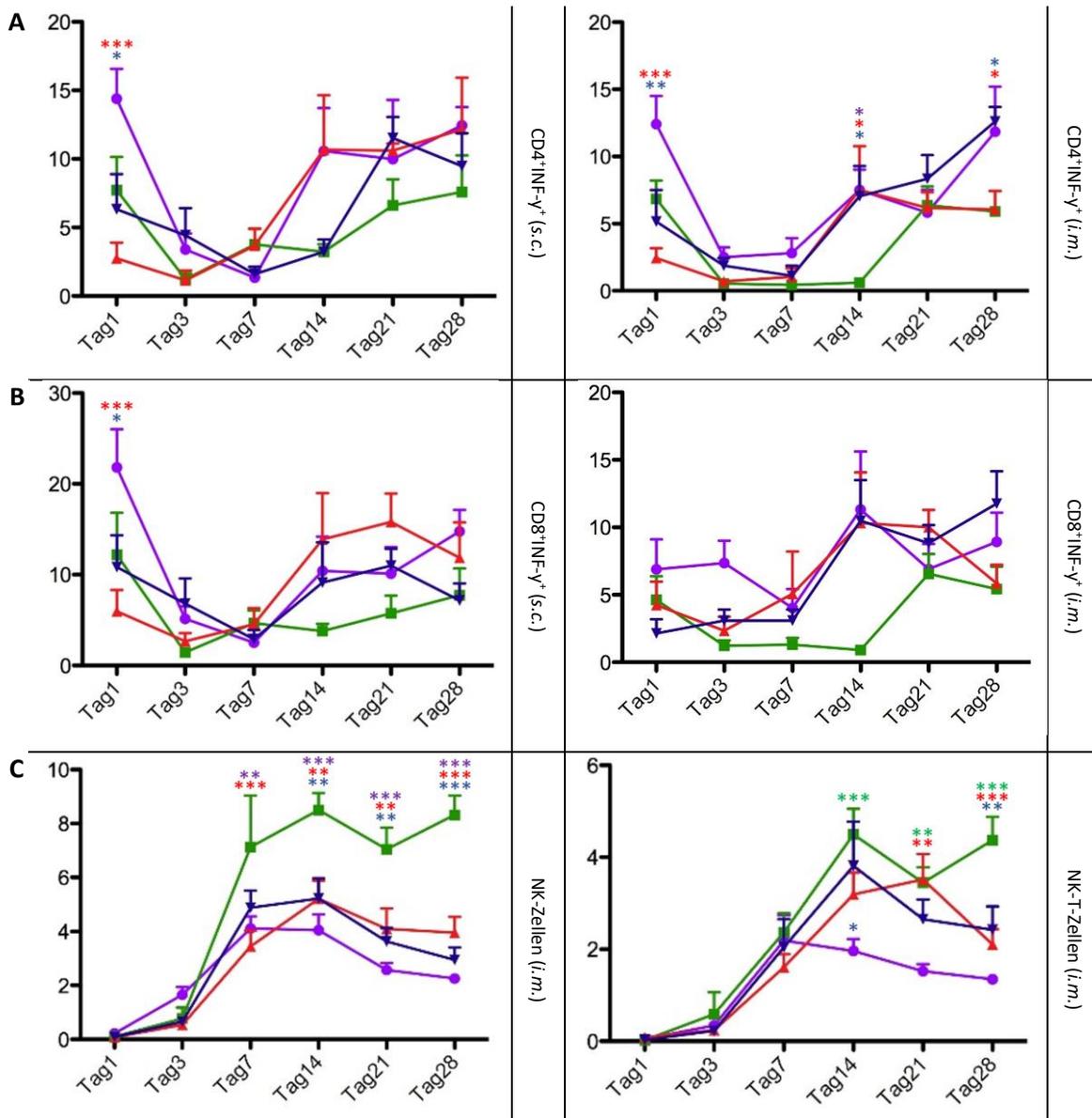


Abb. 5: TH1, TC1, NK-T und NK-Zellen in Implantatgewebekapseln im Verlauf von 28 Tagen ($n=6$). (A) Mittelwerte der %Gated von TH1-zellen im Verlauf von 28 Tagen. (B) Mittelwerte der Prozentsätze (%Gated) von TC1-Zellen. (C) links: NK-Zellen (%Gated) intramuskulär und rechts: NK-T-Zellen (%Gated) im intramuskulären Bereich. Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant) *.

6.7 Ruhender Phänotyp der DCs mit verminderter Primingaktivität dominiert in Fremdkörpergewebekapseln der getesteten Materialien

Vier unterschiedliche Populationen dendritischer Zellen wurden in den Gewebekapseln der getesteten Materialien detektiert. Diese unterscheiden sich morphologisch und phänotypisch voneinander. $CD68^+CD172^-CD161^{hi}$ Zellen weisen eine für reife dendritische Zellen typische Morphologie mit zahlreichen langen Dendriten und einem großen polylobulären Kern auf (Abb. 6 A). Zudem exprimieren die Zellen verstärkt RT1b, CD161a und kein CD4 (Tab. 2). Die zweite Population ($CD68^-CD172^{hi}CD161^{hi}$)

besitzt einen dichteren gleichmäßigeren, jedoch auch sehr großen Kern und wenig Zytoplasma mit einigen wenigen kurzen Dendriten (Abb. 6 A). Das Zytoplasma ist etwas basophiler als die der ersten Population. Phänotypisch weisen die Zellen eine starke RT1b, CD172a, sowie CD161 Expression (Tab. 2). Sie sind positiv für CD4 und CD8^{low}. Die Morphologie der dritten Population (CD68⁺CD172^{low}CD161^{hi}) mit dem dichten, großen, multilobulären Kern, wenig Zytoplasma und einzelnen wenigen Dendriten ähnelt der eines pre-DCs (Abb. 6 A). Diese Zellen sind RT1b^{low}, CD4 positiv CD172^{low} und CD161a^{low} (Tab. 2). Die Vierte Population (CD68⁺CD172^{low}CD161⁻) besitzt einen noch größeren Kern, welches mit einem dünnen Rand von Zytoplasma und kurzen feinen Dendriten umrandet wird (Abb. 6). Phänotypisch wird diese Population mit einer schwachen CD172a und CD4, keiner RT1b, CD161a und CD8 Expression charakterisiert (Tab. 2). Drei der vier detektierten Populationen weisen quantitative Unterschiede zwischen den getesteten Materialien auf. CD68⁺CD172⁻CD161^{hi} Zellen weisen einen vergleichbaren Verlauf zwischen den Materialien (Abb. 6 B). Der Expressionspeak der CD68⁺CD172⁻CD161^{hi} Zellen in den Kapseln aller getesteter Materialien am Tag 14 und 28 ähnelt dem, der INF- γ exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5 A und B). Wie schon bei den Granulozyten (neutrophile, basophile) beobachtet, tritt die Infiltration der CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} Zellen subkutan früher auf als intramuskulär. Die Population zeigt in der WE43-Kapsel einen signifikanten Expressionspeak subkutan bereits am Tag 1, wohingegen intramuskulär es erst am Tag 7 auftritt (Abb. 6 B). Das gleiche kann man auch in der BG-Kapsel beobachten, mit einem Peak subkutan am Tag 3 und intramuskulär am Tag 7. In der RM-F-Kapsel subkutan sind die prozentuellen Anteile der CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} Population von Tag 7 bis Tag 21 signifikant größer als in der BG-Kapsel. Am Tag 7 und 14 sind diese auch gegenüber der BG-Si-Kapseln signifikant. Gegenüber WE43 tritt lediglich am Tag 7 eine signifikante Differenz in der subkutanen Lokalisation auf. Intramuskulär dominiert die CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} Population in der WE43 Kapsel über BG und RM-F am Tag 3 und BG-Si und BG am Tag 7. Am Tag 14 intramuskulär übernimmt die RM-F Kapsel die dominierende Rolle gegenüber der Kapseln mit beschichteten Implantaten. Von Tag 1 bis Tag 7 treten signifikant weniger CD68⁺CD172^{low}CD161^{hi} Zellen in der RM-F-Kapsel in beiden Lokalisationen auf. Im Vergleich zu WE43 ist der prozentuelle Anteil am Tag 1 und 3 subkutan und am Tag 1 und 7 intramuskulär geringer. Verglichen mit BG tritt der Unterschied am Tag 3 und 7 subkutan, sowie am Tag 3 intramuskulär auf. Gegenüber BG-Si ist der Unterschied am Tag 7 in beiden Lokalisationen besonders hoch signifikant. Das gleiche versetzte Muster wie bei der CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} Population kann man auch bei den CD68⁺CD172^{low}CD161⁻ Zellen beobachten. Subkutan treten signifikant mehr CD68⁺CD172^{low}CD161⁻ Zellen in der WE43 Kapsel im Vergleich zu allen anderen Materialkapseln am Tag 3 auf und intramuskulär am Tag 7 (Abb. 6 B). Am Tag 28 steigen die CD68⁺CD172^{low}CD161⁻ Zellen in der RM-F Kapsel in beiden Lokalisationen signifikant an.

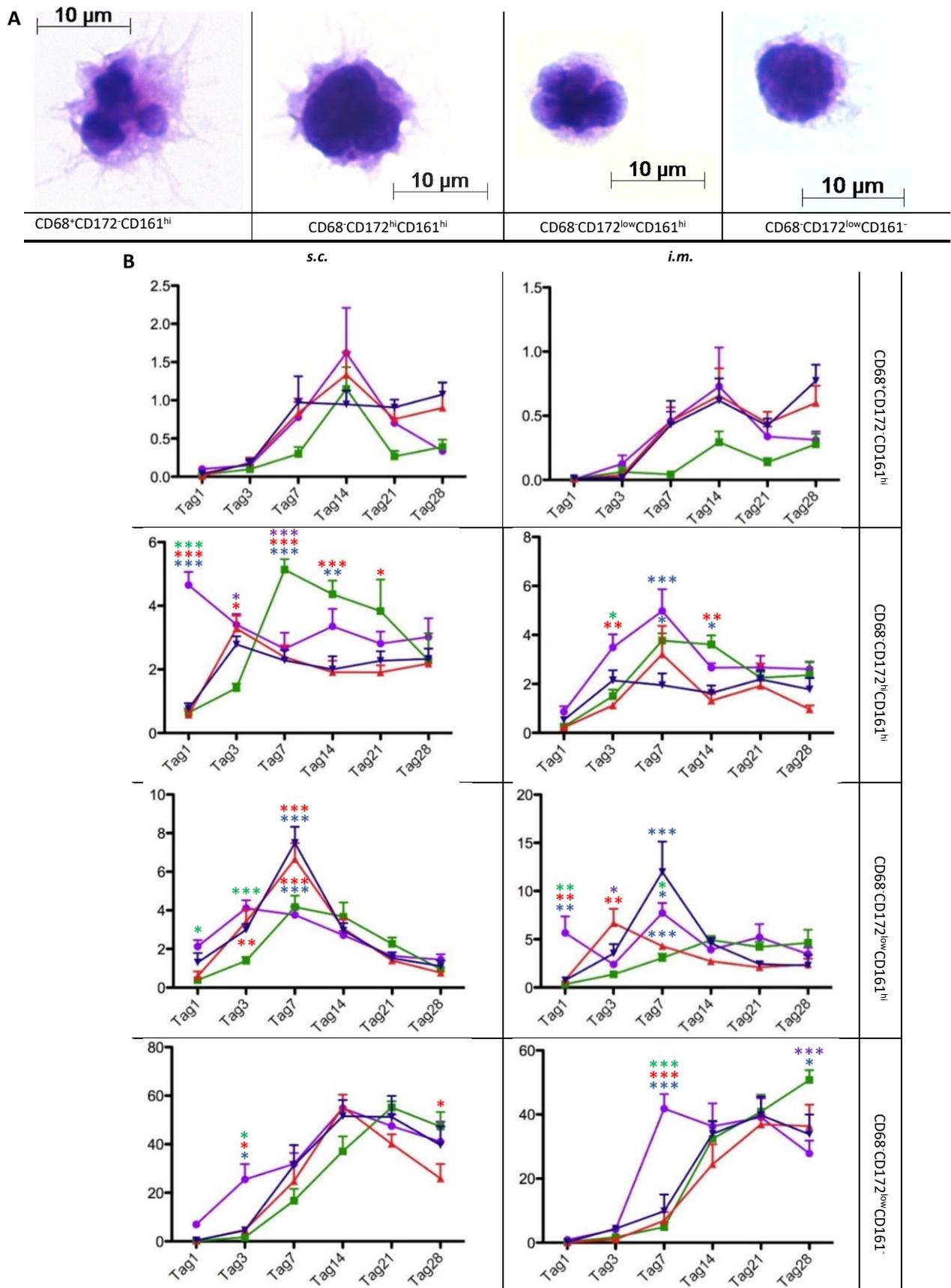


Abb. 6: Kinetik dendritischer Zellen im experimentellen Verlauf von 28 Tagen und Morphologie der beteiligten DCs. (A) Vier mittels FACS sortierte und mit Diff-Quick gefärbte Populationen dendritischer Zellen (100x). (B) Mittelwerte (%Gated) von CD68⁺CD172⁻CD161^{hi}, CD68⁻CD172^{hi}CD161^{hi}, CD68⁻CD172^{low}CD161^{hi} und CD68⁻CD172^{low}CD161⁻. Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

6.8 Siliziumdioxid in der Beschichtung zeigt Auswirkungen auf die Konzentration der Mastzellen in den Implantatgewebekapseln

In allen Kapseln der getesteten Materialien wurden Mastzellen detektiert. Das zytotoxisch wirkende RM-F zeigt im Vergleich zu den anderen Materialien eine reduzierte Menge der Population in beiden Lokalisationen (Abb. 7). Am Tag 7 gibt es signifikante Unterschiede zwischen RM-F und WE43 subkutan. Die BG-Si Kapsel zeigt signifikant erhöhte Mengen der Mastzellen am Tag 28 in der gleichen Lokalisation. Auch intramuskulär konnten signifikant mehr Mastzellen in der BG-Si-Kapsel am Tag 28 detektiert werden im Vergleich zu WE43 und RM-F Kapseln. In beiden Lokalisationen ist die Tendenz bei Siliziumdioxid enthaltenen Proben steigend.

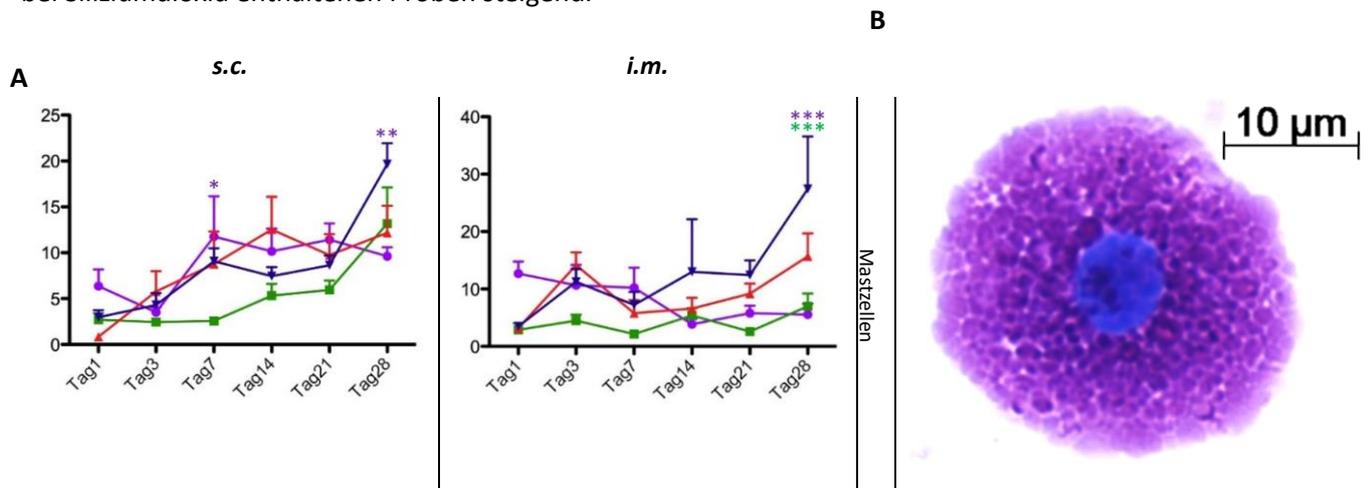


Abb. 7: Mastzellen im 28-Tages-Verlauf. (A) Mittelwerte (%Gated) von Mastzellen (links) subkutan (rechts) intramuskulär. (B) 100x Vergrößerung einer gesorteten Mastzelle (nach 5.10). Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant) *.

6.9 Dominanz der Kontrollkapsel RM-F in der Größe und Menge der CD45⁺ Leukozyten

Die Gewebekapsel, die um das Referenzmaterial entstanden ist, weist signifikant mehr CD45⁺ Leukozyten, als die Kapseln der anderen Materialien (WE43, BG und BG-Si) in beiden Lokalisationen ab Tag 14 auf (Abb. 8 A). Zusätzlich kann man Unterschiede am Tag 7 im Vergleich zu den beschichteten Materialien (BG und BG-Si) und am Tag 1 zu WE43 im subkutanen Bereich, sowie am Tag 7 zu WE43 und BG-Si intramuskulär beobachten. Die Referenzmaterialgewebekapsel zeigt relativ konstante Mengen der CD45⁺ Zellen über alle 28 Tage. Die restlichen Materialien (WE43, BG, BG-Si) zeigen einen Abstieg von knapp 100% am Tag 1 auf ca. 40% im subkutanen Bereich und ca. 60% intramuskulär. Das Gewicht der Kapsel vom Referenzmaterial zeigt einen signifikanten Anstieg am Tag 3 und 7 verglichen mit WE43, BG und BG-Si, sowie zusätzlich am Tag 1 im Vergleich zu WE43 und BG im subkutanen Bereich (Abb. 8 B). Intramuskulär ist der Gewichtsunterschied am Tag 3 zwischen RM-F und den

anderen Materialien detektierbar, sowie am Tag 7 verglichen mit BG. Die Zellzahlen in der Kapsel korrelieren mit den Kapselgewichten. Sie steigen bis auf 16 Mio. Zellen am Tag 3 in beiden Lokalisationen an, fallen dann auf ca. 5 Mio. Zellen zum Tag 14 und bleiben auf diesem Level. Der Verlauf ist intramuskulär ähnlich (Anhang Abb. 20).

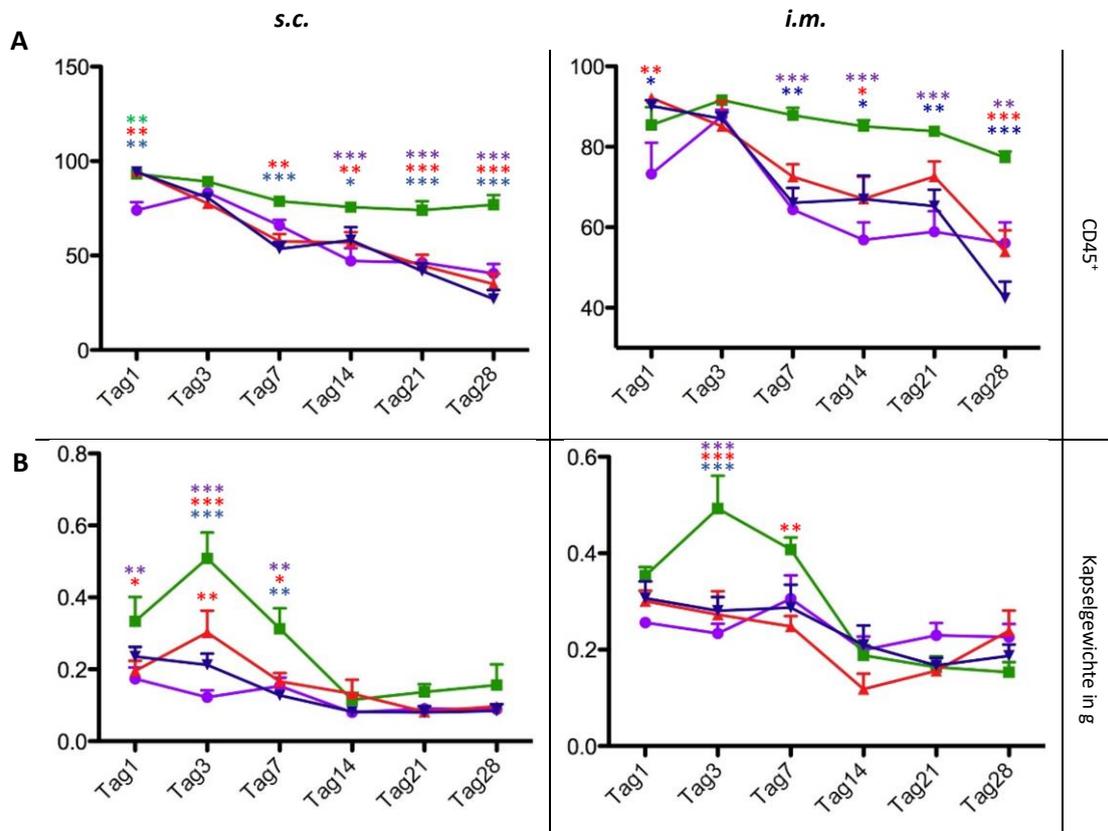


Abb. 8: Definition der Gewebekapseln anhand der Leukozytenzahl ($CD45^+$ Zellen) und der Kapselgewichte s.c. und i.m. im Verlauf von 28 Tagen. (A) Durchflusszytometrisch erhobene % Anteile der $CD45^+$ Leukozyten in Kapseln von RM-F, WE43, BG und BG-Si im intramuskulären Bereich und subkutan. (B) Kapselgewichte subkutan und intramuskulär in [g]. Legende: \bullet WE43 \blacksquare RM-F \blacktriangle BG \blacktriangledown BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

Die histologische Untersuchung von den Gewebekapseln (Abb. 9 B und C) der getesteten Materialien: WE43, RM-F, BG und BG-Si (bearbeitet nach 5.11) hat die makroskopisch ermittelten Daten bestätigt. Im subkutanen Bereich haben sich deutlich dickere Gewebekapseln um das Positivmaterial RM-F im Vergleich zu WE43, BG und BG-Si Kapseln gebildet (Abb. 9 A). Am Tag 7 ist der Unterschied mit ca. 200 μm am höchsten. Im intramuskulären Bereich fällt der Fokus auf die durchgängig deutlich dünnere WE43 Kapsel im Vergleich zu den anderen Materialien. Auch hier ist die größte Differenz am Tag 7 zu verzeichnen.

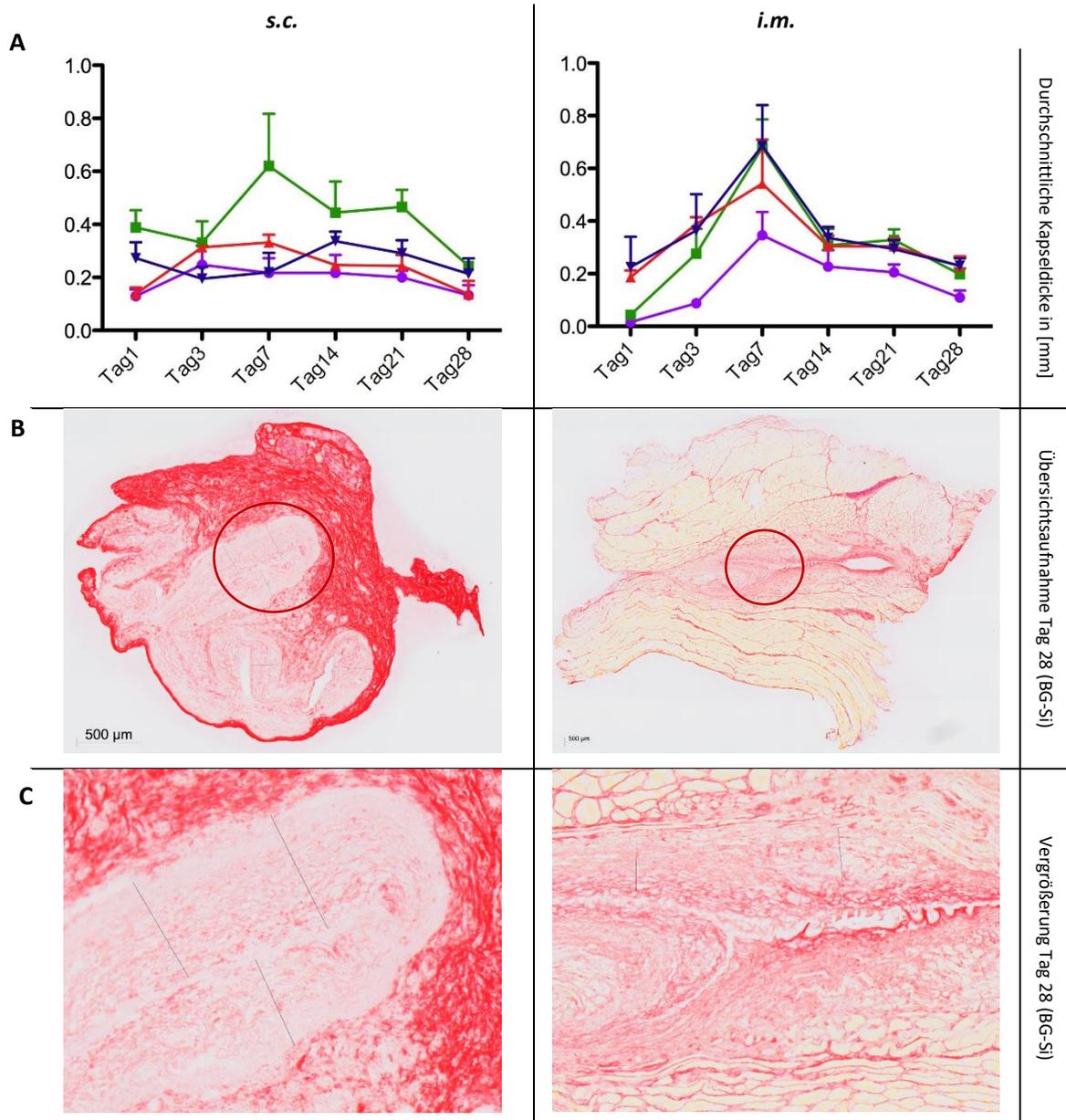


Abb. 9: Durchschnittliche Kapseldicke in [mm] und histologische Schnitte einer BG-Si Gewebekapsel vom Tag 28 aus beiden Lokalisationen mit 10x Vergrößerung aufgenommen. (A) Vergleich der Gewebekapseln von WE43, RM-F, BG und BG-Si über den Zeitraum von 28 Tagen (n=3). Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant) *. (B) Übersichtsaufnahme und Vergrößerung histologischer Schnitte von subkutanen und intramuskulären Gewebekapseln gefärbt mit SiriusRed (nach 5.11).

6.10 Die eruierte Fremdkörperreaktion wird nicht von einer bakteriellen Kontamination induziert und variiert

Eine bakterielle Kontamination des periimplantären Bereichs und damit die Abwandlung der Fremdkörperreaktion in eine Abwehrreaktion gegen eingedrungene Erreger konnte mittels einer quantitativen Real-Time PCR ausgeschlossen werden. Die entnommenen Proben des implantatnahen Bereichs wurden in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit *E. coli*-Kolonien kontaminiert und als Positivkontrolle geführt. Die andere Hälfte fungierte als eine saubere (sterile) Probe. Stichprobenartig wurden 3-4 Proben von jeder Standzeit und Material ausgewertet. Beide Lokalisationen wurden untersucht. Die relative Expression der bakterieller mRNA in sauberen Proben ist signifikant niedriger als in der mitgeführten Positivkontrolle (Abb. 10). Zum Vergleich der relativen Expression der bakteriellen mRNA in sauberen und kontaminierten Proben wurde ein ungepaarter zweiseitiger T-Test verwendet.

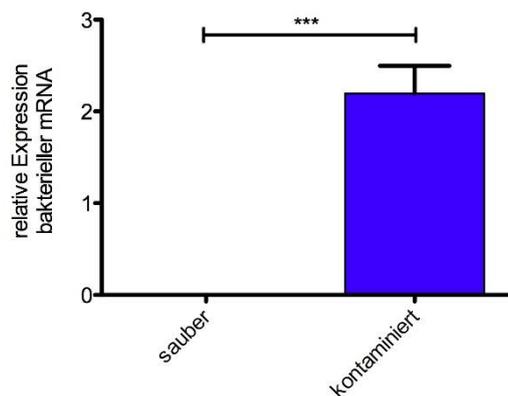


Abb. 10: Relative Expression bakterieller mRNA in sauberen (n=90) und mit *E. coli* kontaminierten Proben. Aufgearbeitet nach 5.13. <math><0,001</math> sehr gut gesichert (extrem signifikant) ***.

6.11 Verwendete Bioglasbeschichtungen induzieren keinen Korrosionsschutz des WE43 Kerns

Die getesteten Bioglasbeschichtungen BG und BG mit Siliziumdioxid üben keinen signifikanten Einfluss auf die Korrosionsgeschwindigkeit der Implantate aus. Im zeitlichen Verlauf in der *in vivo* Testung wird ersichtlich, dass die Korrosionsgeschwindigkeit am Tag 1 bei allen 3 getesteten Materialien am stärksten ist und kontinuierlich bis Tag 14 in beiden Lokalisationen abnimmt (Abb. 11 A). Ab Tag 14 erreicht es ein Plateauniveau und bleibt auf dem gleichen Level bis zum letzten Tag der Testung (Tag 28). Der Vergleich der Korrosionsgeschwindigkeit unterschiedlicher Materialien *in vitro* ergab einen signifikanten Unterschied in der Korrosionsgeschwindigkeit (mm/Jahr) zwischen BG und BG-Si, jedoch

nicht zu der unbeschichteten Legierung WE43 (Abb. 11 B), was darauf hinweist, dass die Beschichtungen die Korrosion von WE43 auch *in vitro* nicht reduzieren. Der Zusatz an Siliziumdioxid beschleunigt jedoch die Korrosion im Vergleich zu BG. Zudem ist die Korrosionsgeschwindigkeit *in vitro* nach 72 Stunden um ca. 1 mm größer als *in vivo*, wodurch mittels Bioreaktorkorrosionsversuchen nicht auf die Korrosionsgeschwindigkeit *in vivo* geschlossen werden kann.

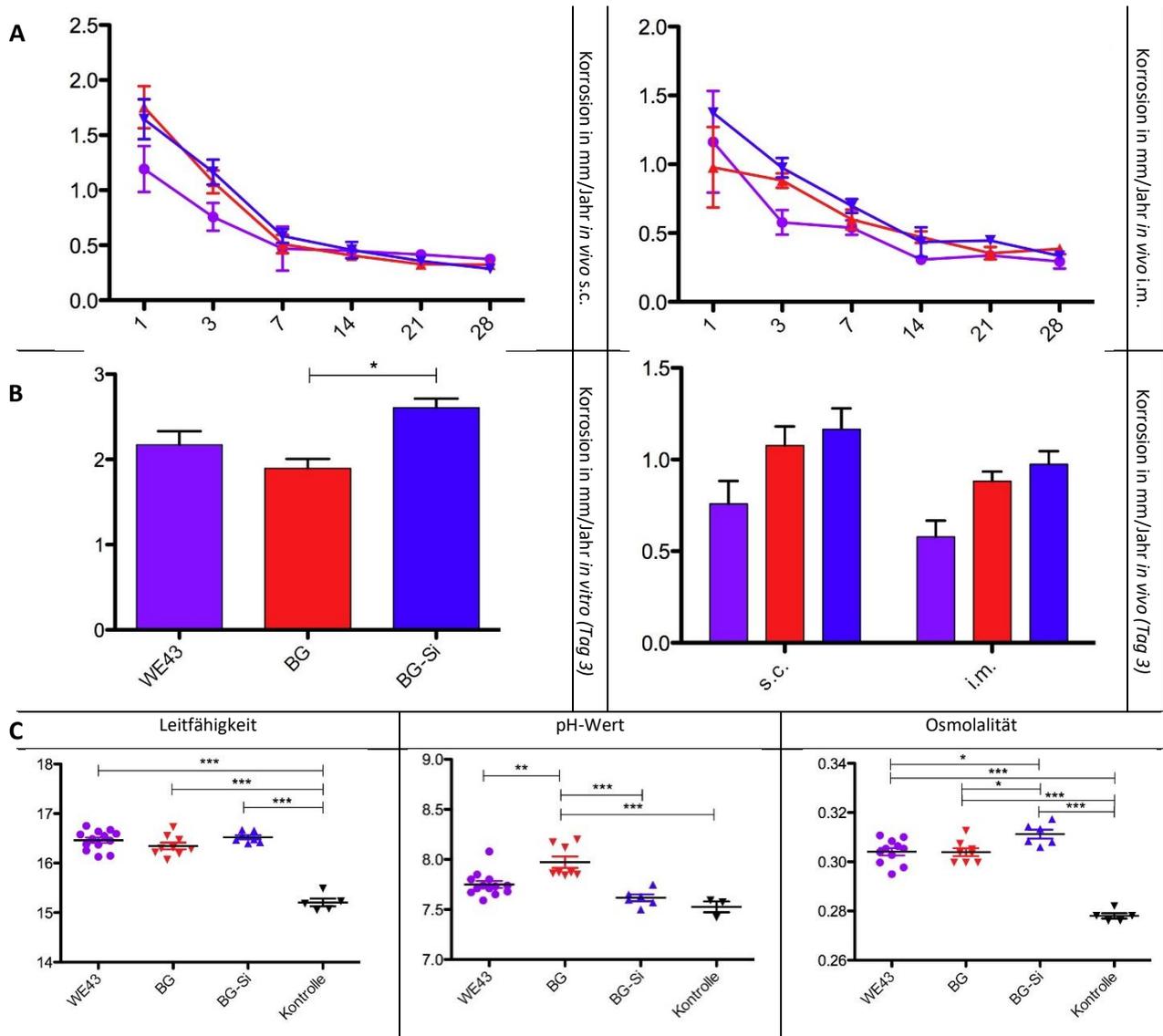


Abb. 11: *In vitro* und *in vivo* Korrosionsdaten in mm/Jahr (nach 5.12) mit den Werten der Leitfähigkeit, dem pH-Wert und der Osmolalität aus den Perfusionsversuchen. (A) Veränderung der Korrosionsgeschwindigkeit von WE43, BG und BG-Si im Verlauf von 28 Tagen subkutan (links) und intramuskulär (rechts). Legende: ● WE43 ▲ BG ▼ BG-Si. (B links) Unter Verwendung vom Bioreaktor eruierte Korrosionsdaten von WE43, BG und BG-Si nach 72h in PBS (Perfusionsgeschwindigkeit von 0,33 ml/min). (B rechts) Korrosionsdaten von Tag 3 aus dem *in vivo* Experiment. (C) Leitfähigkeit, pH-Wert und Osmolalität im Überstand nach einer 72h Inkubation der WE43, BG und BG-Si Proben in PBS *in vitro*. Als Kontrolle dient mitgeführtes reines PBS ohne Materialzusatz.

Die Untersuchung der physiologischen Parameter des Überstandes aus dem Bioreaktor-Perfusionsversuch *in vitro* ergaben eine vergleichbare Leitfähigkeit aller getesteten korrosionsfähigen Materialien (WE43, BG und BG-Si), wobei alle Proben einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS ohne Probe) zeigen (Abb. 11 C). Der pH-Wert im Überstand von BG-Proben zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu allen anderen getesteten Proben und Kontrolle (Abb. 11 C). Die pH-Werte der WE43 und BG-Si Überstände liegen hingegen auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Die Osmolalität zeigt eine der Korrosion *in vitro* ähnlichen Verlauf. Die Werte der Osmolalität in BG-Si Überständen sind signifikant höher als bei den restlichen Materialien und Kontrolle (Abb. 11 C). WE43 und BG zeigen lediglich im Vergleich zu der Kontrolle einen signifikanten Anstieg.

6.12 Von der Baseline (0-Wert) abweichende Verhältnisse der Leukozyten-Subpopulationen im Blut

Systemisch (im Blut) lassen sich zwischen den getesteten Materialien sowie gegenüber der Baseline (Blut von nicht operierten Tieren) abweichende Verhältnisse der Leukozyten-Subpopulationen feststellen. Allgemein ist eine 10% stärkere Präsenz der CD45⁺ Leukozyten im experimentellen Verlauf von 28 Tagen erkennbar bei allen getesteten Materialien im Vergleich zu der Baseline (Anhang Abb. 23). Die Steigerung der CD8⁺ Zellen ist bei RMF-Tieren am stärksten ausgeprägt (Abb. 12 B). Von Tag 1 bis Tag 21 gibt es einen ca. 15% Anstieg der Population. Am Tag 21 und 28 ist die Ausprägung bei RMF-Tieren signifikant stärker als bei den WE43 enthaltenen Proben (beschichtet und unbeschichtet). Die CD4⁺ Zellen zeigen einen Anstieg von ca. 19% von Tag 1 bis Tag 28 (Anhang Abb. 23). Die NK-Zellen und NK-T-Zellen zeigen einen gleichmäßig einheitlichen Verlauf mit schwach signifikantem Anstieg der NK-T Zellen am Tag 21 und 28 und der NK-Zellen am Tag 28 in der BG-Si-Kapsel (Anhang Abb. 23), die sich jedoch im Rahmen der Baseline befinden. Die RT1b⁻CD161⁻ Monozyten zeigen einen ca. 10% Anstieg von Tag 1 bis Tag 28 in allen Materialien (Anhang Abb. 23). Alle Materialien zeigen Werte unterhalb der Baseline. RT1b⁻CD161⁺ Monozyten pendeln zwischen 10% und 20% über den gesamten experimentellen Verlauf von 28 Tagen (Abb. 12 B). RM-F zeigt hier einen einmaligen signifikanten Anstieg auf ca. 35% am Tag 3 und fällt am Tag 7 wieder auf ca. 10%. Der prozentuelle Anteil der Population ist am Tag 1 gleich dem Baseline-Wert, anschließend steigt es in allen getesteten Kapseln an. Mit dem Anstieg der CD161⁺ Monozyten am Tag 3 tritt simultan eine signifikante einmalige Senkung der neutrophilen Granulozyten (Abb. 12 B) am selben Tag. Diese Abweichung ist auch gegenüber dem Blut der unbehandelten Tiere einmalig. Am Tag 7 folgt ein signifikanter Anstieg der CD4⁺ DCs bei RM-F und BG-Si-Tieren (Abb. 12 B). Diese Population liegt in allen getesteten Materialkapseln oberhalb der Baseline außer am Tag 1 und Tag 21 bei BG. Außerdem konnten signifikant stärkere B-Zellexpressionen

am Tag 14 im Blut der BG-Si Tiere und im Blut der WE43 Tiere am Tag 28 im Vergleich zu den anderen Materialien detektiert werden (Anhang Abb. 23). Die B-Zell-Werte der unbehandelten Tiere liegen auch hier überwiegend unterhalb der Blutwerte der behandelten Tiere.

A Populationen	CD8	CD4	RT1b	Granu.	CD172	CD161	CD3	CD45Ra
RT1b ⁻ CD161 ⁺ Monozyten	-	-	-	hi	hi	-/low	-	-
CD8 ⁺ Zellen	hi	-	-	-	-	-	+	-
CD4 ⁺ DCs	-	+	-	hi	hi	low	-	-
Neutrophile Granulozyten	-	-	+/-	+	low	-	-	-

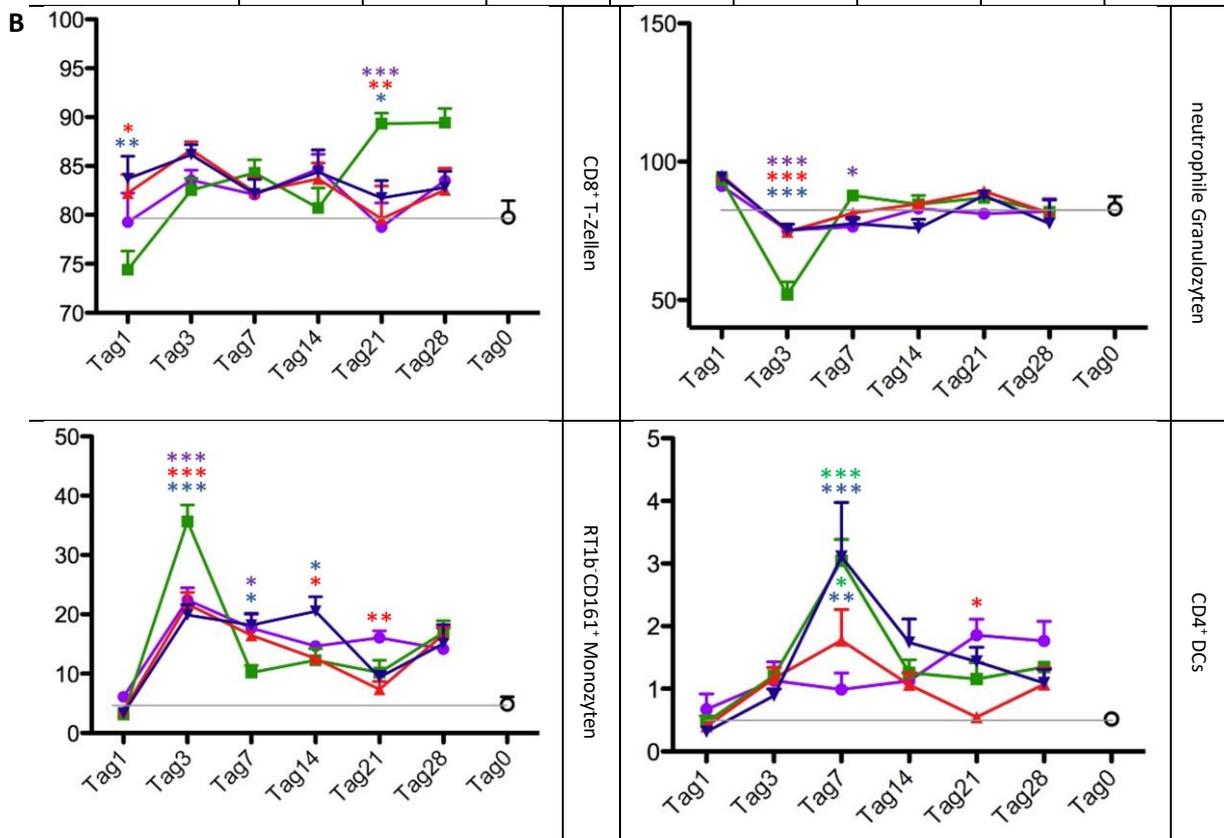


Abb. 12: Charakterisierung der Ausreißerleukozyten im Blut anhand der Oberflächenmarker-Expressionsprofil. (A) Blutleukozyten mit Oberflächenmarker-Expressionsprofil. (B) Kinetik der CD8⁺T-Zellen, neutrophiler Granulozyten, RT1b⁻CD161⁺ Monozyten, CD4⁺DCs im Blut von WE43, RM-F, BG und BG-Si-Tieren. Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

6.13 Makroskopische Merkmale zur Feststellung der Biokompatibilität der Materialien

Der Grad der makroskopisch sichtbaren Veränderungen wie Einblutung, Ödematisierung, Schwellung, Vaskularisierung und H₂-Emphysem im implantatnahen Bereich ist zwischen den Materialien vergleichbar (Abb. 13 A). Bedingt durch den operativen Eingriff kommt es von Tag 1 bis Tag 3 zur Ödematisierung des Gewebes in beiden Lokalisationen. Dies geht mit einer stärkeren Einblutung des periimplantären Bereichs von Tag 1 bis Tag 7 einher, wobei der Peak der Ausprägung subkutan am Tag 3 und intramuskulär am Tag 1 ist, bedingt durch den stärkeren mechanischen Eingriff in dieser Lokalisation (Abb. 13 A). Die lokale Schwellung entspricht temporal dem Auftreten der Einblutung (höchste Ausprägung an den Tagen 1-7) (Abb. 13 A) und ist einerseits durch die Ödematisierung und andererseits durch die Wasserstoffgasbildung (H₂) zu erklären. Im subkutanen Bereich nimmt die Schwellung am Tag 21 leicht zu. Dies korreliert stark mit dem Auftreten der Emphyseme, die subkutan am Tag 3 und 7 die höchste Ausprägung aufweisen und anschließend bis Tag 28 abnehmen (Abb. 13 A). Im intramuskulären Bereich hingegen konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Merkmalsausprägung detektiert werden mit einem Peak am Tag 7. Die Vaskularisierung der Kapsel moduliert die Immunantwort im höchsten Maße durch den verkürzten Migrationsweg der Immunzellen durch das Endothel zum Inflammationsherd. Am stärksten war diese am Tag 3 in beiden Lokalisationen bei allen Materialien ausgeprägt mit einer folgenden Abnahme zu den späteren Zeitpunkten (Abb. 13 A und B). Die postoperative Gewichtskontrolle der Tiere ergab eine Reduktion des Gewichtes am Tag 7 bei Tieren mit WE43, BG und RMF Implantaten (Abb. 13 A). Das Gewicht der BG-Si Tiere sank bereits am Tag 3 auf das niedrigste Niveau. Zum Tag 21 nahmen alle Tiere wieder zu und erreichten annähernd ihr Ursprungsgewicht. BG-Tiere blieben auf dem gleichen Niveau bis Tag 28. BG-Si Tiere zeigten eine Gewichtszunahme um ca. 10 g und WE43 um fast 20 g. RM-F Tiere hingegen nahmen im Durchschnitt 10 g zum letzten experimentellen Tag (Tag 28) ab. So hatte die Implantation neben lokalen Gewebsveränderungen auch physiologische Auswirkungen auf den ganzen Organismus. Exemplarisch für einen frühen und späten Zeitpunkt sind Kapseln von allen getesteten Materialien und beiden Lokalisationen vom Tag 3 und 28 in der Abb. 13 dargestellt.

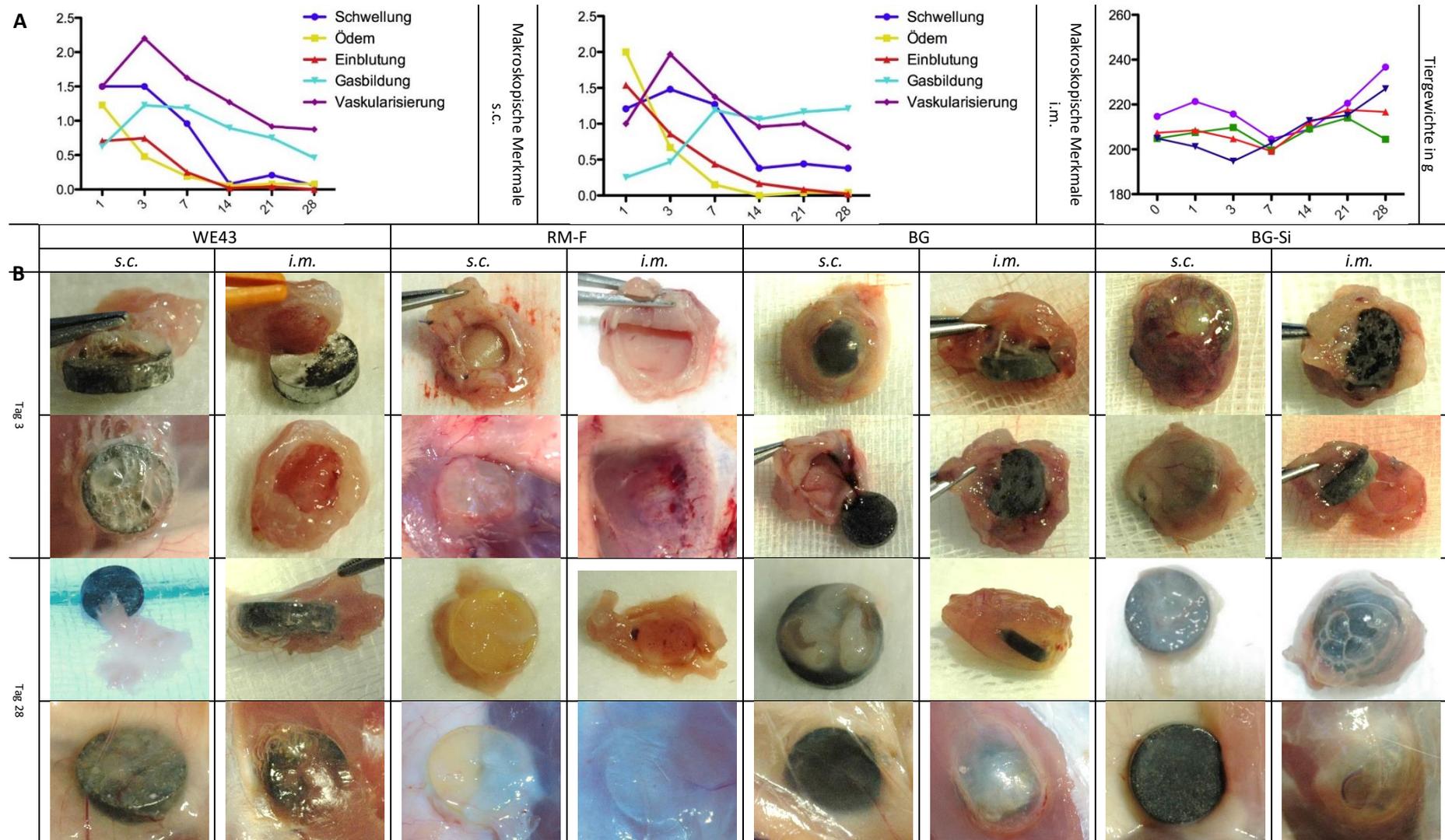


Abb. 13: Periimplantäre makroskopische Entzündungsmerkmale mit der Analyse der Tiergewichte im Verlauf von 28 Tagen. (A) Ausprägung der makroskopischen Merkmale: Schwellung, Ödematisierung, Einblutung, Gasbildung, Vaskularisierung und Veränderung der Tiergewichte. (B) sowie Kapselabbildungen am Tag 3 und 28 von WE43, RM-F, BG und BG-Si Tieren in beiden Lokalisationen (pro Lokalisation, Material und Zeitpunkt sind jeweils 2 Bilder dargestellt). Legende für die Tiergewichte: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si.

Weitere makroskopische Merkmale wie periprothetische Flüssigkeitsansammlung und Anhaftung der Gewebekapsel zeigten Unterschiede zwischen den getesteten Materialien. Stark signifikante Unterschiede bei der Flüssigkeitsansammlung in der Kapsel im subkutanen Bereich konnte man zwischen RM-F und BG, sowie BG-Si am Tag 1 detektieren (Abb. 14 A). Am Tag 3 zeigte die WE43 Kapsel signifikant weniger Exsudat als die BG-Si-Kapsel. Ab Tag 7 nahm die Flüssigkeit in den Kapseln aller Materialien ab. Intramuskulär konnte in der BG-Si-Kapsel am Tag 3 signifikant mehr Flüssigkeit als in der RM-F-Kapsel detektiert werden (Abb. 14 A). Am Tag 7 ergaben sich signifikante Unterschiede in der Menge der Flüssigkeit zwischen WE43 und allen anderen Materialien. Der Expressionsunterschied zwischen WE43 und RM-F blieb bis Tag 14 erhalten. Zudem kamen signifikante Differenzen zwischen RM-F und BG-Si am gleichen Tag (Tag 14) hinzu. Die Anhaftung der Gewebekapsel an das Implantat konnte überwiegend bei WE43 enthaltenen Materialien beobachtet werden (Abb. 14 B). Am Tag 3 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen BG und RM-F in beiden Lokalisationen. Intramuskulär wurden signifikante Unterschiede zwischen RMF, BG-Si und WE43, sowie zwischen WE43 und BG-Si und zwischen BG und BG-Si am gleichen Tag (Tag 3) detektiert. Am Tag 28 wurde ein signifikanter Anstieg der Anhaftung bei der WE43 Kapsel verglichen mit RM-F, BG und BG-Si subkutan sowie BG und BG-Si intramuskulär detektiert. Fibrin, ein deutliches Signal einer Fremdkörperreaktion, trat signifikant stärker in RM-F Kapseln im Vergleich zu den anderen Materialien in beiden Lokalisation auf (Abb. 14 C). In den WE43-Kapseln konnte kein Fibrin in beiden Lokalisationen detektiert werden. Am Tag 3 ist die Ausprägung des Merkmals in den Kapseln am stärksten gewesen, mit signifikanten Unterschieden zwischen WE43, RMF und BG, sowie zwischen RMF und BG-Si subkutan. Zudem gab es Unterschiede zwischen WE43 im Vergleich zu RM-F und den beiden beschichteten Materialien, sowie RM-F und BG-Si im intramuskulären Bereich am selben Tag (Tag 3). Zusätzlich zeigten RM-F Kapseln bereits am Tag 1 signifikant mehr Fibrin als alle magnesiumenthaltenden Proben. Ein weiteres makroskopisch detektierbares Unterscheidungsmerkmal ist das Verwachsen der Kapsel mit umgebendem Gewebe und Schorfbildung über dem eingesetzten Implantat. Diese beiden Merkmale zeigten einen korrelierten Verlauf in den Referenztieren (Abb. 14 D und E). Bis Tag 7 stiegen beide Merkmale am stärksten an, mit signifikant stärkerem Verwachsen der RM-F Kapsel mit dem umgebenden Gewebe bereits am Tag 1, sowie Tag 7 im Vergleich zu den anderen Materialien in der subkutanen Lokalisation. Zusätzlich ist die Ausprägung des Merkmals in den Referenzkapseln am Tag 14 stärker als in der BG-Kapsel. WE43 Kapseln zeigten ein signifikant geringeres Verwachsen mit der Umgebung verglichen mit den Kapseln von BG und BG-Si am Tag 1 und 21 (nur BG-Si). Am Tag 1 ist das Verwachsen der BG-Si Kapseln signifikant stärker als bei BG-Kapseln. Die Schorfbildung konnte man lediglich bei den Referenztieren beobachten (Abb. 14 F). Beide Merkmale waren nur im subkutanen Bereich detektierbar. Im Bereich der Schorfbildung konnte verstärktes Fellwachstum beobachtet werden, sowie eine starke Vaskularisierung des Bereichs (Abb. 14 F).

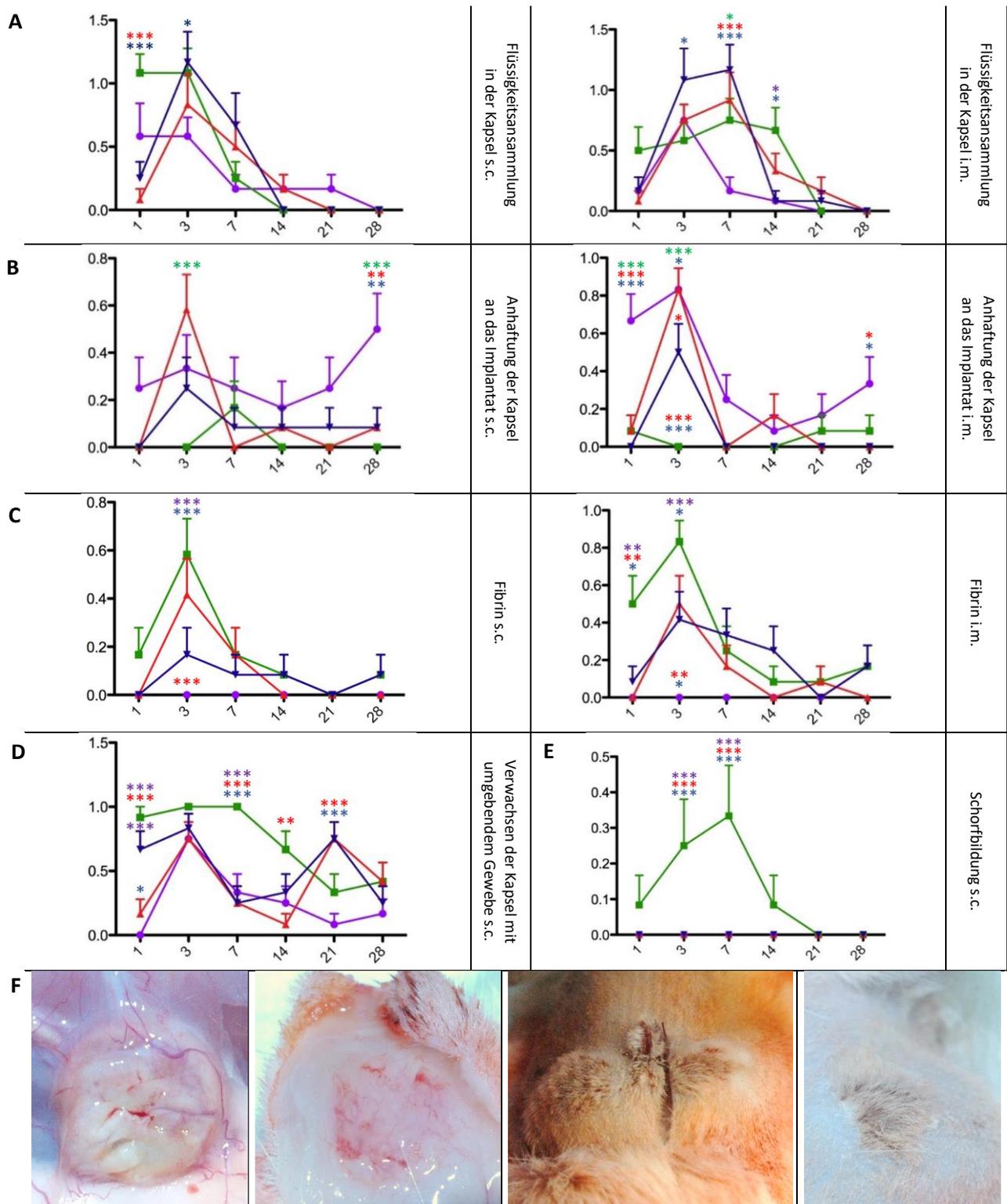


Abb. 14: Mittlere periprothetische Exsudatmenge, Anhaftung der Gewebskapsel am Implantat, Fibrinausbildung, sowie Verwachsen der Kapsel mit dem umgebenden Gewebe und Schorfbildung im Verlauf von 28 Tagen. (A) Ausprägung der Flüssigkeitsansammlung in der Kapsel subkutan und intramuskulär. (B) Ausprägung der Haftung der Gewebskapsel am Implantat in der subkutanen und intramuskulären Lokalisation. (C) Fibrinausbildung subkutan und intramuskulär. (D) Verwachsen der Kapsel mit periimplantärem Gewebe subkutan. (E) Schorfbildung subkutan. (F) Exemplarische Darstellung der Gewebskapsel und des periimplantären Bereichs eines Tieres mit Schorfbildung und verstärktem Fellwachstum (RM-F 3Tage s.c.). Legende: ◆ WE33 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si, 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

6.14 Rillen- vs. Granulatopographie/ Zeitabhängige Effekte

Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der verwendeten Materialien vor der Implantation zeigte Unterschiede in der Oberflächenstruktur der Implantate. Die geschliffenen unbeschichteten WE43 Implantate zeigen eindeutige parallelverlaufende Rillmusterung auf der Oberfläche (Abb. 15). Bei den mit Bioglas beschichteten Implantaten kann die Rillenstruktur bedingt durch die gleiche Vorbehandlung (Schleifen) weiterhin erkannt werden jedoch in einer abgeschwächten Form (Abb. 15). Dabei sind die Rillen bei der BG-Beschichtung stärker ausgeprägt als bei der BG-Si Beschichtung. Neben den flacheren Rillen, wird die Oberfläche der beschichteten Implantate durch eine gleichmäßige Verteilung von Bioglaspartikeln auf der Oberfläche variiert. Das Positivmaterial RM-F zeigt eine körnige Struktur mit homogen verteilten Ausstülpungen und Vertiefungen (Abb. 15).

Die Implantation der Materialien für 3 Tage im subkutanen Bereich verändert die Oberfläche insofern, dass ursprünglich klar strukturierte Rillen der unbeschichteten WE43 Implantate von rundlichen sporadisch verteilten Ausstülpungen ergänzt werden (Abb. 16). Die beschichteten Implantate weisen nach der 3 tägigen Implantation eine stark reduzierte Zahl an Ausstülpungen (Abb. 16). Die Präzipitate zeigen einen vergrößerten Durchmesser bei BG-Si Implantaten. Von den 3 Materialien zeigt BG die geringste Zahl an Ausstülpungen. Alle WE43 enthaltenen Implantate weisen eine sehr ähnliche rissige Struktur auf. Die Rillmusterung ist weiterhin gut erkennbar bei allen Implantaten mit einer stärkeren Ausprägung bei WE43 und BG. Die körnige Struktur der RM-F Implantate wird durch die 3 tägige Implantation geebnet und wandelt sich in glatte wellenartige Muster um.

Die Implantation der Materialien für 28 Tage subkutan äußert sich in Reduktion der Zahl der Ausstülpungen auf der Oberfläche aller WE43 enthaltenen Implantate (Abb. 16). Der Durchmesser der Präzipitate verringert sich bei WE43 und BG-Si, steigt jedoch bei BG. Die Korngröße der Kristallite ist im Vergleich zu Tag 3 viel größer. Die Rillentextur ist weiterhin erkennbar bei allen WE43 enthaltenen Implantaten. Die Positivkontrolle RM-F weist eine noch flachere Wellenstruktur auf der Oberfläche auf (Abb. 16). In den tiefer gelegenen Bereichen kann man eine poröse Struktur erkennen.

Intramuskulär kann man weiterhin die rillige Struktur vom Schleifvorgang am 3. und am 28. Tag erkennen (Anhang Abb. 24). WE43 zeigt größere Ausstülpungen am 3. Tag nach der Implantation und nahezu keine am Tag 28. Dafür kann man vermehrt kleine und größere Vertiefungen auf der WE43 Oberfläche am Tag 28 beobachten. Die Präzipitate der BG und BG-Si Implantate behalten ihre sporadische Verteilung weiterhin und vergrößern ihren Umfang zweifach am Tag 28. Die Körnung der Kristallite ist durchwachsen und weist sowohl sehr große als auch feinere Kristallite auf, wobei die Korngrenzen bei BG und BG-Si Implantaten am Tag 28 weitgehend verbleichen. Auf der Oberfläche der RM-F Implantate am Tag 3 kann man, wenn auch abgeschwächt, noch deutlich die ursprüngliche Körnung erkennen. Die Oberfläche zeigt

eine gleichmäßige Musterung. Am Tag 28 ist von der Granulation nichts mehr erkennbar. Die Oberfläche ist glatt mit örtlichen Rissen und rundlichen Vertiefungen.

Die Entfernung der Korrosionsprodukte von der Oberfläche der 3 Tages Implantate mit Chrom (VI)-oxid-Lösung (20%) (s.c.) brachte eine gleichmäßige Flächenkorrosion der WE43 Implantate hervor, mit übergreifenden, weich verlaufenden Vertiefungen und Erhebungen (Abb. 17). Die Korrosion der BG-Si und BG Implantate hingegen ähnelt einer Lochkorrosion mit Elementen einer Muldenkorrosion, wobei BG-Si scharfe Kanten und abrupte Vertiefungen jedoch mit einer gleichmäßigen Struktur aufweist, BG hingegen unregelmäßige Korrosion mit tieferen und breiteren Kratern in ungleichmäßigen Abständen zeigt (Abb. 17). Alle WE43 enthaltenen Implantate weisen kreisförmige Stellen mit ursprünglich rillenförmigen Strukturen auf. Bei WE43 sind die Stellen am stärksten vertreten und besitzen einen größeren Durchmesser als bei BG und BG-Si- Implantaten. Intramuskulär sind die Korrosionsmerkmale sehr ähnlicher Natur, außer bei BG Implantaten, die auch eine gleichmäßigere Struktur aufweisen mit einzelnen größeren Vertiefungen (Anhang Abb. 25).

Am Tag 28 in der gleichen Lokalisation wird die Flächenkorrosion der WE43 Implantate deutlicher sichtbar, wobei sich wellenartige Verläufe mit einer sehr feinen Körnerstruktur ausbilden (Abb. 17). Daneben kann man auch Risse in der Oberfläche erkennen. Die BG und BG-Si Implantate verfeinern die Merkmale der Mulden-Lochkorrosion und zeigen eine gleichmäßige Struktur mit filigranen Vertiefungen und Ausstülpungen (Abb. 17). Die beschichteten Materialien weisen weiterhin einzelne Stellen mit der Schleifmusterung auf. Wie am Tag 3 ähneln sich die Proben der intramuskulären und der subkutanen Lokalisation am Tag 28 stark.

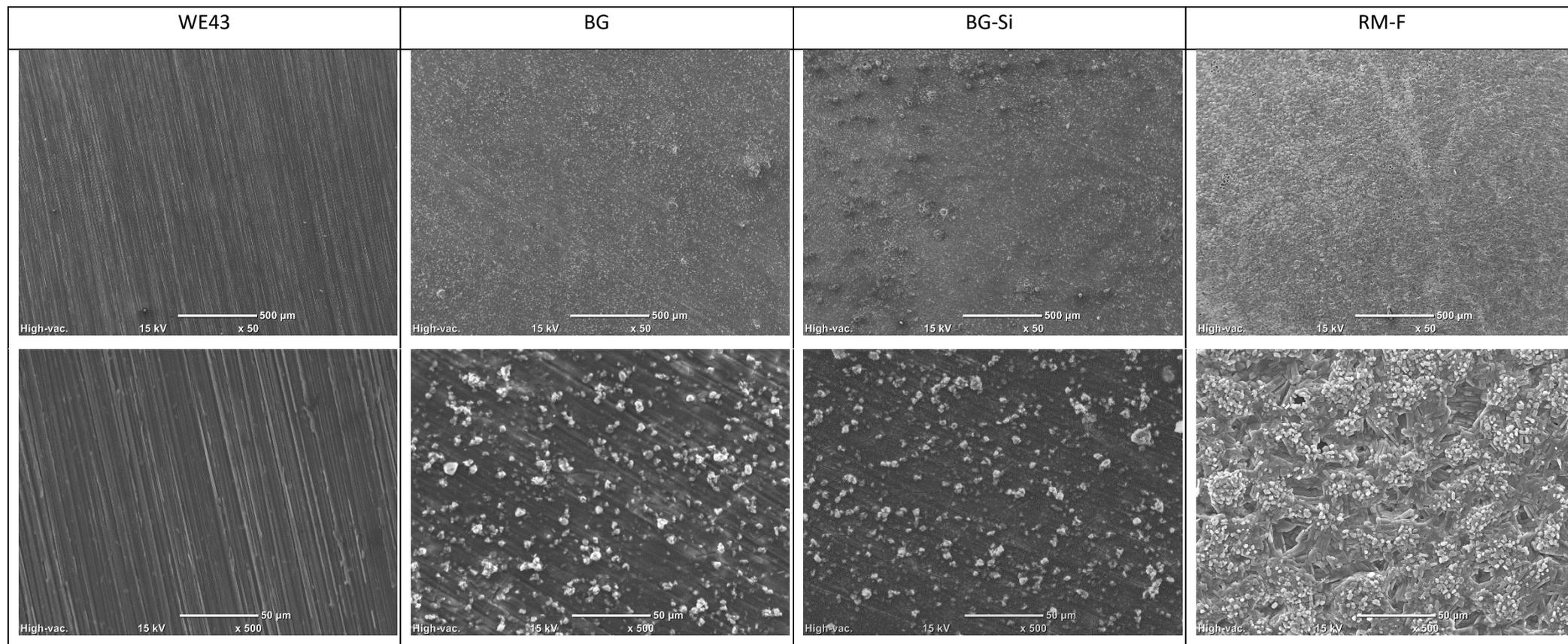
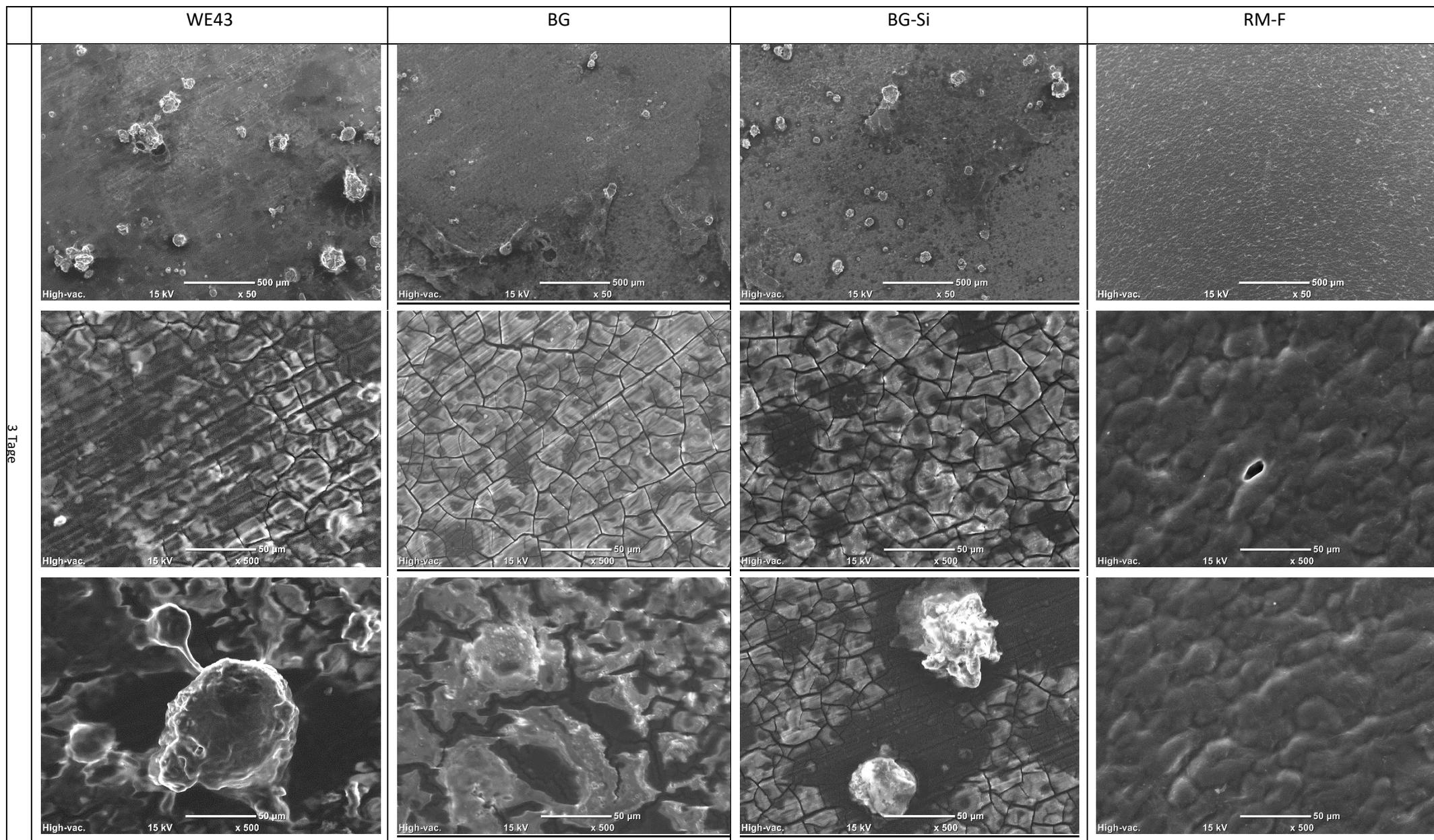


Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von WE43, RM-F, BG und BG-Si Implantaten vor der Implantation. Alle Materialien werden mit einer 50-fachen (oben) und einer 500-fachen (unten) Vergrößerung dargestellt.



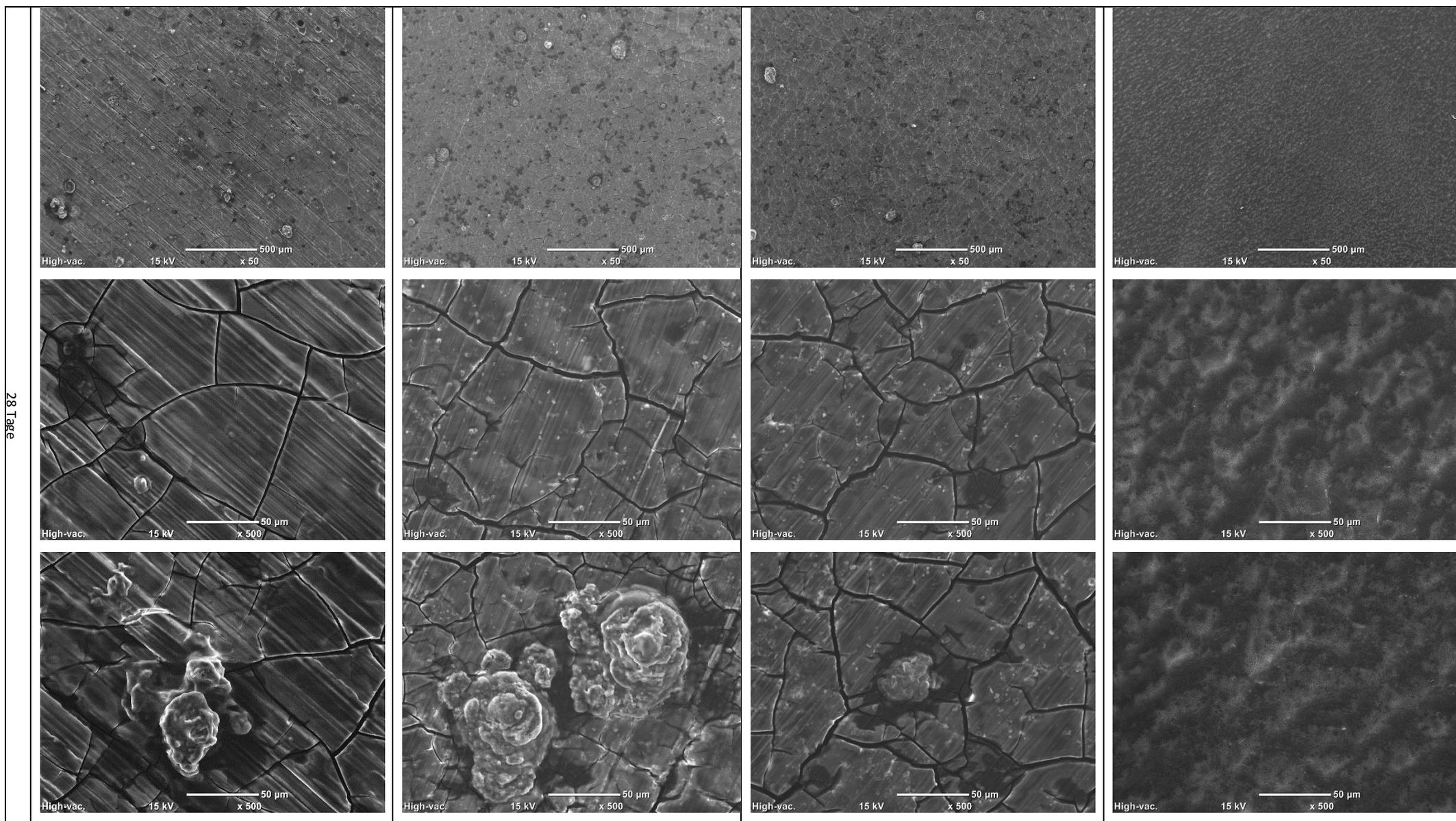
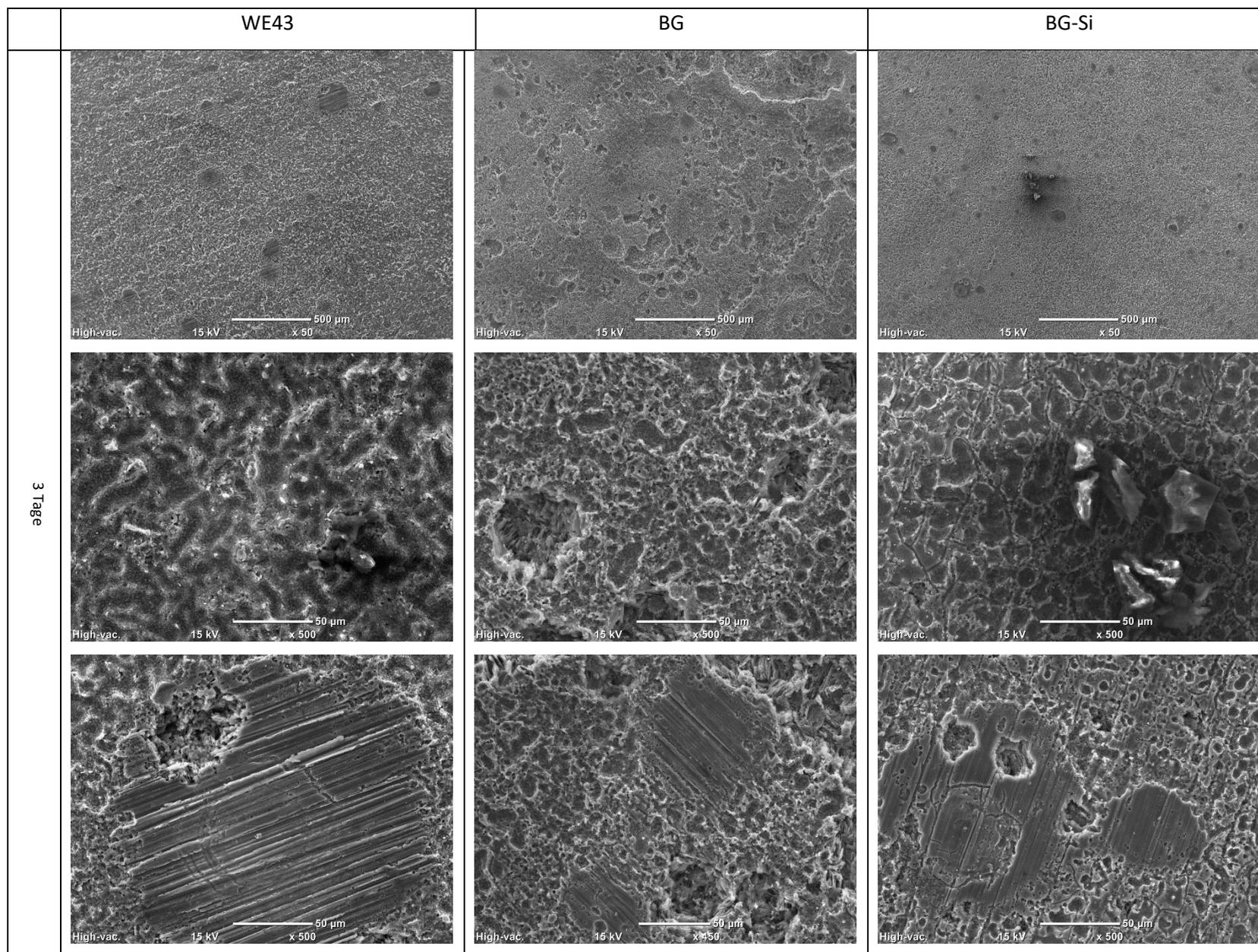


Abb. 16: Oberfläche der Implantate nach einer 3 und 28 Tages Implantation im subkutanen Bereich. Es sind jeweils eine Übersichtsaufnahme mit einer 50x Vergrößerung (oben) und zwei Detailaufnahmen (500x) dargestellt.



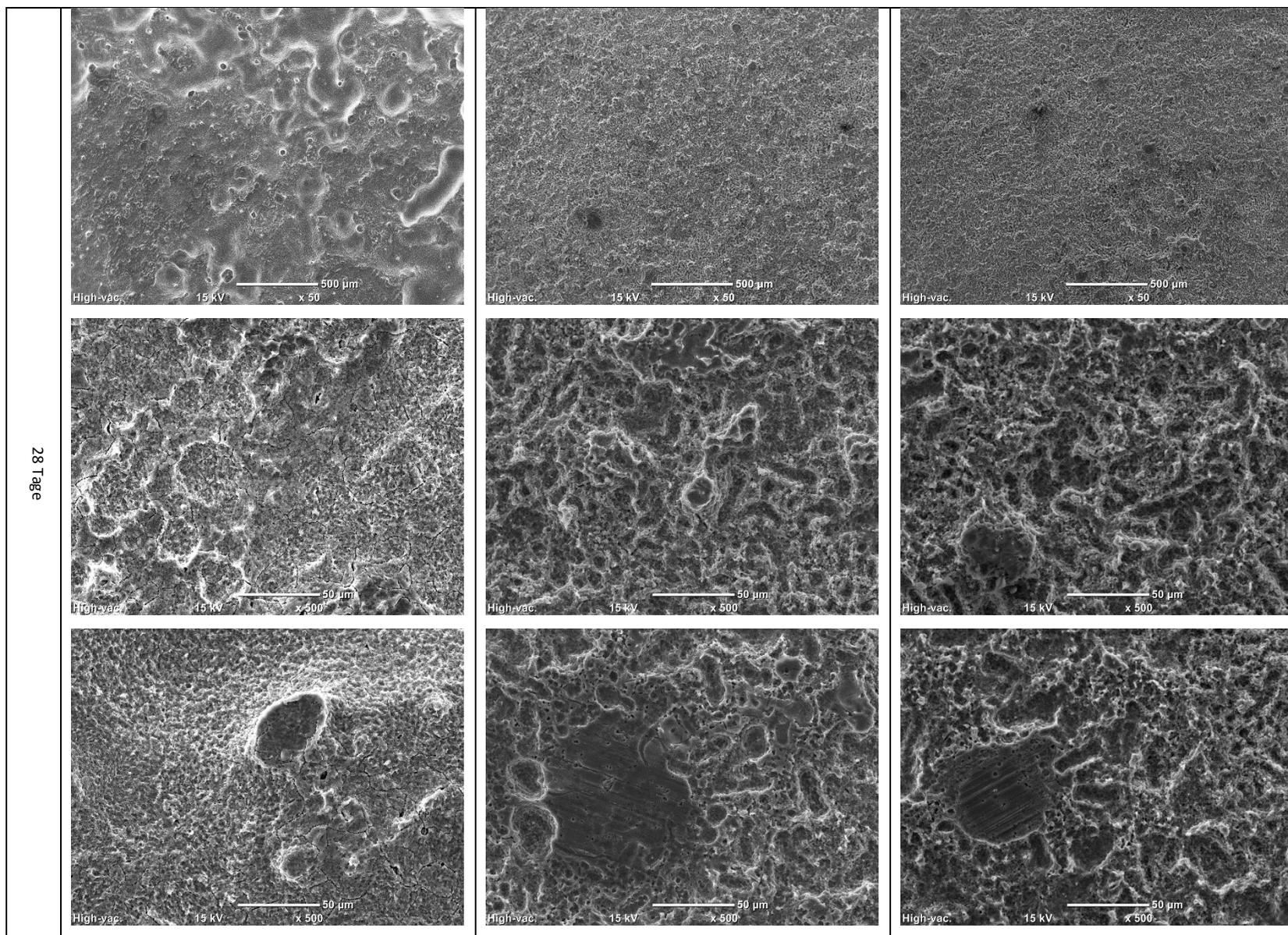


Abb. 17: Oberfläche der Implantate nach dem Entfernen der Korrosionsschicht mittels Chrom (VI)-oxid- Lösung in der subkutanen Lokalisation von Tag 3 und Tag 28. Eine 50x Übersichtsaufnahme (oben) und zwei 500x Vergrößerungen unten sind dargestellt.

7. Diskussion

7.1 Immunologische und histologische Auswirkungen der Materialien auf den Wirtsorganismus

Die Fremdkörperreaktion ist ein Zusammenspiel von vielen Immunzellen, deren Stoffwechselprodukten und regulatorischen Proteinen mit dem Ziel den Fremdkörper zu eliminieren oder zumindest vom umliegenden Gewebe zu isolieren. Makrophagen werden als Hauptakteure der Fremdkörperreaktion angesehen [22], da diese im Zuge der Implantation entstandenen Zellschrott, sowie die Degradationsprodukte des eingesetzten Materials abräumen, über Zell-Zell Interaktion und auf dem Weg der Zytokinsekretion die Immunantwort und das Zusammenspiel der beteiligten Zellen modulieren [109] und die Gewebsrekonstruktion, Heilung und Fibrose aktiv gestalten [39], [21]. Eine M1 geprägte persistente Immunantwort wird von proinflammatorischen Faktoren und Zellen begleitet und artet in eine überschüssige Immunreaktion aus, die nach Implantation zu einer Abstoßung des Materials führt. Eine M2 dominierte anhaltende Immunantwort resultiert in einer ausgeprägten Fibrinkapselausbildung und einer unumgänglichen Abstoßung des Implantats als Folge [21]. Eine erfolgreiche Implantation ohne Abstoßungsreaktion bedarf eines Ausgleichs des M1 und M2 Phänotyps mit Unterstützung seitens restlicher Leukozyten in der Regulation der Immunantwort [43], [110]. Um die immunologischen Prozesse während der Implantation besser zu verstehen, mit dem Ziel die Immunreaktion in eine biokompatible Richtung zu lenken, wurde eine breite Übersicht der beteiligten Immunzellen aufgestellt. Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit behandelt. Wie verändert sich das Differenzierungsverhalten der Makrophagen (M1/M2 Verhältnis) und Rekrutierungsverhalten der Granulozyten unter Einwirkung von WE43, Bioglas/Chitosan und Bioglas/Chitosan/Silizium enthaltener biodegradierbarer Implantate? Wie verhalten sich andere Leukozyten? Dabei sollten die von ZDEC-Implantaten (RM-F) erhobene Daten als Referenz einer starken Immunreaktion und von WE34-Implantaten als Referenz eines Mg-Implantates mit ungehinderter Korrosionskapazität dienen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede im Differenzierungsverhalten der M1 und M2 Makrophagen, sowie im Rekrutierungsverhalten anderer Leukozytenpopulationen zwischen den getesteten Materialien im Rahmen der vier wöchigen Implantation. Die Dominanz der M1 Makrophagen in der vorliegenden Studie resultierte in einer im Vergleich zu anderen Materialien dickeren Kapsel. Dies wurde von einem niedrigen Level an Eosinophilen, die dem Abbau von Fibrin potentiell beitragen sollten, begleitet. Histologische und makroskopische Merkmale bestätigten das proinflammatorische leukozytäre Bild. Hingegen eine Prävalenz der M2 Makrophagen (unabhängig der Art CD68⁺ und CD68⁻) führt zu keiner fibrösen Kapselausbildung (Abb. 18). Dies wurde mit einer erhöhten Menge eosinophiler Granulozyten und einer im Vergleich erhöhten Basophilenpräsenz begleitet. Das reduzierte Auftreten der potentiell

fibrosefördernden neutrophilen Granulozyten äußerte sich in einem makroskopisch nicht nachweisbaren Fibringehalt. Auch hier war das periimplantäre Gewebe entsprechend dem immunologischen Status ausgebildet. Die potentiell korrosionsprotektive Bioglasschicht mit und ohne Siliziumdioxidzusatz zeigte einen persistenten reduzierten M1 und M2 Profil mit einer erhöhten Neutrophilen- und Eosinophilenpräsenz und einer reduzierten Basophilen Mengen. Makroskopisch konnte ein intermediäres Erscheinungsbild mit verminderter fibröser Kapsel, einer erhöhten periprothetischen Exsudatmenge, einer reduzierten Implantat-Kapsel-Interaktion und einer gesteigerten Kapsel-Gewebe-Interaktion detektiert werden.

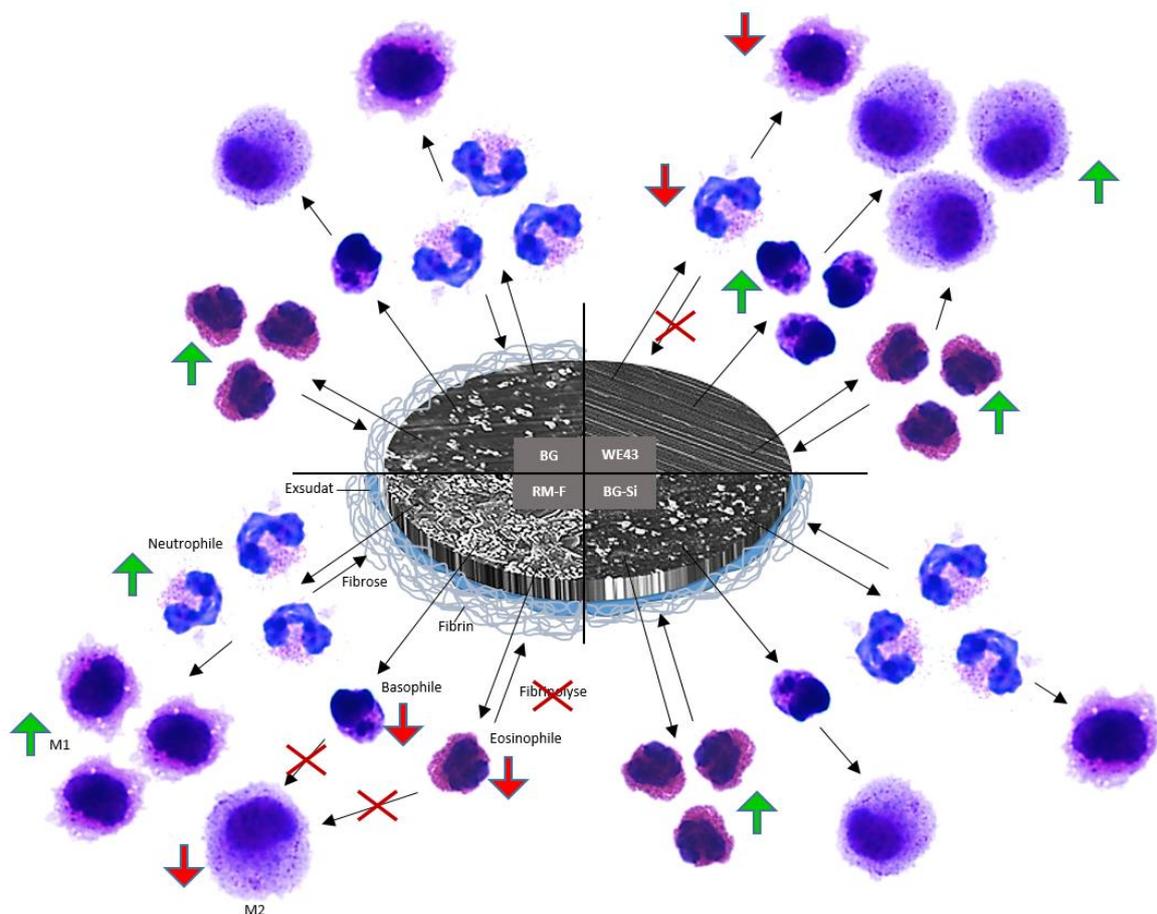


Abb. 18: Schematische Darstellung der Makrophagen/Granulozyten-Verhältnisse und resultierender Fibrinausbildung auf WE43, RM-F, BG und BG-Si Implantaten. Die Implantation der RM-F Discs resultierte in einer M1 dominierten Immunantwort mit reduzierter M2 Präsenz und einer Neutrophilendominanz der Granulozyten. Makroskopisch äußerte sich dies in einer starken Fibrinausbildung und Exsudat um das Implantat herum, was zu einer Isolierung und Versagen des Implantates führen kann. WE43 Implantate wurden von einer kontinuierlichen Zunahme der M2 Makrophagen begleitet mit einer Vielzahl an basophilen und eosinophilen Granulozyten. Weder eine Fibrinkapsel, noch exsudative Flüssigkeit konnten nachgewiesen werden. Beschichtete Implantate mit Bioglass/Chitosan und Bioglass/Chitosan/Siliziumdioxid zeigten reduzierte Mengen an M1 und M2 Makrophagen, sowie mit RM-F vergleichbare Neutrophilen- und Basophilenmengen, jedoch mit einer starken Eosinophilen Präsenz. Die Fibrinausbildung bei diesen Materialien war moderater Natur mit exsudativer Flüssigkeit bei BG-Si Proben.

Abgesehen von der signifikant unterschiedlichen Kinetik anderer detektierter Leukozytenarten, erscheint das Verhältnis der drei Granulozytenpopulationen und der Makrophagen-Subpopulationen aus der durchflusszytometrischen Analyse als das relevanteste Merkmal zur Definition des immunologischen Status und der Prognose zum Implantationserfolg.

Nun stellt sich die Frage der Translation von Erkenntnismustern. Lässt sich das durchflusszytometrisch erstellte Profil auf das makroskopische und histologische Erscheinungsbild des periimplantären Gewebes übertragen? Gibt es Systemische Indizien einer Immunreaktion? Können diese Merkmale zur frühzeitigen validen Erkennung einer starken Immunreaktion beitragen? Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Immunreaktion sich in einer Schwellung in Folge von Extravasation und Ödematisierung äußert. Die Zerstörung des Wirtsgewebes und der Blutgefäße im Implantat nahen Bereich resultieren in Einblutungen. Im Falle einer starken Immunreaktion gegen ein alloplastisches Material (RM-F) äußert sich diese in einer fibrösen Kapselbildung mit Exsudat, einer Schorfbildung und Umwandlung des umgebenden Gewebes in Kapselgewebe und somit einer erhöhten Dicke der Kapsel. Eine gute Biokompatibilität des Implantates (WE43) lässt sich hingegen anhand solider Vaskularisierung und Interaktion des Implantates mit dem Wirtsgewebe erkennen. Die Zelluläre und die humorale Immunantwort lassen sich somit anhand makroskopischer Merkmale erkennen (Abb. 19). Die vorliegenden Untersuchungen erlauben eine hierarchische Aufstellung der periimplantären makroskopischen Merkmale in Bezug auf die Relevanz zur Charakterisierung der Immunantwort. Makroskopisch fungieren die periprothetische Exsudatmenge, Anhaftung der Gewebekapsel am Implantat, Fibrinausbildung um das Implantat, Verwachsen der Kapsel mit dem umgebenden Gewebe und Schorfbildung als die aussagekräftigsten Merkmale einer apparenten Immunreaktion (Abb. 19). Aufgrund der invasiven Detektion der meisten Merkmale sind diese nur post mortem feststellbar. Lediglich die Schorfbildung kann bei einer äußeren Adspektion festgestellt werden. Der systemisch im Blut detektierte Anstieg der potentiell proinflammatorisch wirkender $Rt1b^+CD161^+$ Monozyten, sowie der temporären Abnahme der neutrophilen Granulozyten im Blut könnte als ein Indiz einer proinflammatorischen Immunreaktion auf das eingesetzte Implantat fungieren. Der Anstieg der $CD8^+$ T-Zellen im späteren Zeitpunkt der Implantation könnte als Indiz einer nicht septischen Komplikation fungieren.

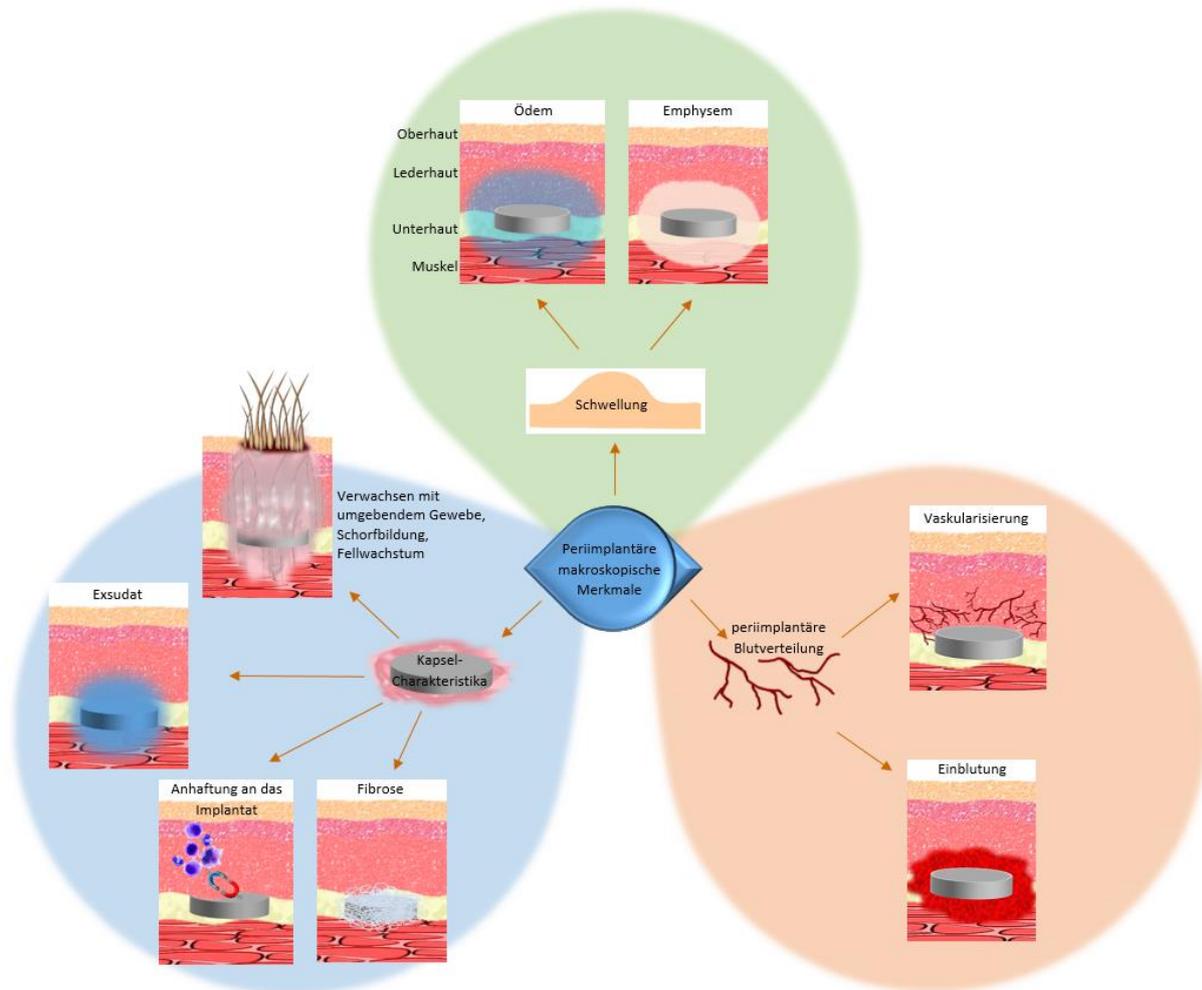


Abb. 19: Übersicht makroskopischer Merkmale nach einer Implantation aufgeteilt in periimplantäre Blutverteilung, Kapselcharakteristika und von außen bei einer Adspektion detektierbare Veränderungen (Schwellung). Die periimplantäre Blutverteilung und von außen sichtbare makroskopische Veränderungen eignen in sich nicht für eine restringierte Beurteilung der Wirtsantwort auf die Implantation spezieller Materialien, sondern stellen allgemeine Charakteristika infolge eines operativen Eingriffes dar. Die Kapselcharakteristika liefern hingegen aussagekräftige Indizien zur Beurteilung des immunologischen Status und Indizien zur Beurteilung des Implantationserfolges.

7.2 Das Differenzierungsverhalten der Makrophagen und die Rekrutierungstendenz der Granulozyten sind gewichtige Merkmale zur Charakterisierung der Immunantwort gegen Implantatmaterialien

Anhand erhobener Daten ist es ersichtlich, dass mindestens 21 verschiedene Leukozytenpopulationen und Subpopulationen mit unterschiedlichen phänotypischen Merkmalen bei der Fremdkörperreaktion gegen WE43 enthaltene Implantate mit und ohne Bioglasbeschichtungen sowie dem Referenzmaterial-F beteiligt sind. Alle Zellen sind in Kapseln aller getesteten Materialien vorhanden jedoch im unterschiedlichen Ausmaß. Das Zusammenspiel dieser Zellen ist entscheidend für den Grad

der Biokompatibilität des Materials. Der Fokus der aktuellen Untersuchung fällt auf die Charakterisierung der zellulären Fremdkörperreaktion gegen die biodegradierbare Beschichtungen bzw. Biokompatibilität der Beschichtungen unter physiologischen Bedingungen (*in vivo*).

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Gewebekapseln ergab eine signifikant stärkere Expression des CD163 Moleküls auf CD68⁺ und CD68⁻ Makrophagen in den WE43 Kapseln als bei GB, BG-Si und RM-F. Dies korreliert mit einer erhöhten Präsenz der basophilen und eosinophilen Granulozyten in der Kapsel von WE43. Es wurde bereits gezeigt, dass die Differenzierung der M2 Makrophagen, die antiinflammatorisch und förderlich für den Gewebsaufbau (Regeneration) agieren, vom IL-4 gefördert wird, zu dessen Quellen neben TH2-Zellen auch eosinophile und basophile Granulozyten zählen [111], [20], [112]. Daher liegt die Vermutung der Beteiligung dieser beiden Granulozytenpopulationen an der erhöhten Expression des CD163 Phänotyps in unbeschichteten WE43-Kapseln nahe. Zugleich ist die Menge der neutrophilen Granulozyten reduziert bei WE43 unbeschichtet. Dies kann durch die erhöhte Quantität von Magnesium im periimplantären Bereich der unbeschichteten Implantate zustande kommen. Einige Studie haben gezeigt, dass die Reduktion von extrazellulärem Magnesium die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [113], [107] und Makrophagen [114], sowie die Steigerung der Zahl der Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten [115], fördert. Eine erhöhte Menge desselben, könnte das Gegenteil bewirken. Tu Hu und sein Team konnten einen supprimierenden Effekt von Magnesium auf M1 Makrophagen und deren inflammatorische Zytokine zeigen. Dabei hatte die suppressive Wirkung einen geringeren Effekt auf M2 Makrophagen [35]. Der Verlauf der CD163⁺ Zellen, sowie neutrophiler und basophiler Granulozyten in den Kapseln der BG und BG-Si ist jedoch vergleichbar mit dem Positivmaterial (RM-F). Die Komponenten der Bioglasbeschichtungen scheinen somit die Neutrophilenpräsenz in den Kapseln zu unterhalten. Park et al. konnte einen stimulierenden Effekt von Chitosan auf die Produktion von IL-8 seitens neutrophiler Granulozyten nachweisen, einen Chemokin, welches wiederum rekrutierend auf Neutrophile wirkt [116]. Eine andere Gruppe konnte einen Zusammenhang zwischen der Neutrophilenpräsenz und dem reduzierten Entwicklungs- und Reifungspotenzial der Makrophagen, vermittelt durch Ektosomen der Granulozyten, ziehen [117]. Dies würde das mit dem RM-F vergleichbar reduzierte Auftreten der CD163 positiver Makrophagen in den Kapseln der beschichteten Materialien erklären. Ein solcher Effekt konnte bei CD68⁺CD163⁻ Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 2). Die basophilen Granulozyten zeigen einen Anstieg im Verlauf der vier Testwochen mit einer signifikant stärkeren Expression in den WE43 unbeschichteten Kapseln und Expressionspeaks am Tag 3 und Tag 14 subkutan. Im intramuskulären Bereich zeigt sich eine lokalisationsbedingte Verzögerung. Im gleichen Muster nehmen Werte der neutrophilen Granulozyten im Verlauf des Experimentes bei allen Materialien ab (Abb. 1). WE43 zeigt dabei die stärkste Abnahme. Am Tag 1 sind die Mengen der Neutrophilen, bedingt durch den operativen Eingriff, in allen Materialien

noch vergleichbar hoch, nehmen subkutan bei WE43 ab Tag 3 signifikant ab und gleichen sich zum Tag 28 wieder an. Die fallende Tendenz der Zellen tritt intramuskulär bedingt durch reduzierte Perfusion des Gewebes verspätet ab Tag 7 auf und verbleibt signifikant bis zur vierten Woche. Ursächlich für die abweichende Kinetik der neutrophilen und basophilen polymorphnukleäre Zellen (PMNs) in den Kapseln der beschichteten und unbeschichteten Proben könnte unter anderem der partielle Acetylierungsgrad des Chitosans (<85%) sein [99]. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass der Acetylierungsgrad des Chitosans von 50% bis 92% eine verstärkte Rekrutierung von PMNs und Makrophagen/Monozyten (überwiegend neutrophilen Granulozyten) zum Implantationsort induziert und diese solange dort verbleiben, bis das Chitosan vollständig metabolisiert ist. Die Acetylierung scheint zudem die Differenzierung der Makrophagen in M1 und M2 Richtung zu beeinflussen. Der 5% Acetylierungsgrad resultiert in eine M2 dominierte Immunantwort mit reduzierter Fibrinfaserbildung. Eine stärkere Acetylierung von 15% führt zur Aktivierung der M1 Makrophagen [98]. Gemäß den eruierten Ergebnissen, scheint der mittlere Acetylierungsgrad des Chitosans von 75-85% mit Bioglass45S5 mit und ohne einer zusätzlichen Menge an Siliziumdioxid nicht stimulierend auf die Differenzierung der Makrophagen in M1 oder M2 Richtung, jedoch anziehend auf neutrophile Granulozyten zu wirken. BG-Proben zeigen in unserem Fall die geringste M1 Expression, dicht gefolgt von BG-Si und WE43 in beiden Lokalisationen. Die eosinophilen Granulozyten sind in den Kapseln aller Magnesiumenthaltenen Implantate am 3. und 7. postoperativen Tag signifikant stärker vertreten als bei RM-F. Neben IL-4 und IL-13, fungieren Eosinophile als Profibrinolyse (Plasminogen) Quelle, das Proenzym von Plasmin, das die Fibrinolyse aktiv gestaltet. Bei einer Entzündung, sowie Wundheilung agiert Fibrin oder Fibrinogen attrahierend auf eosinophile Granulozyten, die bei der Degradierung derselben mitwirken [40]. Bei der Betrachtung der makroskopisch detektierten Fibrinausbildung in den Kapseln einzelner getesteter Implantate wird deutlich, dass Fibrin am stärksten in den RMF-Kapseln mit geringster Anzahl an eosinophiler Granulozyten in beiden Lokalisationen auftritt. Am geringsten ist die fibröse Kapsel bei der WE43-Kapsel ausgebildet. Die BG-Si-Kapseln zeigen am dritten postoperativen Tag in der subkutanen Lokalisation, sowie am Tag 1 und 3 intramuskulär, signifikant geringere Ausprägung von Fibrin als die RM-F- Kapseln. Die BG-Kapsel zeigt die geringsten Unterschiede zum Positivmaterial mit einer signifikant geringeren Fibrinausbildung lediglich am Tag 1 in der intramuskulären Lokalisation (Abb. 14). Die Annahme einer kausalen Korrelation der beiden Ausprägungen: Eosinophilen- und Fibrinmenge ist daher plausibel. Im Hinblick auf die stärkere Fibrinausbildung in den BG-Kapseln im Vergleich zu BG-Si und WE43 bei einer vergleichbaren Menge der eosinophilen Granulozyten, ist anzunehmen, dass auch andere Mechanismen bei der Fibrindegradierung beteiligt sind.

Das Zinkdiethyldithiocarbamat enthaltene RM-F induziert eine vom M1 Makrophagen geprägte Immunantwort. ZDEC ist toxisch für Zellen, was eine hohe Menge an Zelltrümmern zur Folge hat.

Bereits kleine Mengen (0.001–0.01%) des Stoffes führen zu einer signifikanten Toxizität [118]. Zelldebris der dabei entsteht, wirkt sich wiederum modulierend auf die Makrophagendifferenzierung aus [119]. Ricardo Londono und Kollegen konnten eine proinflammatorische M1 ausgerichtete Immunantwort bei einer 24h Inkubation von Ratten und Mäuse-Makrophagen in einem mit Zellbestandteilen präpariertem Kollagengerüst *in vitro* und *in vivo* nachweisen [119]. Eine M2 Makrophagen Steigerung konnte dabei nicht beobachtet werden.

7.3 Kinetik anderer Leukozytenarten

Eines der Merkmale der Auswirkung von Chitosan (abhängig von dem Acetylierungsgrad) auf das Immunsystem ist die Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen zum Implantationsort. Die Art der attrahierten Makrophagen wurde bisher nicht ausreichend bestimmt. Anhand der vorliegenden durchflusszytometrischen Untersuchung konnten $CD68^+CD163^{low}$ und $CD68^-CD163^{low}$ Makrophagen in allen Materialkapseln entdeckt werden. Beide Populationen zeigen einen ähnlichen Verlauf und sind in den Kapseln der beschichteten Proben signifikant stärker vertreten als in der WE43 und RM-F-Kapseln. Die Differenz der Expression verstärkt sich zu späteren Zeitpunkten. In Anbetracht dessen, dass M1 und M2 Makrophagen in BG- und BG-Si-Kapseln nur gering vertreten sind, scheinen in unserem Fall die $CD163^{low}$ exprimierende Zellen von Chitosan oder Bioglass attrahiert oder induziert zu werden. Mit der erhöhten Präsenz der $CD163^{low}$ Zellen geht eine Steigerung der TH17-Zellen zu späteren Zeitpunkten (Tag 14 und 28) in Kapseln Bioglass- und Chitosan-enthaltener Proben einher. Ein Zusammenhang zwischen $CD163^{low}$ und TH17-Zellen konnte eine Arbeitsgruppe aus Japan bereits beobachten, mit der Schlussfolgerung, dass $CD163^{low}$ Makrophagen über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine solcher wie: IL-6, IL-1 β , und TNF, die Fähigkeit besitzen, die Differenzierung von naiven T-Zellen in den TH17 Phänotyp im gesunden und entzündlichen Zustand zu lenken [51]. Somit scheinen alle drei Populationen: $CD68^+CD163^{low}$, $CD68^-CD163^{low}$ und TH17-Zellen, die proinflammatorische Immunantwort zu begünstigen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Kapseln erlaubte die Einteilung der enthaltenen Monozyten in vier distinkte Populationen anhand der Oberflächenexpression des RT1b und des CD161 Moleküls. Auffallend war dabei die signifikant stärkere Expression des CD161 Moleküls auf Monozyten in den Kapseln des Referenzmaterials-F. Dabei konnte man eine RT1b positive und eine RT1b negative Population ($RT1b^+CD161^{low}$ und $RT1b^-CD161^{low}$) detektieren. Kapseln der Modellegierung WE43 und die beschichteten Proben enthielten überwiegend CD161 negative Monozyten, wobei, sich anlehnend auf die RT1b Expression, auch hier 2 Populationen definiert werden konnten ($RT1b^+CD161^-$ und $RT1b^-CD161^-$). Die Studie von Alessandro Poggi und Kollegen hatte bereits aufgezeigt, dass CD161 auf der Oberfläche von Monozyten zur Produktion von immunaktivierenden Zytokinen IL1- β und IL-12 führt

[53]. Unter anderem aktiviert IL-1 das Endothel und unterstützt somit die Diapedese der Immunzellen zum Inflammationsort, sowie die Zerstörung des Gewebes lokal. IL-12 wirkt auf NK Zellen aktivierend und induziert eine TH1 vermittelte Immunantwort. Somit scheint das toxisch wirkende RM-F die Induktion von CD161^{low} Monozyten zu fördern, um die Immunantwort gegen den Fremdkörper aufrecht zu erhalten.

Entgegen der Annahme der verstärkten Präsenz der INF- γ produzierender T-Zellen in den Kapseln des Referenzmaterials-F als Folge der toxischen Wirkung von ZDEC, wurden vergleichbar viele oder weniger TH1- und TC1-Zellen im Vergleich zu Kapseln der beschichteten und unbeschichteten WE43-Implantate detektiert. Somit scheinen diese beiden Quellen für INF- γ mäßig der Differenzierung der Makrophagen in M1 Richtung in den RM-F Kapseln beizutragen. Die NK und NK-T-Zellen hingegen zeigen eine rapide Steigerung ab Tag 7 in der RM-F-Kapsel. Da die beiden Zellpopulationen als potente INF- γ Quellen fungieren, kann angenommen werden, dass diese der M1-Differenzierung beitragen. Die Expressionsdifferenz ist intramuskulär bei beiden Populationen ausgeprägter.

Wie auch Makrophagen besitzen dendritische Zellen einen wandelbaren Charakter. Je nach Stimulierung ändert sich der Phänotyp der Zellen und damit auch die Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurden 4 Subtypen dendritischer Zellen in der subkutanen und intramuskulären Lokalisation detektiert: CD68⁺CD172⁻CD161^{hi}, CD68⁻CD172^{hi}CD161^{hi}, CD68⁻CD172^{low}CD161^{hi} und CD68⁻CD172^{low}CD161⁻ (Tab. 2). Diese Populationen waren an jedem getesteten Tag in der Kapsel aller getesteten Materialien auffindbar. Neben den Oberflächenmarkern unterscheiden sich diese Zellen auch morphologisch. Die Kapseln der getesteten Materialien zeigen voneinander abweichende relative Quantitäten der Populationen, die sich zu späteren Zeitpunkten überwiegend angleichen. Morphologisch betrachtet sind die CD68⁻CD172^{low}CD161^{hi} am wenigsten ausgereifte Zellen und die für den myeloiden Oberflächenmarker positive CD68⁺CD172⁻CD161^{hi} am stärksten. Die Zellen mit dem höchsten Aktivierungsgrad (CD68⁺CD172⁻CD161^{hi}), phänotypisch betrachtet, treten in allen getesteten Kapseln mit ähnlicher Häufigkeit auf. Die Kinetik dieser Zellen mit höchster Ausprägung am Tag 14 und Tag 28 korrelieren mit den INF- γ exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Da eine der Hauptaufgaben der DCs die Aktivierung der naiven T-Zellen ist, lässt sich eine Interaktion der Zelltypen vermuten. Die CD68⁻CD172^{low}CD161^{hi} Zellen (morphologisch am geringsten gereift) übernehmen in der BG-Si und BG Kapsel in der ersten Hälfte der Testreihe die dominierende Rolle. Studien haben gezeigt, dass Chitosan eine immunzellrekrutierende Eigenschaft besitzt, die attrahierten Zellen jedoch eine schwache Aktivität zeigen[120]. In einer anderen Studie wird behauptet, dass die Chitosan induzierte Aktivität der DCs normal ist, die Kostimulation der T-Zellen mittels Zytokine bedingt durch fehlende Zytokinproduktion in den DCs jedoch gehindert wird [121]. Siliziumdioxid kann unterschiedlich auf dendritische Zellen wirken, unter anderem abhängig von der Applikationsform. Exposition dendritischer Zellen an Siliziumdioxid-Nanopartikel, sowie kristalline Form der Silika führt zur

Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle wie MHC-II, CD80, und CD86 auf der DC Oberfläche sowie einer verstärkten die Sekretion von IL-1b (Entzündungsmediator) [104]. Abhängig von der Größe der Silika Partikel (ultrafeine Silica-Nanopartikel: Diameter <100 nm) können diese auch toxisch wirken [105], [104]. Eine aktuelle Studie untersuchte reine poröse Chitosan/SiO₂ Gerüste (Scaffolds) auf ihre Biokompatibilität *in vivo* und fand heraus, dass die Materialien eine lokale Entzündung hervorrufen, die von DCs begleitet wird, es jedoch nicht zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort durch DCs aufgrund der Abwesenheit der CTLs und B-Zellen im periimplantären Bereich kommt, wobei das Herstellungsprozess (gefriergetrocknete/luftgetrocknete Proben) auch einen Einfluss auf den Ausmaß der Immunreaktion ausübte [122]. Die Interaktion von Bioglas und dendritischen Zellen wurde bisher nicht untersucht.

Während der akuten Inflammationsphase finden sich vermehrt CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} und CD68⁺CD172^{low}CD161⁻ Zellen in den Kapseln der WE43 Implantate. Hier sind die Populationen in beiden Lokalisationen in der ersten Testwoche signifikant stärker vertreten. CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} zeigen auch in den Kapseln der Referenzmaterialien jedoch zum späteren Zeitpunkt (14Tage) eine stärkere Präsenz als in BG und BG-Si-Kapseln. Ausgehend von der schwachen bis keinen RT1b (MHCII)-Expression in dieser Population (Tab. 2) lassen sich Rückschlüsse über den niedrigen Reifungsgrad der Zellen ziehen [123]. CD68⁺CD172^{hi}CD161^{hi} Zellen zeigen ein ähnliches Oberflächenexpressionsprofil wie plasmazytoide Dendritische Zellen, denen nachgesagt wird, eine schwache stimulierende Kompetenz gegenüber CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu besitzen, jedoch eine potente Quelle für Typ I Interferon zu sein [124]. Vasilijić et al. ist zu ähnlichen Ergebnissen mit der stärksten pDC Anwesenheit in späteren Zeitpunkten (Tag 14) mit einem schwachen Primingpotential, jedoch einen starkem IL-10 und TGF-β1 (T_{reg}-Zytokine) Anstieg *in vivo* (Schwammexsudat) und *in vitro* (Kulturüberstand) gekommen.

Auch Magnesium wirkt sich auf die Funktionalität der dendritischen Zellen aus. Studien haben gezeigt, dass die endozytotische Fähigkeit der APCs (Makrophagen und DCs) nicht von einer variierenden extrazellulären Mg Konzentration beeinflusst wird. Jedoch haben Kokultivierungen der APC mit T-Zellen in einem Milieu mit erhöhter Mg-Konzentration eine reduzierte IL-10 und IL-4 Sekretion seitens TH2-Zellen ergeben [125]. Eine andere Studie eruierte auch das Potential des Magnesiums zur Modulation der TH1/TH2 vermittelten Immunantwort insofern, dass bei erhöhter Serum-Mg Konzentration (Zeit- und Konzentrationsabhängig) eine TH1 zytokinlastige Expression in den aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten entstand und bei einem Reduzierten Mg-Spiegel die CD4⁺ Zellen verstärkt IL-13 und IL-5 (TH2-Zytokine) produziert haben [126], [127]. Der Zusammenhang besteht auch in der vorliegenden Arbeit, wo die INF-γ exprimierenden CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten in den WE43 enthaltenen Kapseln signifikant erhöht sind gegenüber dem Referenzmaterial-F (siehe Tab. 5). In Anbetracht der gesamten Zellkinetik scheinen die DCs eine passive Rolle beim Modulieren der Immunantwort gegen Implantate durch Priming von T-Lymphozyten zu übernehmen. Das erhöhte

Magnesiumgehalt in beschichteten und unbeschichteten Proben scheint auf T-Lymphozyten stimulierend zu wirken und der INF- γ Produktion förderlich zu wirken. Der Anstieg der INF- γ produzierenden T-Zellen scheint die Makrophagendifferenzierung jedoch nicht zu beeinflussen, was die Annahme der induktiven Rolle der Granulozyten bei der Differenzierung der M2-Makrophagen unterstützt.

Mastzellen fungieren unter anderem als IL-4 Quellen [128] und könnten somit die Differenzierung der Makrophagen in M2 Richtung mitmodulieren. In der subkutanen Region zeigen WE43 Kapseln signifikant erhöhte Mastzellenanwesenheit im Vergleich zur Positivkontrolle. Je nach Stimulierung können sie jedoch auch proinflammatorisch wirken. Im Zusammenhang mit Implantaten, wurden Korrelationen zwischen Mastzellaktivität und Fibrinausbildung festgestellt [129]. Dabei scheint die histaminvermittelte Rekrutierung der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen beim fibrininduktiven Prozess im Vordergrund zu stehen [11]. Studien haben gezeigt, dass Silika nur teilweise zur scavenger-rezeptor-vermittelten Aktivierung der Mastzellen über erhöhte TNF- α , IL-13, MCP1(CCL2) und ROS Produktion sowie Proteaseaktivität führt, jedoch keine Degranulation der Zellen hervorruft [130]. Eine andere Studie untersuchte das fibrininduktive Potential von TiO₂, SiO₂, und PLA und ermittelte die geringste fibrininduktive Kompetenz seitens SiO₂ im Vergleich zu den anderen Materialien [129]. Zudem scheinen Mastzellen über LTB₄ Sekretion nach Siliziumdioxidstimulierung rekrutierend auf neutrophile Granulozyten zu wirken [131], die wiederum durch Chitosan Stimulierung am Inflammationsherd entzündungsfördernd und rekrutierend über die Sekretion von LTB₄ (Leukotriene B₄) und PGE₂ (Prostaglandin E₂) wirken [132]. In der vorliegenden Arbeit steigen die Mastzellen nach 4 Wochen in der BG-Si Kapsel in beiden Lokalisationen signifikant an (Abb. 7), obwohl die makroskopischen Entzündungsmerkmale in allen Kapseln der getesteten Materialien abnehmen. Die Funktion der Mastzellen in der BG-Si-Kapsel gilt es noch genauer zu untersuchen, wobei anhand ermittelter Daten es nicht oder gering proinflammatorischer Natur zu sein scheint.

7.4 Histologische und systemische Äußerungen der immunologischen Prozesse, sowie die Wirkung der Implantatbeschaffenheit auf die Immunreaktion

Die Größe der Gewebekapsel, beurteilt anhand des Gewichtes und der Dicke der Kapsel (histologische Schnitte), gibt Auskunft über die Immunantwort gegen die getesteten Fremdkörper (WE43, RM-F, BG und BG-Si). Ausgehend von den Kapselgewichten zeigt RM-F signifikant größere Kapseln in der ersten Woche des Experimentes im Vergleich zu den anderen Materialkapseln. Die Anzahl der CD45⁺ Leukozyten in den ersten 3 Tagen ist vergleichbar zwischen allen Materialien, was jedoch mit dem operativen Eingriff in Verbindung stehen kann. Lediglich subkutan enthalten WE43-Kapseln am Tag 1

weniger Leukozyten. Ab Tag 14 gleichen sich die Gewichte der Kapseln an, was man auch makroskopisch bestätigen konnte. Die CD45⁺ Zellen blieben ab Tag 7 alle 4 Wochen nahezu auf dem gleichen Level in der RM-F-Kapsel, wohingegen die Leukozyten in den Kapseln von WE43, BG und BG-Si kontinuierlich abnehmen. Somit enthalten gleich schwere Kapseln mehr Leukozyten in der RM-F-Kapseln, was auf eine ausgeprägte Immunantwort in derselben hindeutet. Die histologischen Untersuchungen der Schnittpräparate konnten die Massenunterschiede der Kapseln getesteter Materialien bestätigen, mit dem stärksten durchschnittlichen Dickenunterschied zwischen den Kapseln von WE43 und RM-F über 200 µm am Tag 7 mit einer abnehmenden Tendenz.

Die in den Kapseln verschiedener Materialien voneinander abweichende Präsenz der eruierten Zellpopulationen rührt nicht von einer bakteriellen Kontamination der eingesetzten Materialien her. Dies wurde aus der qPCR-Untersuchung des periimplantären Gewebes (n=90) aller Materialien ersichtlich, wo der Vergleich der explantationsbegleitend entnommenen Proben und manuell mit E. coli kontaminierten Proben gezogen wurde. Es wurde ein Breitspektrum-PCR-Assay verwendet, der überwiegend für die Detektion von Bakterien im dentalen Zahnbelag (Plaque) fungiert, jedoch auch andere bakterielle Phyla, unter anderem E.coli, abdeckt [133], [134].

Entgegen der Erwartungen wurde die Korrosion der WE43 Implantate von den Beschichtungen nicht aufgehalten. Die *in vitro* Perfusionsuntersuchung von 3 Tagen zeigt einen signifikanten Unterschied in der Korrosion von BG und BG-Si, jedoch nicht im Vergleich zu WE43 unbeschichtet. Die Korrosionsuntersuchung der Implantate nach einer 3 tägigen Implantation *in vivo* subkutan und intramuskulär ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Korrosionsgeschwindigkeit. Somit eignen sich *in vitro* Bioreaktor-Perfusionsuntersuchungen nicht für die Darstellung der Korrosionsverhältnisse *in vivo*. Die Beschichtung verhindert bzw. reduziert die Degradation somit nicht ausreichend, moduliert jedoch die Immunantwort auf das Material. Die Korrosion verläuft *in vivo* subkutan schneller als intramuskulär, jedoch halb so schnell wie *in vitro*.

Hohes pH-Wert und hohe Osmolalität sind Zeichen einer starken Korrosion [135]. Den *in vitro* Korrosionsberechnungen nach zu urteilen, ist die Korrosion der WE43 Implantate mit BG-Si Beschichtung signifikant stärker als mit BG-Beschichtung. Die signifikant stärkere Ausprägung der Osmolalität bei BG-Si-Proben unterstützt diese Aussage. Wobei hier auch ein signifikanter Unterschied zwischen WE43 unbeschichtet und BG-Si beobachtet wurde, was auf eine geringere Korrosion der WE43 Implantate hindeuten würde. Alle verwendeten Materialien zeigen einen signifikanten Anstieg der Osmolalität gegenüber dem Kontrollwert ohne Material. Der pH-Wert jedoch, der bei einer starken Korrosion steigen sollte, ist in dem Fall bei BG-Si signifikant niedriger als bei BG-Proben. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Korrosion unter der Beschichtung der BG-Si-Proben fortgeschritten ist, die Korrosionsprodukte jedoch von der Beschichtung abgeschirmt und festgehalten wurden, was

in einem niedrigeren pH-Wert resultierte. Der pH-Wert der WE43 unbeschichtet zeigt sich signifikant niedriger als bei BG-Proben und liegt auf dem gleichen Niveau wie der Kontrollwert. Den größten pH-Wert zeigen die BG-Proben. Neben dem pH-Wert und der Osmolalität liefert die Leitfähigkeit ein valides Merkmal für die Korrosionsbeurteilung [136]. Die Leitfähigkeitsmessung ergab zwischen den Materialien vergleichbare Werte, was wiederum auf vergleichbare Abgabe der Mg-Ionen in die Umgebung und somit vergleichbare Korrosion *in vitro* hindeutet. Der Vergleich der Negativkontrolle (PBS ohne Material) und der Proben-Überstände mit einem Anstieg der Leitfähigkeit bei WE43 um 1,32 mS/cm, BG um 1,22 mS/cm und BG-Si um 1,41 mS/cm deutet auf eine relativ starke Korrosion hin. Ein signifikanter Unterschied zwischen BG, BG-Si- und WE43- Kapseln konnte hierbei nicht ermittelt werden.

Eine systemische Reaktion auf ein Material ist ein eindeutiges Zeichen der Unverträglichkeit eines Materials und somit auch Untauglichkeit desselben für die Verwendung als Implantat. In der vorliegenden Studie wurde das Zinkdiethyldithiocarbamat enthaltene zertifizierte Material (RM-F) als Positivkontrolle verwendet, dass bei einer Implantation erwiesene systemische Effekte hervorruft, die sich in einer signifikanten Verkleinerung der Organe: Milz, Leber und Thymus [137] äußert. Typische Anzeichen einer systemischen Reaktion sind außerdem die Reduktion der Zahl der neutrophilen Granulozyten [138], Lymphozyten und Leukozyten im Ganzen [139]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Leukozyten (CD45⁺ Zellen) im Blut der unbehandelten und mit Implantat versehenen Tiere vergleichbare Verläufe innerhalb der 28 Tage (Anhang Abb. 23). Im Einzelnen zeigten Rt1b⁻CD161⁺ Monozyten einen einmaligen signifikanten Anstieg in RM-F-Tieren am Tag 3 mit einer gleichzeitigen signifikanten Reduktion der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den anderen Tieren. Ein systemischer Anstieg der Monozyten als Zeichen einer Inflammation wurde bereits bei Mäusen nach einer LPS Injektion beobachtet, dies wurde in der Studie jedoch von einem gleichzeitigen Granulozytenanstieg begleitet. Die Rt1b⁻CD161⁺ Monozyten aller Tiere liegen hierbei weit über dem Kontrollwert (unbehandelte Tiere). Während CD4⁺ Zellen einen zwischen den unterschiedlichen Materialien und den 0-Wert-Tieren einen vergleichbaren Verlauf zeigen (Anhang Abb. 23), sind die CD8⁺ Zellen bei RM-F Tieren am Tag 1 signifikant geringer vertreten, bilden anschließend ein Plateauniveau zusammen mit WE43, BG und BG-Si Tieren von Tag 3 bis Tag 14 und steigen erneut signifikant am Tag 21 bis 28 an. Ein signifikanter Anstieg der CD8⁺ Zellen wurde bereits im Blut von Kandidaten für eine Revisionsoperation (Revisionsarthroplastik) bei nicht septischen Komplikationen beobachtet [140]. Außerdem konnte man einen signifikanten Anstieg der CD4⁺ dendritischen Zellen bei RMF- und BG-Si-Tieren im Vergleich zu BG- und WE43-Tieren am Tag 7 beobachten. Alle ermittelten Werte von Tag 3 bis Tag 28 lagen auch hier über dem 0-Wert. Somit äußert sich die verstärkte Fremdkörperreaktion in den RM-F Tieren durch von dem 0-Wert der unbehandelten Tiere, sowie WE43, BG und BG-Si Tiere abweichenden Leukozytenpopulationen im Blut. Die mit RM-F Tieren

vergleichbar starke Expression der CD4⁺ dendritischen Zellen bei BG-Si Tieren am Tag 7 unterstützt die Annahme einer moderaten Fremdkörperreaktion auf das beschichtete Material.

Wichtige Kriterien zur Beurteilung einer Immunantwort eines Wirtsorganismus auf einen Fremdkörper sind neben der zellulären Komponente auch makroskopisch erkennbare Merkmale, die als visueller Outcome der zellulären Tätigkeit zu betrachten sind. Zu diesen zählen neben den allgemein geltenden Merkmalen wie Schwellung, Ödematisierung, Einblutung, Vaskularisierung, Narbenbildung, Serom, Verkapselung auch materialspezifische Kriterien wie die Gasbildung und Interaktion des Kapselgewebes mit dem Implantatmaterial. Das Maß der Ausprägung, sowie die An- und Abwesenheit einiger Kriterien visualisieren die immunologische Antwort des Wirts. Die Bildung einer Kapsel, Seroms und Schorfs beispielsweise deuten auf eine verstärkte Immunantwort [119], [141] und prädestinieren eine Abstoßung des implantierten Materials. Die Abwesenheit dergleichen prophezeit eine gute Biokompatibilität des Materials und persistenten Verbleib im Körper. Bei der vorliegenden Untersuchung war das Ausmaß der Ausprägung folgender Kriterien bei allen getesteten Materialien gemein: Schwellung, Ödematisierung, Einblutung, Emphysem (Gasbildung), Vaskularisierung. Alle Merkmale waren in den ersten 2 Wochen stärker ausgeprägt und nahmen kontinuierlich ab. Dies deutet auf eine operationsbedingte akute Inflammation in allen Kapseln hin, die zum späteren Zeitpunkt abklingt. Lediglich im intramuskulären Bereich steigt der Emphysemwert nach 4 Wochen an, was auf eine fortschreitende Korrosion der WE43 enthaltenen Implantate hindeutet. Die Gasbildung entfiel als Kriterium bei der Beurteilung der Kapsel von RM-F aufgrund fehlender Korrosion. Betrachtet man die durchflusszytometrisch erhobenen Daten, werden eindeutige Unterschiede auf der zellulären Ebene zwischen getesteten Materialien deutlich, was oben genannte makroskopische Kriterien ungenügend für die Definition einer Immunreaktion auf ein biodegradierbares Material qualifiziert. Folgende Kriterien geben mehr Auskunft über den immunologischen Status in den Kapseln jeweiliger Materialien: Exsudat in der Kapsel, Anhaftung der Kapsel an das Implantat, Fibrin und Schorfbildung. WE43-Kapseln zeigten die geringste Serombildung und kein Fibrin in der Kapsel. Dies deutet auf eine bessere Verträglichkeit des Materials, was auch die durchflusszytometrischen Ergebnisse mit unter anderem einem Makrophagenshift in M2-Richtung untermauert. Die beschichteten Materialien zeigen eine mit RM-F vergleichbare Ausprägung der Merkmale, welche sich nach 4 Wochen reduzieren, was wiederum auf eine anfänglich stärkere Immunantwort hindeutet, die sich im weiteren Verlauf abschwächt. Studien bestätigen die förderliche Wirkung von Chitosan zur Ausbildung von PMNs und Makrophagen enthaltender exsudativer (seröser) Flüssigkeit [132]. Die moderate Ausbildung von Fibrin in den BG und BG-Si Kapseln, sowie mit den RM-F Kapseln vergleichbare M2 Verhältnisse deuten auf eine Immunreaktion mit einem moderat-proinflammatorischen Charakter hin. Die Integration des umgebenden Gewebes in das eingesetzte Implantat in Form von Anhaftung der Kapsel an das eingesetzte Material ist bei den WE43 Kapseln am stärksten evident. Zudem steigt es ab Tag 21 im

Vergleich zu anderen Materialien in beiden Lokalisationen signifikant an, was ein eindeutiges Signal für eine hohe Biokompatibilität und starke Implantat-Material-Interaktion liefert. BG und BG-Si Kapseln zeigen eine Anhaftung verstärkt am Tag 3 in beiden Lokalisationen, die jedoch ab Tag 7 die restliche Testdauer auf einem niedrigen Niveau verbleibt. Eine längere Beobachtung der BG und BG-Si-Kapseln wäre interessant in der Hinsicht der Interaktion des Implantates mit dem Kapselgewebe nach der vollständigen Assimilation der Beschichtungen (BG und BG-Si). Das Verwachsen der Kapsel mit dem umgebenden Gewebe (Haut und Muskel) hingegen deutet auf eine stärkere Involvierung des periimplantären Bereichs in das Entzündungsgeschehen. Solche Umstrukturierungen konnte man verstärkt subkutan in den RM-F-Tieren beobachten. Die WE43, BG und BG-Si Tiere hatten einen Peak am Tag 3 und nahmen zum Tag 7 stark ab. WE43 Tiere blieben auf dem niedrigen Niveau, wobei BG und BG-Si Tiere einen zweiten Peak am Tag 21 aufwiesen. Ein weiteres Indiz einer starken Immunreaktion ist die Schorfbildung, die sich lediglich in den RM-F Tieren äußerte. Das Verwachsen der Kapsel mit dem umgebenden Gewebe korreliert mit der Schorfbildung bei RM-F-Tieren. Die starke Durchblutung in den involvierten Hautarealen mit Schorfgewebe wirkt scheinbar förderlich auf das Fellwachstum bei RM-F-Tieren. WE43-Tiere (beschichtet und unbeschichtet) wiesen keine Schorfbildung auf, was wiederum auf eine schwächere Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes hindeutet. Das Wohlbefinden der Tiere in Form von Stress oder Schmerz bedingter Gewichtsabnahme/-Zunahme äußerst sich dahingehend, dass WE43 Tiere den geringsten Gewichtsverlust erleiden und wieder am stärksten Gewicht zunehmen nach dem Abklingen der akuten Inflammation ab Tag 7. BG-Si Tiere nehmen am stärksten ab, regenerieren sich jedoch wieder und nehmen zum Tag 28 wieder zu (Tendenz steigend). RMF und BG-Tiere liegen im mittleren Bereich und zeigen keine steigende Tendenz zum Abschluss des Experimentes.

Der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit eines Materials auf die Wirtsreaktion wurde bereits eingehend untersucht und belegt. Dabei wurde festgestellt, dass glatte Oberflächen bevorzugt zu Fibrinkapselbildung führen. Poröse Materialien hingegen resultieren in einer gesteigerten Wirt-Implantat-Interaktion durch das Einwandern und das Anhaften der Zellen in und an das alloplastische Material [142], [143]. In der vorliegenden Arbeit zeigen die Oberflächen der beschichteten und der unbeschichteten Implantate ein sehr ähnliches topografisches Bild nach 3 und 28 Tagen *in vivo* subkutan und intramuskulär und somit eine sehr vergleichbare Kontaktfläche für die umgebenden Immunzellen. Bedingt durch die Implantation wird die Oberfläche der ursprünglich körnigen RM-F Implantate mit der vorschreitenden Zeit glatter. Die Topografie der Implantate ohne Korrosionsablagerungen enthüllen jedoch Unterschiede in der Korrosionsart der Materialien. Während WE43 mit der ursprünglich gerillten Struktur zur Flächenkorrosion neigt, zeigen BG und BG-Si Proben Merkmale einer Mulden-Lochkorrosion mit größeren Vertiefungen und scharfen Kanten.

Dadurch, dass die BG und BG-Si Proben vor der Beschichtung 24 Stunden lang in DMEM vorkorrodiert wurden, kann man den Vergleich der beschichteten und der unbeschichteten Proben jedoch nur bedingt vornehmen. Der Vergleich der beschichteten Proben untereinander ergab eine unregelmäßigere Korrosion mit tieferen flächigen konkaven Strukturen der BG Implantate im Vergleich zu gleichmäßigen Korrosionsmerkmalen der BG-Si Proben am Tag 3. Zu späterem Zeitpunkt (28 Tage) gleichen sich die Korrosionsmerkmale der beschichteten Proben an. Betrachtet man die zelluläre Antwort, sowie die histologischen und makroskopischen Merkmale auf die Implantation der unterschiedlichen Materialien, scheinen WE34 Implantate eine vorteilhafte Material-Wirt Interaktion hervorzurufen. In Anbetracht der topografisch nahezu identischen Oberfläche und damit Zell-Material-Kontaktfläche der WE43, BG und BG-Si Implantate bereits nach einer 3 tägigen Implantation, ist die Annahme der Maßgeblichkeit der Oberfläche der Implantate im Erstkontakt mit Immunzellen für den weiteren Verlauf der Immunreaktion naheliegend. Stützend auf den Ergebnissen der Kooperationspartner bezüglich der Rauigkeit und dem Benetzungsverhalten der WE43 und BG Proben (identisch zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben) stellt eine höhere maximale Rauheit ($R_{max} 16 \pm 3 \mu m$) und höhere durchschnittliche Rauheit ($R_a 2.2 \pm 0.3 \mu m$) mit einem Kontaktwinkel der BG Proben von 51° im Vergleich zu niedrigeren Rauigkeitswerten ($R_{max} 3.2 \pm 0.4 \mu m$ und $R_a 0.30 \pm 0.02 \mu m$) und höheren Benetzungswerten (61°) der WE43 Proben [144] nicht den optimalen Interaktionsoberfläche für Immunzellen dar. Das gleichmäßige rillige Muster der WE43 Oberfläche scheint der Anhaftung der Zellen förderlich zu wirken im Gegensatz zu der granularen Oberfläche der beschichteten Implantate und RM-F. Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch Wojciak-Stothard et.al 1995 [69] gekommen, die gezeigt haben, dass eine Oberfläche mit parallel verlaufenden Rillen mit der Tiefe von $0,5 \mu m$ den Bestand von F-Aktin in Makrophagen erhöht, sowie die Verteilung und die Mobilität der Zellen beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass die Zellen bevorzugt in den Rillen akkumulieren und entlang dergleichen wandern. Darüber hinaus konnten die Forscher eine stärkere Sensitivität aktivierter Zellen auf die topografischen Merkmale beobachten, als nicht aktivierte Zellen [69], [145]. Die Ausrichtung der Zellen entlang der Rillen konnte auch von anderen beobachtet werden [59]. Zudem generieren die Zellen Verbindungen zueinander durch zytoplasmatische Ausstülpungen [146].

7.5 Limitationen

Die Ratte gilt nicht als ein typisches immunologisches Model, wodurch das Angebot der spezifischen Antikörper für kleinere Leukozyten-Subpopulationen (z.B. M2a, b und c) stark begrenzt ist. Die Präferenz für diesen Modelorganismus fiel aufgrund der leichten Handhabung, der stärkeren physiologischen und metabolischen Ähnlichkeit zum humanen Organismus inklusive Pharmakokinetik und /-Dynamik [147], [148], sowie einer 90% Übereinstimmung der Gene der Ratten und des Menschen [149] und ausreichenden Größe des Tieres, die eine gleichzeitige Implantation von 4 Implantaten (2 subkutan und 2 intramuskulär) erlaubte. Um die durchflusszytometrisch erhobenen Daten evaluieren zu können, wurde die Hälfte der Kapseln für histologische Untersuchungen verwendet. Die geringe Menge der Zellen aus jeweils einer Kapsel pro Lokalisation limitierte die Färbemöglichkeiten. Eine Aufteilung der Kapsel vor allem in späteren Zeitpunkten (21.-28. Tag) in mehr als zwei Panels für eine umfassende und detaillierte Charakterisierung der immunologischen Zellen war nicht möglich. Es gibt zeitlich betrachtet geringfügige Unterschiede in der Entwicklung des Immunsystems der Ratten und Menschen [153]. Jedoch ist die Entwicklung des Immunsystems der Ratte ab dem 21-28 Tag nach der Geburt weitgehend abgeschlossen [154]. Dadurch, dass wir in der vorliegenden Studie erwachsene 12 Wochen alte Tiere verwendet haben, sollte die immunologische Vergleichbarkeit der Spezies gegeben sein.

Die Definition der Rolle der einzelnen Populationen während der Immunantwort gegen getestete Implantate wird von der Vielfalt der Komponenten der verwendeten Materialien erschwert. Nur das Bioglass allein besteht aus einer vielfältigen Kombination an Bestandteilen: 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO, 6% P₂O₅ (wt %) [150]. Jedes dieser Komponenten kann unterschiedliche Wirkungen auf gleiche Zellarten zeigen. Chitosan beispielsweise wirkt reifungsfördernd und proinflammatorisch auf dendritische Zellen über Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle und Produktion proinflammatorischer Zytokine [151]. Silika wirkt entgegengesetzt und reduziert das Aktivierungspotential der DCs TLR-Liganden-abhängig und dosisabhängig in Form von der Reduktion der kostimulatorischen Moleküle, proinflammatorischer Zytokine und Stickoxidproduktion [106]. Neben der Vielfalt der Komponenten, kommt die chemische Modifikation der Umgebung (pH-Wert, Osmolalität, Leitfähigkeit) durch die korrosiven Prozesse von Magnesium [152], sowie Assimilierung der Bestandteile der Beschichtungen im physiologischen Rahmen hinzu. Des Weiteren wirken sich die allgemeinen Materialeigenschaften wie Oberflächenbeschaffenheit, Adsorptionspotential von Proteinen, die Größe des Implantats [58], sowie der Korrosions- und Assimilationspartikel, Konzentration und materialspezifische Eigenschaften, wie der Acetylierungsgrad und molekulares Gewicht (bei Chitosan) [99] weiterhin modulierend auf die Immunantwort gegen eingesetzte Materialien aus.

7.6 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick

Mit den konzipierten Panels konnte eine umfassend detaillierte Darstellung der Immunreaktion gegen Mg-enthaltene biodegradierbare Implantate *in vivo* erstellt werden. Eines der Panel erlaubt eine Betrachtung der T-Lymphozyten auf dem Zytokinniveau. Das andere stellt eine breite Gliederung der myeloiden Subpopulationen, sowie B-, NK- und NK-T-Zellen dar. Insgesamt konnten mehr als 21 Leukozytenpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle, sowie intrazellulär gelegenen Marker definiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Konzentration der Makrophagen und Granulozyten, sowie der Fibrinproduktion in der Gewebekapsel existiert. Die Kinetik der Zellen während der Immunreaktion gegen WE43, RM-F, BG und BG-Si konnte in periimplantären makroskopischen Äußerungen erfasst werden. Die umfassende Betrachtung der implantatnahen makroskopischen Merkmale erlaubte eine hierarchische Aufstellung der Kriterien zur Definition der Relevanz des Merkmals zur Detektion einer Fremdkörperreaktion und des Grades der Immunreaktion gegen implantierte Materialien. Die systemische Veränderung im Blutbild, hervorgerufen durch die Implantation von dem Referenzmaterial-F (Isonorm 10993), kann als Referenz zur Detektion einer starken Immunreaktion verwendet werden. In Anbetracht der *in vivo* Untersuchungen eignen sich die Bioglas/Chitosan, sowie Bioglas/Chitosan/Siliziumdioxid Beschichtungen nicht als Korrosionsschutz für Magnesiumimplantate. Eine *in vitro* Perfusionsuntersuchung der degradierbaren Implantate ersetzt keine *in vivo* Untersuchung. Die Degradation verläuft *in vitro* doppelt so schnell. Das Korrosionsprotektionsvermögen einer Beschichtung kann jedoch mit der Perfusion grob bestimmt werden.

Das erstellte Verfahren zur Definition des immunologischen Profils kann auf andere Materialien identisch übertragen werden. Die Interaktion der einzelnen Zellpopulationen kann anhand der zellulären Kinetik zu den entsprechenden Zeitpunkten nur hypothetisch betrachtet werden. Als ein nächstmöglicher Schritt könnten die Untersuchungen der einzelnen Zellpopulationen untereinander mittels Zytokin und Zell-Zell vermittelten Kommunikation in gemischten Zellkulturen näher betrachtet werden, um dem zugrundeliegenden Mechanismus der Makrophagendifferenzierung und der Immunantwort an sich sowie im Milieu eines degradierenden Mg-Implantates exakt zu definieren. Das Magnesium ist die Gemeinsamkeit der beschichteten und unbeschichteten Materialien. Dadurch, dass die Korrosion bei allen korrosionsfähigen getesteten Materialien ähnlich ist und die Eosinophilen einen sehr ähnlichen Verlauf bei den Materialien zeigen, bietet sich z.B. die Untersuchung der Mg-Korrosion in Zusammenhang mit der Eosinophilenaktivität und Fibrinestehung als ein nächster Schritt zum besseren Verständnis der Fibrinreduktion in WE43 Kapseln.

8. Literaturverzeichnis

1. Sykaras, N., et al., *Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review.* Int J Oral Maxillofac Implants, 2000. **15**(5): p. 675-90.
2. Song, G.L. and A. Atrens, *Corrosion Mechanisms of Magnesium Alloys.* Advanced Engineering Materials, 2000. **1**(1): p. 11-33.
3. Dai, T., et al., *Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. **9**(7): p. 857-79.
4. Zhang, D., et al., *Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses.* J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(2): p. 475-83.
5. Vallet-Regi, M. and F. Balas, *Silica materials for medical applications.* Open Biomed Eng J, 2008. **2**: p. 1-9.
6. Schneider, L.A., et al., *Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?* Arch Dermatol Res, 2007. **298**(9): p. 413-20.
7. Jones, E.M., C.A. Cochrane, and S.L. Percival, *The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms.* Adv Wound Care (New Rochelle), 2015. **4**(7): p. 431-439.
8. M, T.F., et al., *Current concepts in the physiology of adult wound healing.* Plastic and Aesthetic Research, 2015. **2**(5): p. 250-6.
9. Sheikh, Z., et al., *Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials.* Materials (Basel), 2015. **8**(9): p. 5671-5701.
10. Khanna, V., *Biomaterials for Implants, in Implantable medical electronics: Prosthetics, drug delivery, and health monitoring.* 2016. p. 153-166.
11. Tang, L., T.A. Jennings, and J.W. Eaton, *Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8841-6.
12. Zizzi, A., et al., *Peri-implant diseases and host inflammatory response involving mast cells: a review.* Int J Immunopathol Pharmacol, 2011. **24**(3): p. 557-66.
13. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
14. Vasilijic, S., et al., *Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation.* Cell Immunol, 2005. **233**(2): p. 148-57.
15. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo.* Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
16. Audiger, C., et al., *The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance.* J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2223-2231.
17. Jhunjhunwala, S., et al., *Neutrophil Responses to Sterile Implant Materials.* PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137550.
18. Branzk, N., et al., *Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens.* Nat Immunol, 2014. **15**(11): p. 1017-25.
19. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.* J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
20. Brandt, E., et al., *IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 125-30.
21. Klopfleisch, R., *Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers.* Acta Biomater, 2016. **43**: p. 3-13.
22. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials.* Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 86-100.
23. Anderson, J.M., *Biological Responses to Materials.* Annual Review of Materials Research, 2001. **31**(1): p. 81-110.
24. Kao, W.J., et al., *Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo.* J Biomed Mater Res, 1995. **29**(10): p. 1267-75.

25. Most, J., H.P. Neumayer, and M.P. Dierich, *Cytokine-induced generation of multinucleated giant cells in vitro requires interferon-gamma and expression of LFA-1*. Eur J Immunol, 1990. **20**(8): p. 1661-7.
26. Pirotek, S. and J. Toutenhahn, *Physiologie der Wundheilung*, in *Wundatlas*, L. H, Editor. 2006, Georg Thieme Verlag. p. 28–33.
27. Revel-Vilk, S., M.L. Rand, and S.J. Israels, *Primary and Secondary Hemostasis, Regulators of Coagulation, and Fibrinolysis: Understanding the Basics*, in *SickKids Handbook of Pediatric Thrombosis and Hemostasis*, V.S. Blanchette, V.R. Breakey, and S. Revel-Vilk, Editors. 2013, Karger. p. 5–13.
28. van Wersch, J.W. and J.M. Ubachs, *Blood coagulation and fibrinolysis during normal pregnancy*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1991. **29**(1): p. 45-50.
29. Andreassen, A.T., *Magnesium Sulphate Powder in the Treatment of Wounds and Ulcers*. Ind Med Gaz, 1942. **77**(3): p. 129-131.
30. Razzaghi, R., et al., *Magnesium Supplementation and the Effects on Wound Healing and Metabolic Status in Patients with Diabetic Foot Ulcer: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. Biol Trace Elem Res, 2018. **181**(2): p. 207-215.
31. Tabatabai, M.A., W.M. Eby, and K.P. Singh, *Hyperbolic modeling of wound healing*. Mathematical and Computer Modelling, 2011. **53**(5): p. 755-768.
32. Banai, S., et al., *Influence of extracellular magnesium on capillary endothelial cell proliferation and migration*. Circ Res, 1990. **67**(3): p. 645-50.
33. Janssen, R., *Magnesium to counteract elastin degradation and vascular calcification in chronic obstructive pulmonary disease*. Med Hypotheses, 2017. **107**: p. 74-77.
34. Senni, K., A. Bertaud, and G. Godeau, *Magnesium and connective tissue*. Vol. 16. 2003: John Libbey Eurotext. 70-4.
35. Hu, T., et al., *Magnesium enhances the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting activated macrophage-induced inflammation*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3406.
36. Castiglioni, S., et al., *Burning magnesium, a sparkle in acute inflammation: gleams from experimental models*. Magnes Res, 2017. **30**(1): p. 8-15.
37. Cugno, M., et al., *Enhanced tissue factor expression by blood eosinophils from patients with hypereosinophilia: a possible link with thrombosis*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111862.
38. Ramirez, G.A., et al., *Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 9095275.
39. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
40. Riddle, J.M. and M.I. Barnhart, *The Eosinophil as a Source for Profibrinolysin in Acute Inflammation*. Blood, 1965. **25**: p. 776-94.
41. Chyrek-Borowska, S., D. Obrzut, and J. Hofman, *The relation between magnesium, blood histamine level and eosinophilia in the acute stage of the allergic reactions in humans*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1978. **26**(1-6): p. 709-12.
42. Badylak, S.F., et al., *Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(11): p. 1835-42.
43. Yu, T., V. Tutwiler, and K. Spiller, *The Role of Macrophages in the Foreign Body Response to Implanted Biomaterials*, in *Biomaterials in Regenerative Medicine and the Immune System*, T. Yu, V. Tutwiler, and K. Spiller, Editors. 2015, Springer, Cham. p. 17-34.
44. Brown, B.N., et al., *Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials*. Acta Biomater, 2012. **8**(3): p. 978-87.
45. Spiller, K.L., et al., *The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds*. Biomaterials, 2014. **35**(15): p. 4477-88.
46. Labonte, A.C., A.C. Tosello-Trampont, and Y.S. Hahn, *The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases*. Mol Cells, 2014. **37**(4): p. 275-85.
47. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
48. Braga, T.T., J.S. Agudelo, and N.O. Camara, *Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 602.

49. Yue, Y., et al., *M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20*. *Int J Cardiol*, 2017. **245**: p. 228-235.
50. Raiha, M.R. and P.A. Puolakkainen, *Tumor-associated macrophages (TAMs) as biomarkers for gastric cancer: A review*. *Chronic Dis Transl Med*, 2018. **4**(3): p. 156-163.
51. Ogino, T., et al., *Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163^{low} myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(6): p. 1380-91 e1.
52. Hilhorst, M., et al., *T cell-macrophage interactions and granuloma formation in vasculitis*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 432.
53. Poggi, A., et al., *Expression and function of NLRP1A molecule on human monocytes and dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(11): p. 2965-70.
54. Candel-Marti, M.E., et al., *Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2011. **16**(4): p. e518-21.
55. Kao, R.T., et al., *Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1995. **10**(6): p. 696-701.
56. Li, B., et al., *In vitro and in vivo responses of macrophages to magnesium-doped titanium*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 42707.
57. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance*. *Frontiers in Immunology*, 2014. **5**(614).
58. Schreiber, A. and F. Witte, *Immune response to nanobiomaterials*, in *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation*, M. Razavi and A. Thakor, Editors. 2017, Elsevier BV. p. 249-260.
59. Gui, N., et al., *The effect of ordered and partially ordered surface topography on bone cell responses: a review*. *Biomater Sci*, 2018. **6**(2): p. 250-264.
60. Thevenot, P., W. Hu, and L. Tang, *Surface chemistry influences implant biocompatibility*. *Curr Top Med Chem*, 2008. **8**(4): p. 270-80.
61. Firkowska-Boden, I., X. Zhang, and K.D. Jandt, *Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces*. *Adv Healthc Mater*, 2018. **7**(1).
62. Anselme, K., et al., *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **49**(2): p. 155-66.
63. Richert, L., et al., *Adsorption of proteins on nanoporous Ti surfaces*. *Surface Science*, 2010. **604**(17-18): p. 1445-1451.
64. Khampieng, T., et al., *Protein adsorption and cell behaviors on polycaprolactone film: The effect of surface topography*. *Advances in Polymer Technology*, 2018. **37**(6): p. 2030-2042.
65. Scopelliti, P.E., et al., *The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11862.
66. De Luca, A.C., et al., *Effect of microgrooved surface topography on osteoblast maturation and protein adsorption*. *J Biomed Mater Res A*, 2015. **103**(8): p. 2689-700.
67. Elter, P., R. Lange, and U. Beck, *Electrostatic and dispersion interactions during protein adsorption on topographic nanostructures*. *Langmuir*, 2011. **27**(14): p. 8767-75.
68. Ersek, R.A., *Molecular impact surface textured implants (MISTI) alter beneficially breast capsule formation at 36 months*. *J Long Term Eff Med Implants*, 1991. **1**(2): p. 155-69.
69. Wojciak-Stothard, B., et al., *Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behaviour*. *Cell Biol Int*, 1995. **19**(6): p. 485-90.
70. Kim, P., et al., *Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion*. *Nanotechnology*, 2005. **16**(10): p. 2420-6.
71. Keselowsky, B.G. and J.S. Lewis, *Dendritic cells in the host response to implanted materials*. *Semin Immunol*, 2017. **29**: p. 33-40.
72. Staiger, M.P., et al., *Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review*. *Biomaterials*, 2006. **27**(9): p. 1728-34.
73. Esmaily, M., et al., *Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion*. *Progress in Materials Science*, 2017. **89**: p. 92-193.

74. Witte, F., *The history of biodegradable magnesium implants: a review*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1680-92.
75. Fontenier, G., R. Freschard, and M. Mourot, *Study of the corrosion in vitro and in vivo of magnesium amodes involved in an implantable bioelectric battery*. Med Biol Eng, 1975. **13**(5): p. 683-9.
76. Ahmad Agha, N., et al., *The Degradation Interface of Magnesium Based Alloys in Direct Contact with Human Primary Osteoblast Cells*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0157874.
77. Zhang, J., et al., *Effect of macrophages on in vitro corrosion behavior of magnesium alloy*. J Biomed Mater Res A, 2016. **104**(10): p. 2476-87.
78. AZoM. *Magnesium Elektron WE43 Alloy (UNS M18430)*. 2013; Available from: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=9279>.
79. Torroni, A., et al., *Biocompatibility and degradation properties of WE43 Mg alloys with and without heat treatment: In vivo evaluation and comparison in a cranial bone sheep model*. J Craniomaxillofac Surg, 2017. **45**(12): p. 2075-2083.
80. Liu, D., et al., *Mechanical properties, corrosion resistance and biocompatibilities of degradable Mg-RE alloys: A review*. Journal of Materials Research and Technology, 2019. **8**(1): p. 1538-1549.
81. Witte, F., et al., *Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys*. J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(4): p. 1041-7.
82. Castellani, C., et al., *Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 432-40.
83. Zaichick, S., et al., *Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan*. Metallomics, 2011. **3**(2): p. 186-94.
84. Zhuang, M., et al., *Health risk assessment of rare earth elements in cereals from mining area in Shandong, China*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9772.
85. Nakamura, Y., et al., *Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats*. Fundam Appl Toxicol, 1997. **37**(2): p. 106-16.
86. Feyerabend, F., et al., *Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1834-42.
87. Pagano, G., *Rare Earth Elements in Human and Environmental Health: At the Crossroads Between Toxicity and Safety*. 1st ed. 2016: Jenny Stanford Publishing. 292.
88. Cui, L., et al., *Effects of dietary chitosan oligosaccharide complex with rare earth on growth performance and innate immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* L.* Aquaculture Research, 2013. **44**(5): p. 683-690.
89. Wolf, F.I. and A. Cittadini, *Chemistry and biochemistry of magnesium*. Molecular Aspects of Medicine, 2003. **24**(1): p. 3-9.
90. W, M., *Physiologie der Interaktion zwischen Kalium und Magnesium*. Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen, 2003: p. 5-7.
91. Talebian, S., et al., *Chitosan (PEO) bioactive glass hybrid nanofibers for bone tissue engineering*. RSC Advances, 2014. **4**: p. 49144-49152.
92. Ghosh, P., et al., *2,5-Dimethoxy 2,5-dihydrofuran crosslinked chitosan fibers enhance bone regeneration in rabbit femur defects*. Rsc Advances, 2014. **4**: p. 19516-19524.
93. Levengood, S.L. and M. Zhang, *Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering*. J Mater Chem B, 2014. **2**(21): p. 3161-3184.
94. Nandi, S.K., B. Kundu, and D. Basu, *Protein growth factors loaded highly porous chitosan scaffold: a comparison of bone healing properties*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(3): p. 1267-75.
95. Li, X., et al., *Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 387023.
96. Singla, A.K. and M. Chawla, *Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001. **53**(8): p. 1047-1067.
97. D'Almeida, M., et al., *Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications*. PloS one, 2017. **12**(12): p. e0189537-e0189537.

98. Bygd, H.C., K.D. Forsmark, and K.M. Bratlie, *The significance of macrophage phenotype in cancer and biomaterials*. Clin Transl Med, 2014. **3**(1): p. 62.
99. Hoemann, C.D. and D. Fong, *Immunological responses to chitosan for biomedical applications*, in *Chitosan Based Biomaterials*, J.A. Jennings and J.D. Bumgardner, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 45-79.
100. Ratner, B.D., *A History of Biomaterials*, in *Biomaterials Science*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Elsevier Inc. p. xli-liii.
101. Huang, J., *Design and Development of Ceramics and Glasses*, in *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, A. Vishwakarma and J.M. Karp, Editors. 2017, Academic Press. p. 315-329.
102. Day, R.M., *Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro*. Tissue Eng, 2005. **11**(5-6): p. 768-77.
103. Dong, X., J. Chang, and H. Li, *Bioglass promotes wound healing through modulating the paracrine effects between macrophages and repairing cells*. J. Mater. Chem. B, 2017. **5**.
104. Winter, M., et al., *Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells*. Nanotoxicology, 2011. **5**(3): p. 326-40.
105. Kang, K. and J.S. Lim, *Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles*. Immune Netw, 2012. **12**(3): p. 104-12.
106. Beamer, C.A. and A. Holian, *Silica suppresses Toll-like receptor ligand-induced dendritic cell activation*. FASEB J, 2008. **22**(6): p. 2053-63.
107. Hort, N., et al., *Magnesium alloys as implant materials--principles of property design for Mg-RE alloys*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1714-25.
108. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
109. Cordeiro-da-Silva, A., et al., *Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(4): p. 547-56.
110. Brown, B.N. and S.F. Badylak, *Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions*. Acta Biomater, 2013. **9**(2): p. 4948-55.
111. van Panhuys, N., et al., *Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2719-28.
112. Kubo, T., et al., *Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases*, in *Middleton's Allergy Essentials*, R.E. O'Hehir, S.T. Holgate, and A. Sheikh, Editors. 2017, Elsevier. p. 1-27.
113. Bussiere, F.I., et al., *Stress protein expression cDNA array study supports activation of neutrophils during acute magnesium deficiency in rats*. Magnes Res, 2002. **15**(1-2): p. 37-42.
114. Malpuech-Brugere, C., et al., *Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1501**(2-3): p. 91-8.
115. Van Orden, R., D.L. Eggett, and K.B. Franz, *Influence of graded magnesium deficiencies on white blood cell counts and lymphocyte subpopulations in rats*. Magnes Res, 2006. **19**(2): p. 93-101.
116. Park, C.J., et al., *The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8*. Biomaterials, 2009. **30**(4): p. 436-44.
117. Kirk, J.T., A.K. McNally, and J.M. Anderson, *Polymorphonuclear leukocyte inhibition of monocytes/macrophages in the foreign body reaction*. J Biomed Mater Res A, 2010. **94**(3): p. 683-7.
118. McCanna, D.J., A.V. Barthod-Malat, and M.B. Gorbet, *In vitro methods of assessing ocular biocompatibility using THP-1-derived macrophages*. Cutan Ocul Toxicol, 2015. **34**(2): p. 89-100.
119. Londono, R., et al., *The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(8): p. 2109-2118.
120. Brodaczevska, K., et al., *Biodegradable Chitosan Decreases the Immune Response to Trichinella spiralis in Mice*. Molecules, 2017. **22**(11).
121. Villiers, C., et al., *From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(6): p. 1252-64.

122. Guo, M., et al., *In vivo immuno-reactivity analysis of the porous three-dimensional chitosan/SiO₂ and chitosan/SiO₂/hydroxyapatite hybrids*. J Biomed Mater Res A, 2018. **106**(5): p. 1223-1235.
123. Verdijk, P., et al., *Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane*. Eur J Immunol, 2004. **34**(1): p. 156-64.
124. Hubert, F.X., et al., *Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7485-94.
125. Libako, P., et al., *Extracellular Mg concentration and Ca blockers modulate the initial steps of the response of Th2 lymphocytes in co-culture with macrophages and dendritic cells*. Eur Cytokine Netw, 2015. **26**(1): p. 1-9.
126. Liang, R.Y., et al., *Magnesium affects the cytokine secretion of CD4(+) T lymphocytes in acute asthma*. J Asthma, 2012. **49**(10): p. 1012-5.
127. Mbugi, E.V., et al., *Effect of nutrient deficiencies on in vitro Th1 and Th2 cytokine response of peripheral blood mononuclear cells to Plasmodium falciparum infection*. Malar J, 2010. **9**: p. 162.
128. McLeod, J.J., B. Baker, and J.J. Ryan, *Mast cell production and response to IL-4 and IL-13*. Cytokine, 2015. **75**(1): p. 57-61.
129. Tsai, Y.T., et al., *Optical imaging of fibrin deposition to elucidate participation of mast cells in foreign body responses*. Biomaterials, 2014. **35**(7): p. 2089-2096.
130. Brown, J.M., et al., *Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(1): p. 43-52.
131. Satpathy, S.R., et al., *Crystalline silica-induced leukotriene B4-dependent inflammation promotes lung tumour growth*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7064.
132. Usami, Y., et al., *Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(4): p. 517-22.
133. Horz, H.P., et al., *Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5332-7.
134. Maeda, H., et al., *Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, tetQ gene and total bacteria*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **39**(1): p. 81-6.
135. Cecchinato, F., et al., *Influence of Magnesium Alloy Degradation on Undifferentiated Human Cells*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142117.
136. Ojo, K., et al., *Conductivity as a Sensor for Monitoring Relative Magnesium Corrosion Rates in Real-time, in Serum-containing Media under Cell Culture Conditions*. Electroanalysis, 2016. **28**(12): p. 3000-3008.
137. Nicolaysen, P.H., et al., *Local and Systemic Toxicity in Mice Following Subcutaneous Implantation of Latex Penrose Drains*. Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology, 2004. **23**(4): p. 233-248.
138. Toft, P., et al., *The redistribution of granulocytes following E. coli endotoxin induced sepsis*. Acta Anaesthesiol Scand, 1994. **38**(8): p. 852-7.
139. Martineau, L. and P.N. Shek, *Changes in circulating lymphocyte subpopulations and mitogen-stimulated response in a rat infusion model of intra-abdominal infection*. Crit Care Med, 2000. **28**(7): p. 2515-21.
140. Case, C.P., et al., *Changes in the proportions of peripheral blood lymphocytes in patients with worn implants*. J Bone Joint Surg Br, 2000. **82**(5): p. 748-54.
141. Petter-Puchner, A.H., et al., *Adverse effects of porcine small intestine submucosa implants in experimental ventral hernia repair*. Surg Endosc, 2006. **20**(6): p. 942-6.
142. Sharkawy, A., et al., *Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties*. Journal of biomedical materials research, 1998. **40**(4): p. 586-97.

143. Hartmann, H., *Fremdkörper-Reaktionen auf Biomaterialien und Strategien zum Funktionserhalt von Implantaten*. BIOMaterialien, 2010. **11**(1): p. 15-23.
144. Heise, S., et al., *Electrophoretic deposition and characterization of chitosan/bioactive glass composite coatings on Mg alloy substrates*. Electrochimica Acta, 2017. **232**: p. 456-464.
145. Cipriano, A.F., et al., *Bone marrow stromal cell adhesion and morphology on micro- and sub-micropatterned titanium*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(4): p. 660-8.
146. Zhao, J.M., et al., *Modification of Ti implant surface for cell proliferation and cell alignment*. J Biomed Mater Res A, 2008. **84**(4): p. 988-93.
147. Yang, X., et al., *An Immune System-Modified Rat Model for Human Stem Cell Transplantation Research*. Stem Cell Reports, 2018. **11**(2): p. 514-521.
148. Gibbs, R.A., et al., *Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 493-521.
149. Lindblad-Toh, K., *Genome sequencing: three's company*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 475-6.
150. Hench, L.L., *The story of Bioglass*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(11): p. 967-78.
151. Park, J. and J.E. Babensee, *Differential functional effects of biomaterials on dendritic cell maturation*. Acta Biomater, 2012. **8**(10): p. 3606-17.
152. Witte, F., et al., *Degradable biomaterials based on magnesium corrosion*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2008. **12**(5): p. 63-72.
153. Landreth, K.S., *Critical windows in development of the rodent immune system*. Hum Exp Toxicol, 2002. **21**(9-10): p. 493-8.
154. Holsapple, M.P., L.J. West, and K.S. Landreth, *Species comparison of anatomical and functional immune system development*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2003. **68**(4): p. 321-34.

9. Abkürzungsverzeichnis

RM-F	Referenzmaterial-F
BG	Bioglas/Chitosan
BG-Si	Bioglas/Chitosan/Siliziumdioxid
FBGC	foreign body giant cell/ Fremdkörperriesenzellen
PMN	polymorphnukleäre Zellen
ZDEC	Zinkdiethyldithiocarbamat
x^{hi/+}	hohe Expressionsstärke
x^{low}	geringe Expressionsstärke
x⁻	keine Expression
TH1	Typ-1-T-Helferzelle
TH2	Typ-2-T-Helferzelle
TH17	Typ-17-T-Helferzelle
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
Treg	Regulatorische T-Zellen
s.c.	subkutan
i.m.	intramuskulär
CRP	C-reaktives Protein
TAC	total antioxidant capacity/ totale antioxidative Kapazität
MSC	mesenchymale Stammzellen
DC	Dendritische Zellen
NET	neutrophil extracellular traps/ neutrophile extrazelluläre Fallen
TLR	Toll-like-Rezeptor
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

10. Verzeichnis der erfolgten und anstehenden Publikationen

- Schreiber, A. and F. Witte, *Immune response to nanobiomaterials*, in *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation*, M. Razavi and A. Thakor, Editors. 2017, Elsevier BV. p. 249-260
- Krummsdorf S.; Schreiber A.; Beutler C.; Schmidt T.; Witte F. *The effect of biodegradable metals degradation on the foreign body response*. Conference Abstract. 9th Biometal Symposium on biodegradable metals for biomedical applications. eCM Journal, in press.
- Schmidt, T., Jungmann, M.-C.; Krummsdorf, S.; Schreiber, A.; Kronbach, Z.; Klemann, Ch.; Witte, F. *Flow cytometric assessment of systemic immune response to PEEK and magnesium implants in rats*.
- Schreiber, A; Krummsdorf, S.; Reiter, K; Beutler, C; Witte, F. *Immunological characterization of novel chitosan / bioglass coatings for biodegradable magnesium implants*.

11. Anhang

Tab. 3: Panel zur ergänzenden Untersuchung von der Expression der Marker CD86, CD43, CD4 und CD8 auf Leukozyten.

Spezifität	Klon	Format	Hersteller
RT1b	OX-6	BV510	BD Biosciences
CD161	10/78	BV786	
CD4	OX-35	PE-Cy5	
CD8	OX-8	BV605	
CD45	OX-1	BV711	
CD43	W3/13	PerCP-Cy5.5	BioLegend
CD86	24F	PE	eBioscience
CD172	OX41	APC	
Fixable Viability Dye eFluor™ 450		eFluor™ 450	BioRad
CD3	1F4	Alexa Fluor® 700	
CD163	ED2	FITC	
Granus	REA535	PE-Vio770	Miltenyi Biotec GmbH
CD68	REA237	APC-Vio 770(TM)	

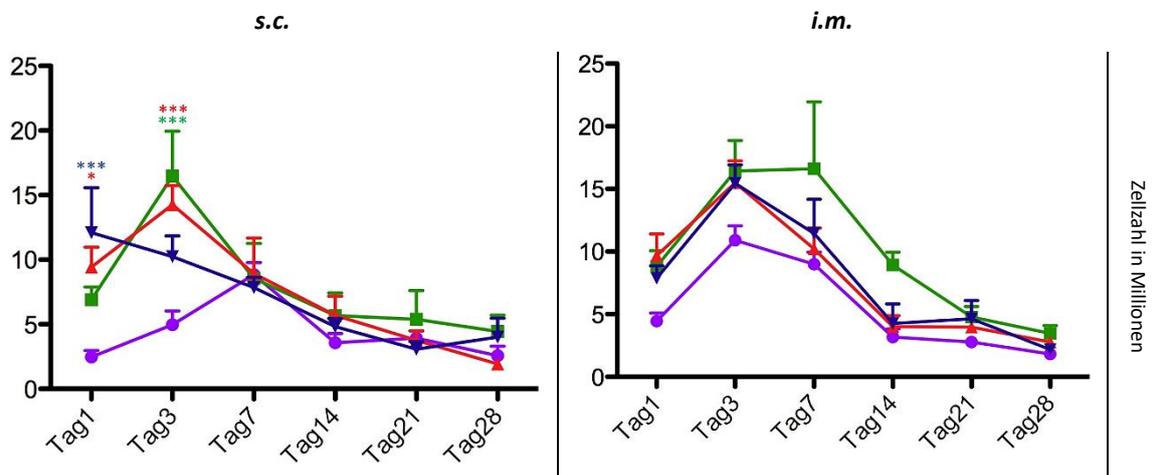


Abb. 20: Zellzahlen der Kapseln von WE43, RM-F, BG und BG-Si Tieren im Verlauf von 28 Tagen im subkutanen und intramuskulären Bereich. Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

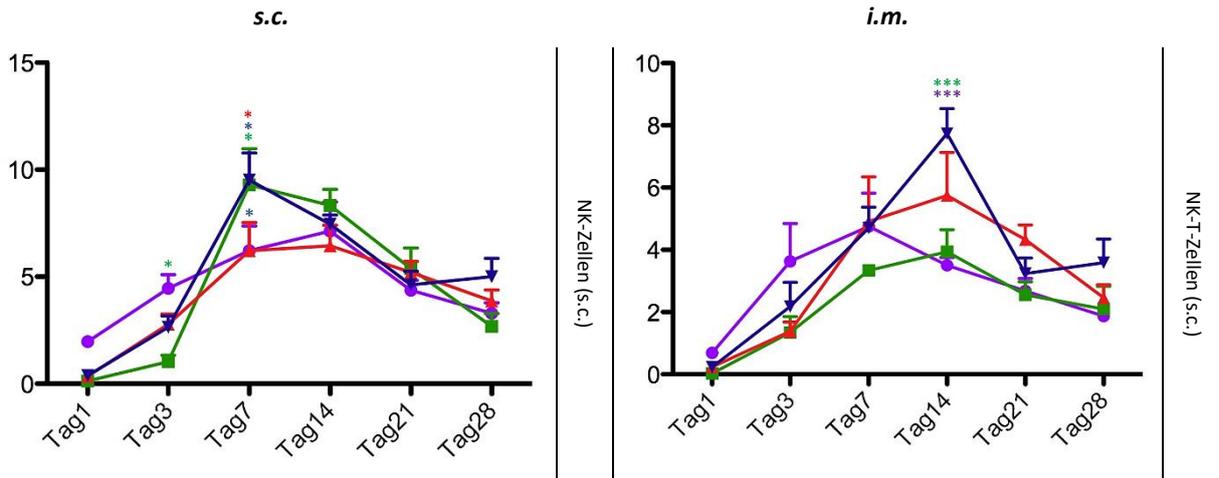


Abb. 21: Verlauf der NK- und NK-T-Zellen im subkutanen Bereich innerhalb von 28 Tagen. Legende: WE43 (violett), RM-F (grün), BG (rot), BG-Si (blau). 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

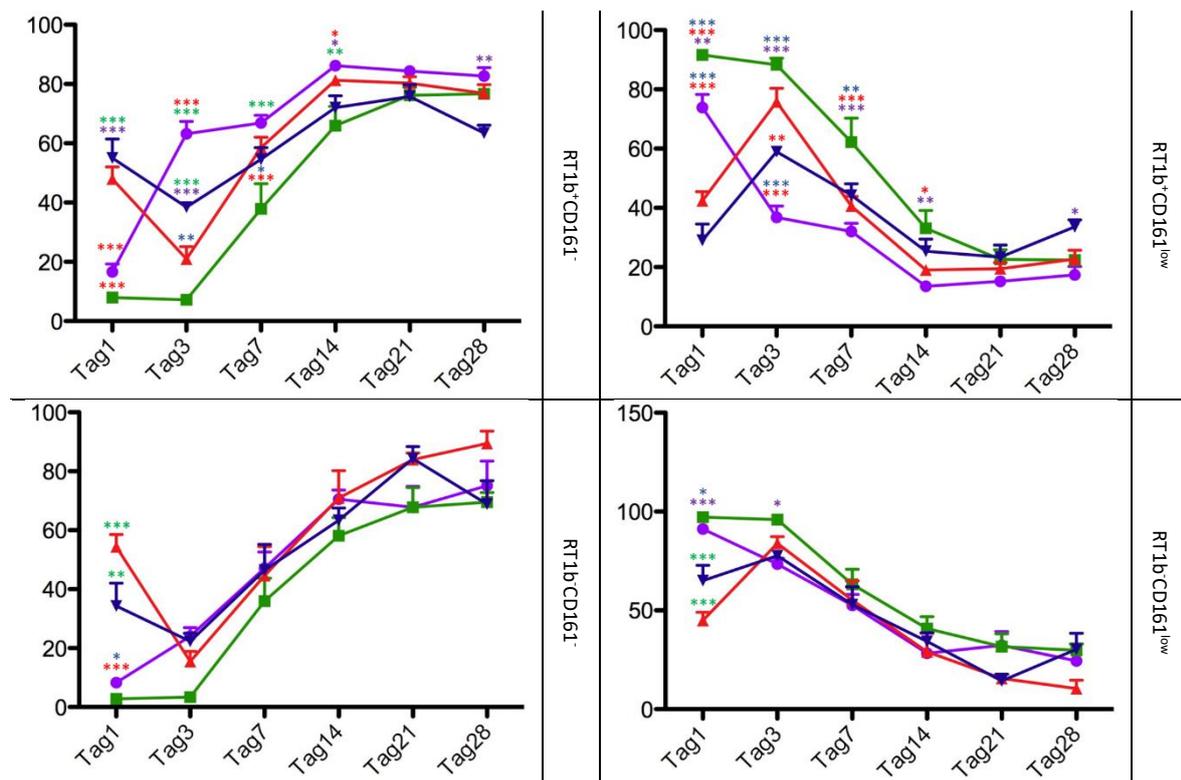


Abb. 22: Monozyten-Subpopulationen im 28-Tages-Verlauf aus der subkutanen Lokalisation (%Gated). Legende: WE43 (violett), RM-F (grün), BG (rot), BG-Si (blau). 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

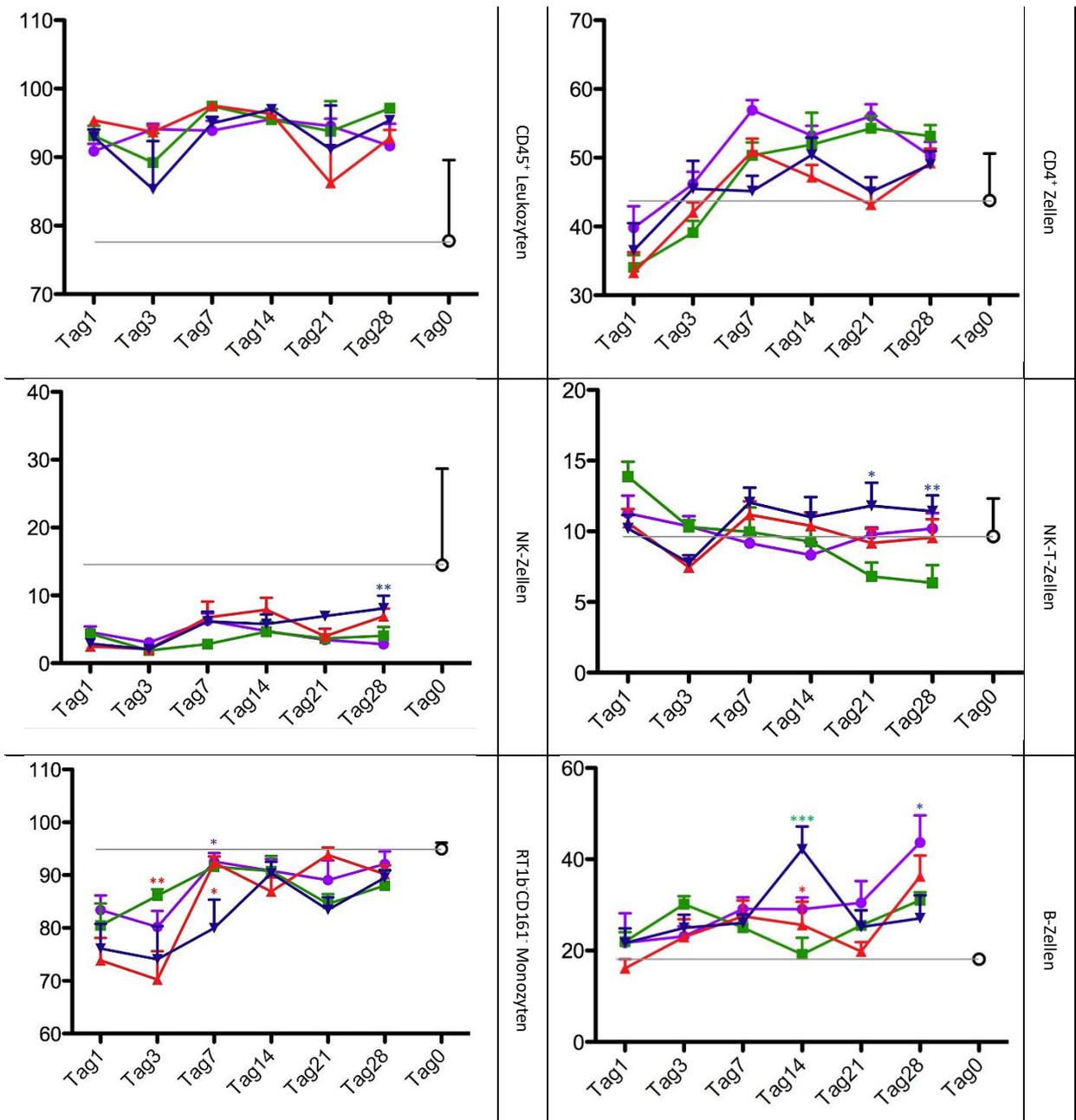
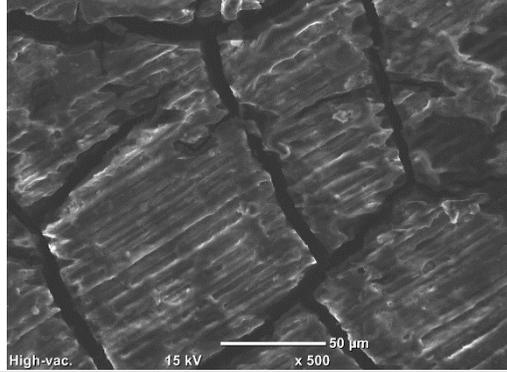
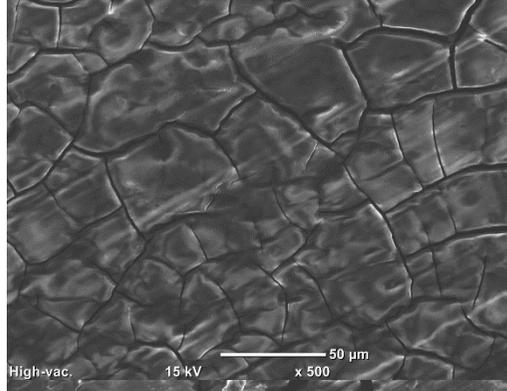
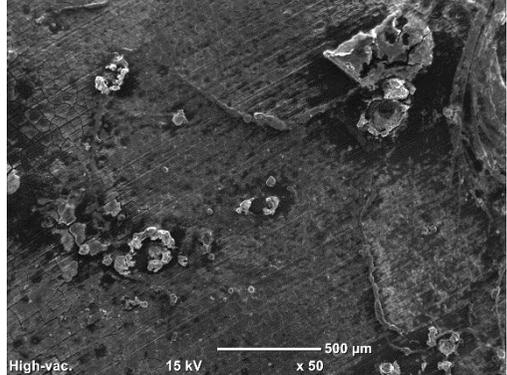


Abb. 23: CD45⁺, CD4⁺ Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen, RT1b/CD161⁺ Monozyten und B-Zellen im Verlauf von 28 Tagen im Blut.

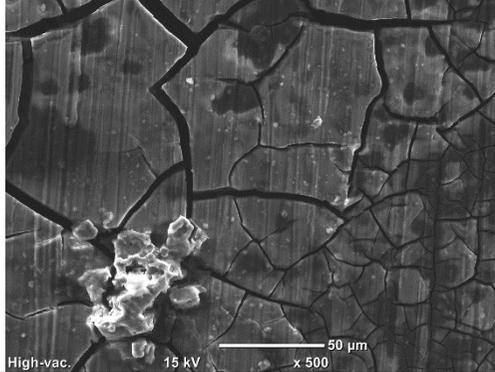
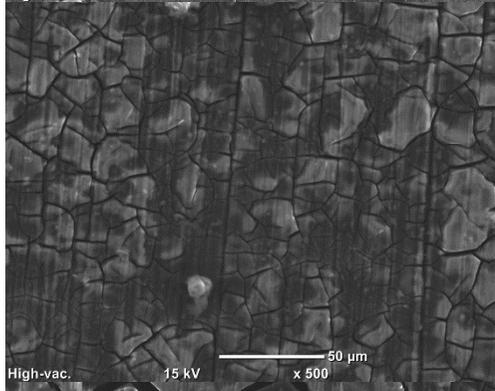
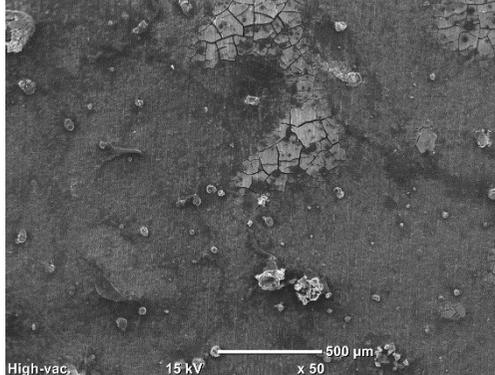
Legende: ● WE43 ■ RM-F ▲ BG ▼ BG-Si ○ untreated. 0,01 bis 0,05 schwach gesichert (signifikant)*.

3 Take

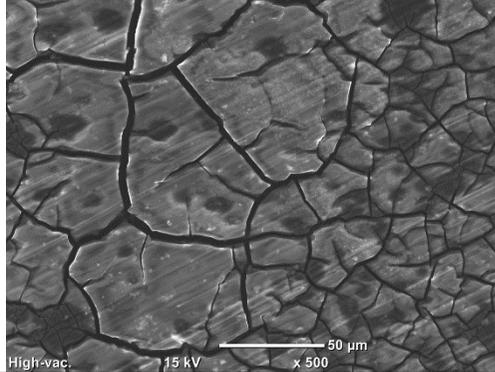
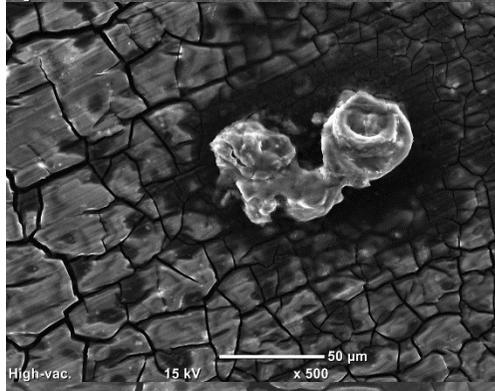
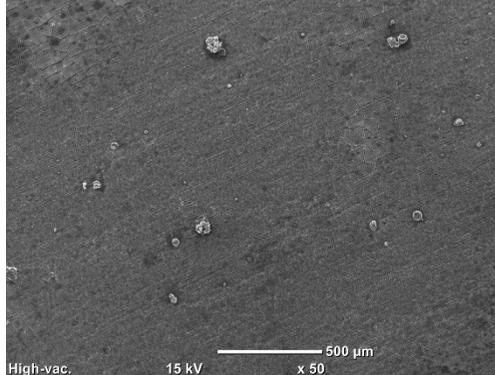
WE43



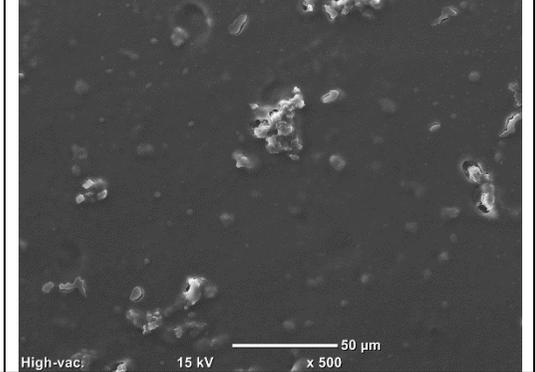
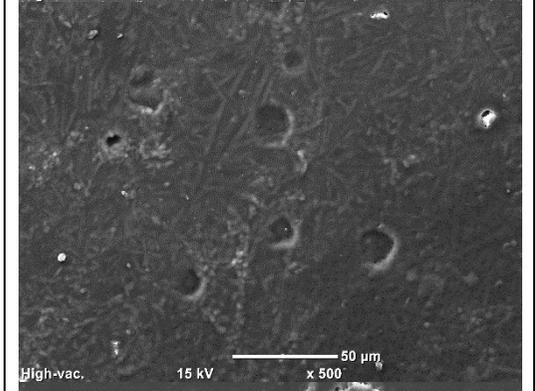
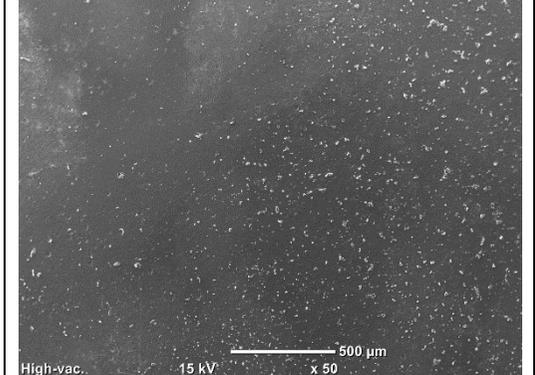
BG



BG-Si



RM-F



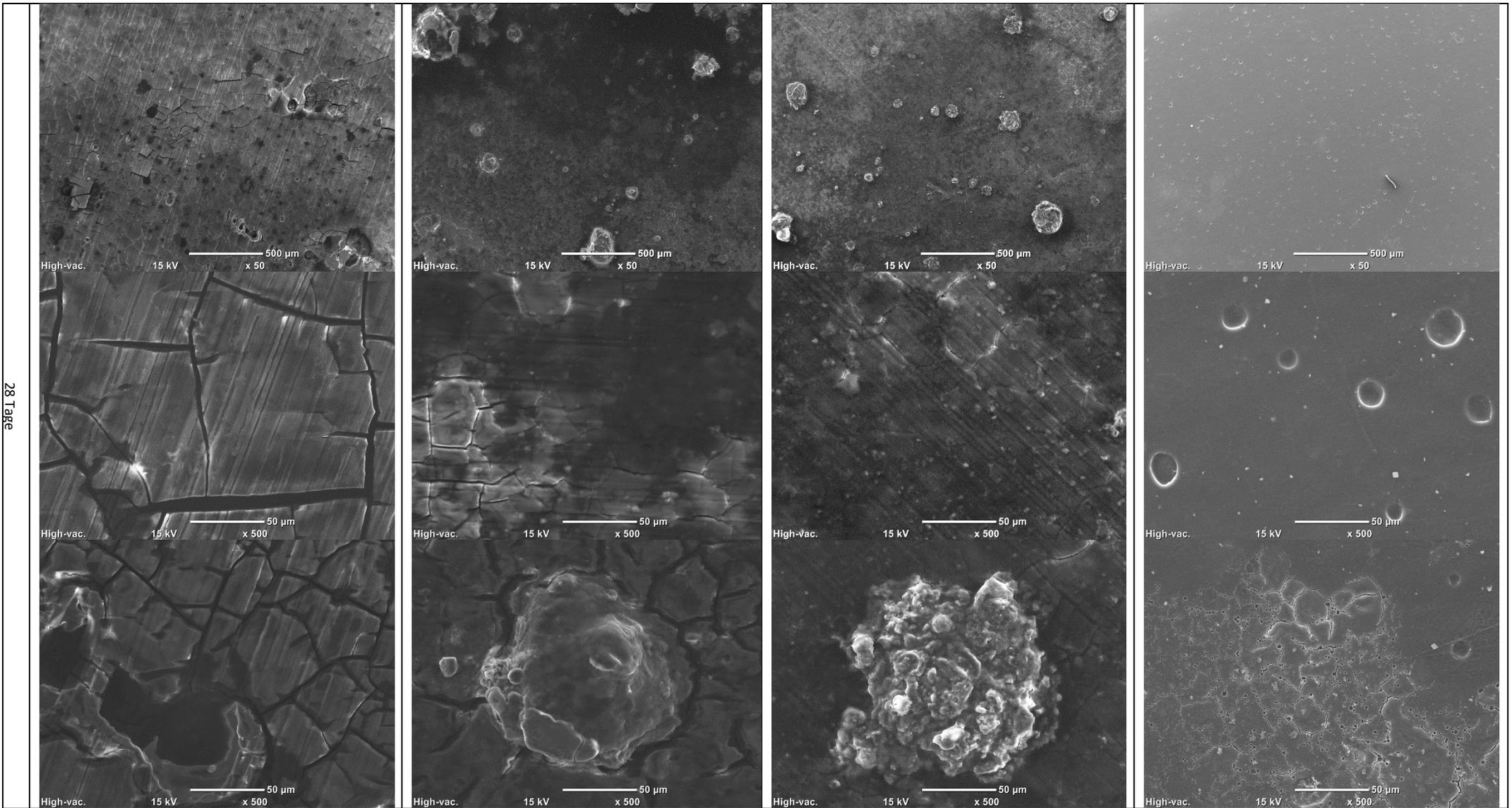
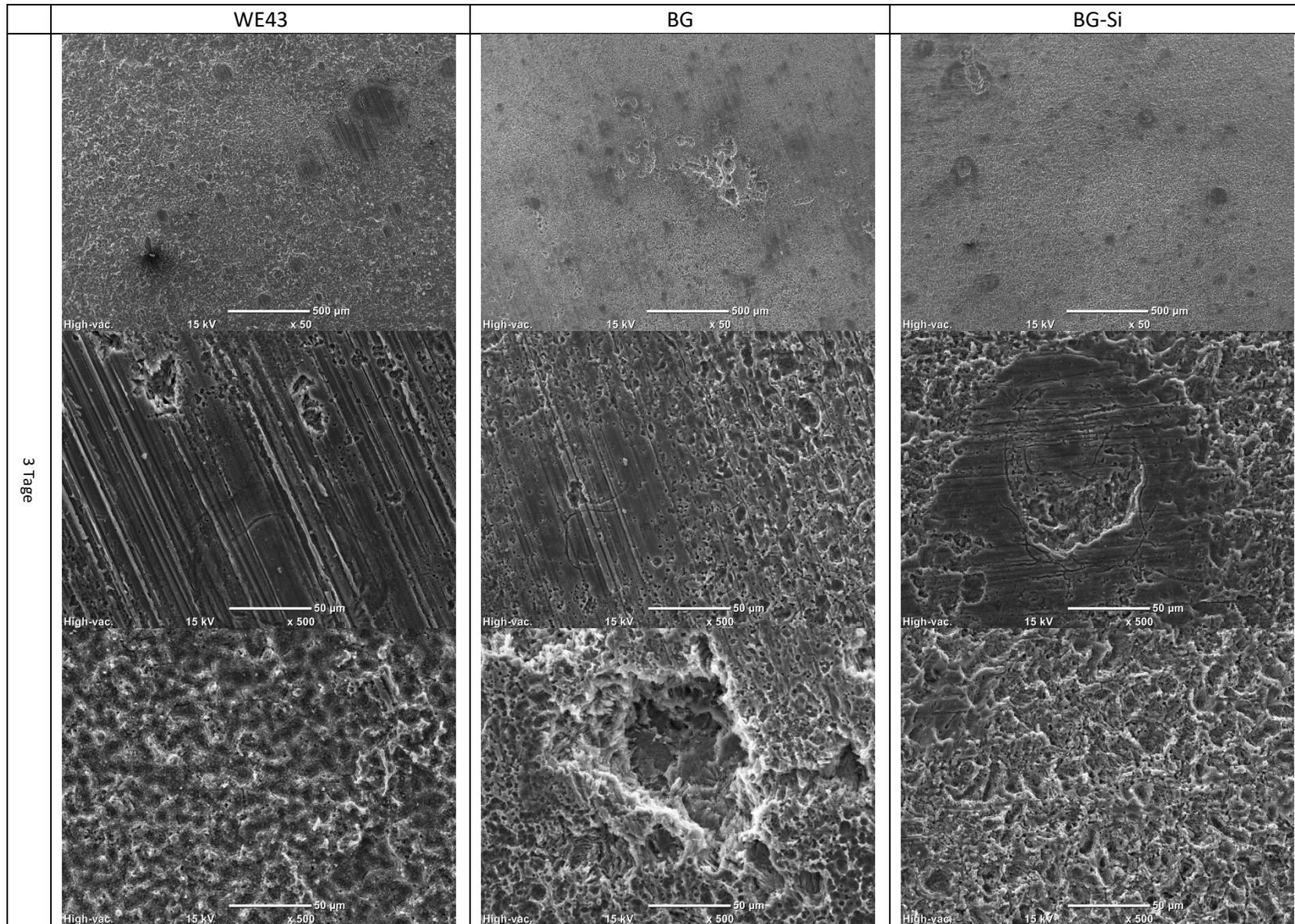


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von WE43, RM-F, BG und BG-Si nach einer 3 und 28 tägigen intramuskulären Implantation. Eine Übersichtsaufnahme (50x) mit zwei Detailaufnahmen (500x) sind gezeigt.



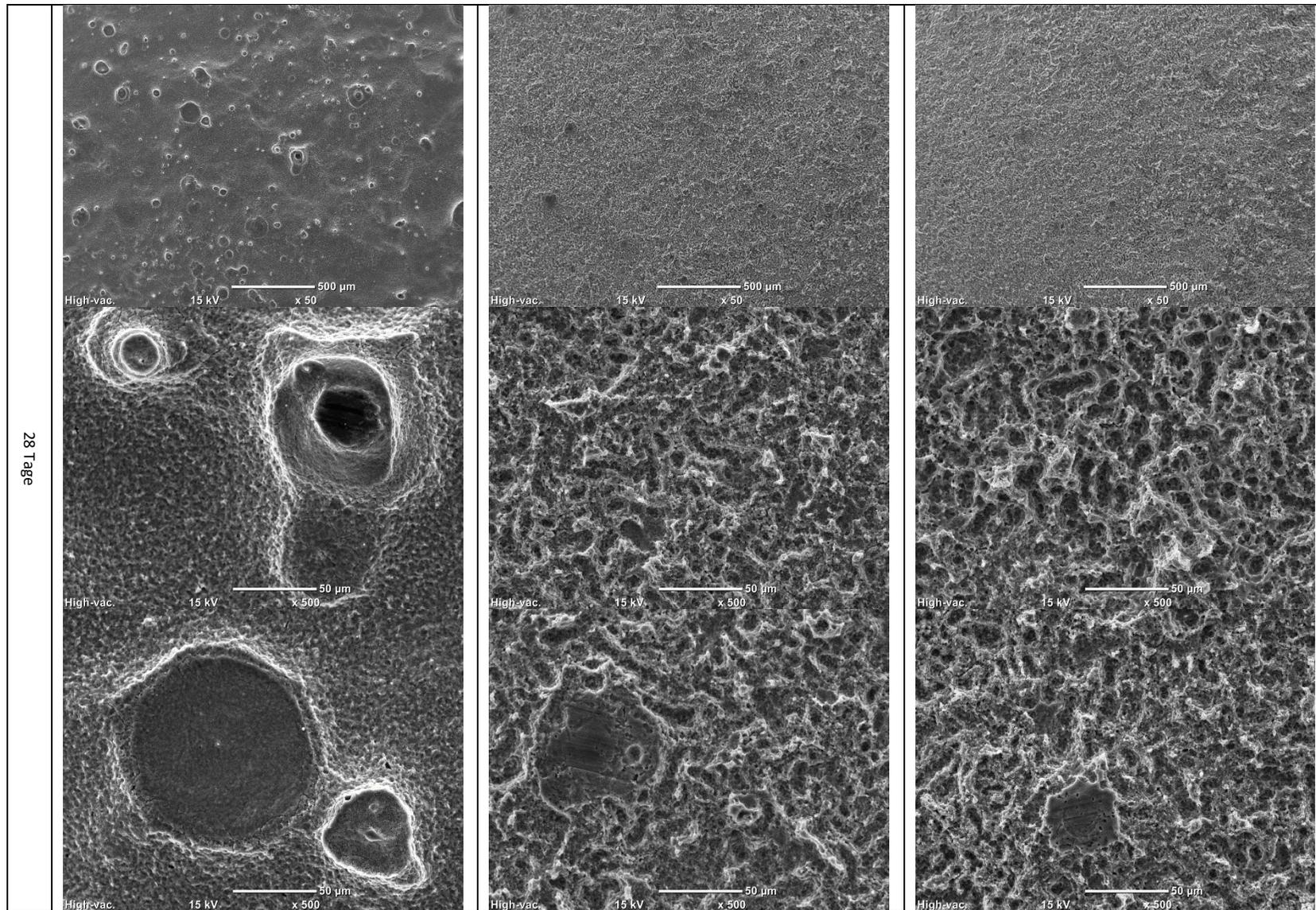


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von WE43, RM-F, BG und BG-Si Implantaten nach der Entfernung der Korrosionsschicht mittels Chrom (VI)-oxid-Lösung in der intramuskulären Lokalisation von Tag 3 und 28. Eine Übersichtsaufnahme (50x) mit zwei Vergrößerungen (500x) sind dargestellt.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht.

Berlin, den 09.06.2020