

Aus der Tierexperimentellen Einrichtung Charité -  
Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum  
und dem  
Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin

**Biokompatibilitätsprüfung eines Gelatine-PLGA-Scaffolds für die  
Knorpelregeneration im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Sarah Jeuthe

Tierärztin  
aus Berlin

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3575

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: PD Dr. C. Große-Siestrup  
Zweiter Gutachter: Univ-Prof. Dr. R. Klopffleisch  
Dritter Gutachter: PD Dr. G. Schulze-Tanzil

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
rats, cartilage, implantation, animal models

Tag der Promotion: 10.07.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-191-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
2.1 Knorpeldefekte und Degenerative Erkrankungen des Gelenkknorpels .....	2
2.2 Therapiemöglichkeiten.....	4
2.2.1 Konservative Therapiemöglichkeiten.....	4
2.2.2 Chirurgische Therapiemöglichkeiten .....	4
2.3 Tissue Engineering.....	6
2.3.1 Scaffolds für die Knorpelregeneration .....	7
2.4 Ratten als Versuchstiere .....	8
2.5 Medizinprodukte und Zulassungsverfahren .....	9
<b>3. Aufgabenstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Material, Tiere und Methoden</b> .....	<b>12</b>
4.1 Tiere und Tierhaltung.....	12
4.2 Implantate.....	12
4.2.1 Test-Scaffold .....	12
4.2.2 Kontroll-Scaffold .....	14
4.3 Versuchsaufbau .....	14
4.4 Ablaufpläne .....	16
4.4.1 Implantation .....	16
4.4.2 Klinischer Verlauf.....	17
4.4.3 Explantationen.....	17
4.5 Blutuntersuchungen.....	18
4.6 Gewichtserfassung .....	18
4.7 Histologie .....	18
4.7.1 Verwendete Färbung .....	18
4.7.2 Mikroskopische Untersuchungen.....	19
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
5.1 Klinische Ergebnisse .....	21
5.2 Gewichtserfassungen.....	21
5.3 Blutwerte .....	22
5.4 Histologische Ergebnisse .....	26
5.4.1 Zeitpunkt 2 Wochen .....	26
5.4.2 Zeitpunkt 4 Wochen .....	30
5.4.3 Zeitpunkt 8 Wochen .....	34
5.4.4 Zeitpunkt 12, 16 und 26 Wochen .....	37
5.4.5 Fazit.....	42
<b>6. Diskussion der histologischen Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>7. Zusammenfassung/Summary</b> .....	<b>47</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>52</b>
<b>10. Danksagung</b> .....	<b>53</b>
<b>11. Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>54</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Klassifikation von Knorpeldefekten nach Outerbridge.....	2
Abbildung 2.	REM Aufnahme (20x) des Test-Scaffolds .....	13
Abbildung 3.	REM Detailaufnahme (800x) des Test-Scaffolds .....	13
Abbildung 4.	Schematische Darstellung des Versuchsvorhabens mit Implantation und Explantationen.....	15
Abbildung 5.	Implantation des Gelatine-PLGA-Scaffolds .....	16
Abbildung 6.	Gewichtszunahme der Wistar Ratte mit steigendem Lebensalter .....	21
Abbildung 7.	Vergleichende Darstellung der Gewichtszunahme von den Prüf- und Kontrolltieren (n=83) über den gesamten Versuchszeitraum (Wochen nach Implantation).....	22
Abbildung 8.	Vergleichende Darstellung der Leukozytenkonzentration im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum.....	23
Abbildung 9.	Vergleichende Darstellung der Neutrophilen im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum .....	23
Abbildung 10.	Vergleichende Darstellung der Monozyten im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum .....	24
Abbildung 11.	Vergleichende Darstellung der Eosinophilen im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum .....	25
Abbildung 12.	Vergleichende Darstellung der Erythrozytenkonzentration im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum.....	25
Abbildung 13.	Histologische Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 79) des Gelatine- PLGA-Scaffolds 2 Wochen nach Implantation.....	26
Abbildung 14.	Histologische Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 72) des Kontrollimplantats Ethisorb <sup>®</sup> 2 Wochen nach Implantation.....	27
Abbildung 15.	Detailaufnahme (20x; HE; Tier 79) des Gelatine-PLGA-Scaffolds 2 Wochen nach Implantation.....	27
Abbildung 16.	Detailaufnahme (20x; HE; Tier 74) des Kontrollimplantates Ethisorb <sup>®</sup> 2 Wochen nach Implantation.....	28
Abbildung 17.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 2 Wochen nach der Implantation .....	29
Abbildung 18.	Gegenüberstellung der Zellgehalte von Probe- und Kontrolltieren .....	30
Abbildung 19.	Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 11) des Gelatine-PLGA-Scaffolds 4 Wochen nach Implantation.....	31
Abbildung 20.	Detailaufnahme (20x; HE Tier 12) des Gelatine-PLGA-Implantates 4 Wochen nach Implantation.....	31
Abbildung 21.	Detailaufnahme (20x; HE; Tier 2) des Kontrollimplantates 4 Wochen nach Implantation .....	32
Abbildung 22.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 4 Wochen nach der Implantation .....	33
Abbildung 23.	Gegenüberstellung der Zellgehalte von Probe- und Kontrolltieren .....	33

Abbildung 24.	Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 17) des Kontrollimplantates Ethisorb® 8 Wochen nach Implantation .....	34
Abbildung 25.	Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 27) des Testgewebereiches 8 Wochen nach Implantation.....	34
Abbildung 26.	Detailaufnahme (20x; HE; Tier 16) des Kontrollimplantates 8 Wochen nach Implantation .....	35
Abbildung 27.	Detailaufnahme (20x; HE; Tier 26) des Testgewebes 8 Wochen nach Implantation .....	35
Abbildung 28.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 8 Wochen nach der Implantation .....	36
Abbildung 29.	Vergleichende Darstellung der Zellgehalte von Prüf- und Kontrollgewebe 8 Wochen nach Implantation.....	37
Abbildung 30.	Übersichtsaufnahmen (20x, HE) des Testgewebes im zeitlichen Verlauf nach 12 (A; Tier 36), 16 (B; Tier 55) und 26 (C; Tier 69) Wochen .....	38
Abbildung 31.	Übersichtsaufnahmen (20x, HE) des Kontrollgewebes im zeitlichen Verlauf nach 12 (A; Tier 35), 16 (B; Tier 49) und 26 (C; Tier 63) Wochen.....	38
Abbildung 32.	Detailaufnahmen (40x, HE) des Testgewebes nach 12 (A; Tier 36) und 26 Wochen (B; Tier 68), sowie des Kontrollgewebes nach 12 (C; Tier 30) und 26 Wochen (D; Tier 59) .....	39
Abbildung 33.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 12 Wochen nach der Implantation .....	40
Abbildung 34.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 16 Wochen nach der Implantation .....	41
Abbildung 35.	Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 26 Wochen nach der Implantation .....	41

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.	Explantationszeitpunkt für jedes Kontrolltier (Ethisorb®) und jedes Testtier (Gelatine-PLGA-Scaffold).....	15
Tabelle 2.	Histologisches Punktbewertungssystem in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	19
Tabelle 3.	Histologisches Punktbewertungssystem - Reaktion - in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	20
Tabelle 4.	Vergleichende semiquantitative Auswertung der Implantate in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993 .....	20
Tabelle 5.	Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe- und Kontrollgewebes 2 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	29
Tabelle 6.	Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe- und Kontrollgewebes 4 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	32

---

Tabelle 7.	Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe- und Kontrollgewebes 8 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	36
Tabelle 8.	Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe- und Kontrollgewebes 12 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993 .....	40
Tabelle 9.	Histologisches Punktbewertungssystem (Zelltyp/Reaktion) aus DIN EN ISO 10993, Anhang E .....	52
Tabelle 10.	Histologisches Punktbewertungssystem (Reaktion) aus DIN EN ISO 10993, Anhang E .....	52
Tabelle 11.	Halbquantitatives Punktbewertungssystem aus DIN EN ISO 10993, Anhang E .....	52



---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
AMIC	Matrix-induzierte autologe Chondrogenese
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
HE	Hämatoxylin Eosin
MACT	Autologe matrix-assoziierte Chondrozyten- Transplantation
MPG	Medizinproduktegesetz
n	Anzahl
PDS	Polydioxanon
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglycolid
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
REM	Rasterelektronenmikroskop
Tab.	Tabelle



### **1. Einleitung**

Weltweit leiden Millionen von Menschen an Gelenkerkrankungen mit Knorpelschäden. Aufgrund des schlechten Eigenregenerationspotentials des Gelenkknorpelgewebes kommt es zu progressiven Gelenkschäden und möglicherweise Arthrosen. Diese führen oftmals zu schmerzhaften Funktionseinbußen des Gelenkes. Seit Jahren versucht man die Regenerationsfähigkeit von Gelenkknorpel zu unterstützen. Bisher gibt es allerdings sowohl mit konservativen, als auch mit chirurgischen Therapieansätzen keinen dauerhaften Erfolg. Am vielversprechendsten ist die erstmals 1994 von Brittberg beschriebene Methode der Autologen Chondrozyten-Transplantation (ATC). Hierbei werden in einem ersten Eingriff Chondrozyten aus dem Gelenk entnommen, *in vitro* vermehrt und in einem zweiten Eingriff in den Gelenkknorpeldefekt eingesetzt. In der Weiterentwicklung dieser Methode wurden Zellträger assoziierte Verfahren entwickelt. Diese dreidimensionalen resorbierbaren Scaffolds sollen den Zellen ein gerichtetes Wachstum und die Neubildung des Gewebes erleichtern. Bisher ist allerdings noch kein Trägermaterial gefunden worden, das alle an ein Scaffold gestellten Anforderungen erfüllt.

Um solch ein neues Medizinprodukt auf den Markt zu bringen, bedarf es der behördlichen Zulassung. Für diese müssen die Materialien verschiedene *in vitro* und *in vivo* Tests durchlaufen, die die Unbedenklichkeit des Medizinproduktes beweisen, bevor es für eine klinische Studie zugelassen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neues Trägermaterial auf seine Gewebeverträglichkeit *in vivo* getestet werden. Gewebeverträglichkeits-Screenings sind nach bisherigem Kenntnisstand nicht mit Ersatzmethoden zum Tierversuch untersuchbar. Im Rattenmodell wird das neue, auf Gelatine und PLGA basierende Scaffold, mit einem bereits etablierten Scaffold (Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade) mit bekannter Biokompatibilität gemäß DIN EN ISO 10993 verglichen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Knorpeldefekte und Degenerative Erkrankungen des Gelenkknorpels

Knorpeldefekte gehen mit Schmerzen und Funktionseinbußen des Gelenkes einher (Pelttari, Wixmerten et al. 2009). Umschriebene Knorpeldefekte können durch Traumata, lokal begrenzte Arthrosen oder *Osteochondrosis dissecans* verursacht werden. Man unterscheidet chondrale Knorpeldefekte, die sich in ihrer Tiefe auf den Gelenkknorpel beschränken, von osteochondralen Knorpeldefekten, bei denen der subchondrale Knochen ebenfalls betroffen ist (Bruns, Steinhagen 2000). Die Klassifikation von Knorpeldefekten hinsichtlich ihrer Schweregrade erfolgt nach Outerbridge (Outerbridge 1961, Erggelet, 2000):

Grad 0:	intakter Gelenkknorpel, glatte weiße Oberfläche, gute Konsistenz
Grad I:	Erweichung der Knorpeloberfläche, glatt erhaltene Oberfläche ohne Schädigung oder Fibrillation
Grad II:	oberflächliche Schichten aufgeraut und deutliche Fibrillation, < 50 % Läsionstiefe
Grad III:	tiefe, makroskopisch erkennbare Fissuren bis in die Matrix, > 50 % Läsionstiefe, subchondraler Knochen nicht betroffen
Grad IV:	Zerstörung des Knorpels bis zum subchondralen Knochen und darüber hinaus

Abbildung 1. Klassifikation von Knorpeldefekten nach Outerbridge

Der hyaline Gelenkknorpel hat eine nur geringe Regenerationskapazität (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000). Daher können unbehandelte Defekte sich progressiv verschlechtern und zu Arthrose führen (Bruns, Steinhagen 2000). Die Heilungstendenz ist je nach Tiefe des Defektes unterschiedlich. Da chondrale Defekte keine Verbindung zu dem Knochenmark haben und Knorpelgewebe keine Vaskularisation aufweist, ist die Heilungstendenz nur gering. Es können nur keine mesenchymale Zellen den Defekt besiedeln und durch die fehlende Blutversorgung können auch keine Entzündungszellen einwandern. Osteochondrale Defekte haben durch den subchondralen Knochendefekt Zugang zum Knochenmark und dem Blutgefäßsystem. Somit können mesenchymale Zellen aus dem Knochenmark einwandern

und Reparaturgewebe ausbilden (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000). Das neugebildete Gewebe weist allerdings nur Chondrozyten-ähnliche Zellen und vornehmlich Typ-I-Kollagen auf und ähnelt in Struktur und Qualität eher dem Faserknorpel als dem hyalinen Gelenkknorpel (Scharf, Rüter et al. 2009). Dieser ist in Funktion und Stabilität nicht vergleichbar mit hyalinem Knorpel. Gelenkknorpel hat demnach durch seine Avaskularität, fehlende Innervation und Lymphgefäßversorgung sowie der geringen Zellularität ein schlechtes Regenerationsvermögen (Bruns, Steinhagen 2000).

Zu den degenerativen Erkrankungen des Knorpels gehört vor allem die Arthrose. Arthrose wird definiert als über den altergemäßen Verschleiß hinausgehender Verlust von Gelenkknorpel und damit assoziierte sub- und perichondrale Veränderungen von Knochen und Synovialmembran (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2011). Sie ist primär eine nicht entzündliche Erkrankung des Gelenkes. Klinisch ist sie gekennzeichnet durch Anlauf- oder Belastungsschmerzen, Bewegungseinschränkung und intraartikuläre Ergussbildung.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Arthrose. Die primäre Arthrose ist idiopathischer Genese, während die sekundäre Arthrose durch mechanische Überbelastung, entzündliche Vorgänge oder auf metabolische Störungen zurückzuführen ist. Beiden gemein ist der Knorpelverlust.

Initial findet immer eine Veränderung der Knorpelmatrix mit einhergehender Chondromalazie statt. Der Gelenkknorpel wird durch degenerierende Chondrozyten, den Verlust an Proteoglykanen, vermindertem Kollagen Typ II Umsatz und erhöhtem Wassergehalt weich (Martinek 2003). Er hat somit eine erhöhte Empfänglichkeit für Schäden und ist den physiologischen Belastungen eines Gelenkes nicht mehr gewachsen. Es entstehen erste tangential Fissuren. Im fortschreitenden degenerativen Prozess kommt es zu Erosionen der oberflächlichen Knorpelschichten. Durch den beim Knorpelabbau entstehenden Detritus kommt es zu einem Entzündungsreiz im Gelenk. Entzündungszellen wandern ein und geben Entzündungsmediatoren ab, die wiederum zu Knorpelabbau führen; ein *Circulus vitiosus* entsteht. Durch den immer fortschreitenden Knorpelverlust kommt es schließlich auch zu Veränderungen des perichondralen und subchondralen Knochens (Martinek 2003). Der Knorpelverlust führt zu einer erhöhten Belastung des subchondralen Knochens, was Sklerosierungen und Zystenbildungen bedingt (Martinek 2003, Zacher 2000).

### **2.2 Therapiemöglichkeiten**

#### **2.2.1 Konservative Therapiemöglichkeiten**

Ziel der konservativen Therapie ist eine Schmerzlinderung für den Patienten und eine Funktionsverbesserung des Gelenks. Die medikamentöse Schmerzlinderung wird in erster Linie durch eine Verminderung der Entzündungsreaktion erreicht (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000). Nichtsteroidale Antiphlogistika und Corticoide können hierfür herangezogen werden. Die physikalische Therapie mobilisiert das Gelenk und stärkt die umgebende Muskulatur. Des Weiteren versucht man durch zahlreiche Nahrungssubstitute und Diäten das Gelenk positiv zu beeinflussen. Hyaluronsäure, Glukosamin und Chondroitin sind die häufigsten Beispiele. Diese sind Bestandteile des Gelenkknorpels und der Synovialflüssigkeit. So ist beispielsweise das Biopolymer Hyaluronsäure ein elementarer Bestandteil der Knorpelmatrix und der Synovia. Es hat eine hohe Wasserspeicherkapazität und ist somit für die Elastizität des Knorpels und als Filter in Gelenkflüssigkeit von Bedeutung (Engelhardt 2003). Die konservativen Therapiemöglichkeiten stellen für die Patienten meist eine Verbesserung der Lebensqualität dar, eine Geweberegeneration oder Defektfüllung konnte aber bisher aber nicht nachgewiesen werden (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000).

#### **2.2.2 Chirurgische Therapiemöglichkeiten**

##### *Pridie-Bohrung und Mikrofrakturierung*

Sowohl die Pridie-Bohrung als auch die Mikrofrakturierung zählen zu den knochenmarkstimulierenden Techniken. Hierbei wird die Knochenplatte unter dem Knorpeldefekt perforiert um einen Zugang zum Knochenmark zu ermöglichen und die intrinsischen Reparaturmechanismen anzuregen. Durch den geschaffenen Zugang zur Vaskularisation können mesenchymale Stammzellen einwandern und Faserknorpel schaffen. Die klinischen Ergebnisse sind allerdings sehr unterschiedlich (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000).

##### *Osteochondrale Transplantate*

Bei dieser Methode setzt man allogene oder autologe Gelenkknorpeltransplantate mit dem dazugehörigen subchondralen Knochen in den Knorpeldefekt ein um eine Defektfüllung zu erreichen. Die Transplantate werden dafür aus gering belasteten Gelenksbereichen entnommen und mosaikartig in den Defekt eingesetzt. Daher wird dieses Verfahren auch Mosaikplastik oder *Osteochondral Autograft Transfer System* genannt. Der Eingriff wird

arthroskopisch durchgeführt und zeigt gute Ergebnisse. Limitierend sind allerdings die Verfügbarkeit von Transplantatmengen bei größeren Defekten und die fragliche Belastbarkeit der zusammengesetzten Knorpelfragmente (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000, Wendler, Gellißen et al. 2006).

### *Weichteiltransplantate*

Bei dieser Methode füllt man den Knorpeldefekt mit Perichondrium bzw. Periost auf, das zuvor von den Rippen entnommen wurde. Somit soll der Defekt zum einen gefüllt und verschlossen werden, zum anderen enthält das Perichondrium pluripotente Stammzellen die Chondrozyten hervorbringen können. Die Erfolgsaussichten sind allerdings variabel und lassen mit dem Patientenalter nach (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000).

### *Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT)*

Bei der ACT wird der Knorpeldefekt mit autologen Chondrozyten aufgefüllt. Dafür wird zunächst arthroskopisch ein kleines Knorpelfragment entnommen. Aus diesem werden die Chondrozyten isoliert, *in vitro* vermehrt und anschließend wieder in den Knorpeldefekt replantiert. Der Defekt wird dann mit einem Periostlappen und Fibrin verschlossen. Die Chondrozyten redifferenzieren und bilden hyalinartigen Knorpel (Erggelet, Mandelbaum et al. 2000). Dieses Verfahren wurde 1994 von Brittberg etabliert (Brittberg M, Nilsson et al. 1994). Problematisch bei diesem Verfahren ist das Wachstumsverhalten der Zellen *in vitro* (Wendler, Gellißen et al. 2006). Dieses führte zur Weiterentwicklung des Verfahrens mit an ein Trägermaterial gekoppeltem Wachstum, welches den Chondrozyten ein redifferenziertes Wachstum ermöglichen soll.

### *Matrix-assoziierte autologe Chondrozyten-Transplantation (MACT)*

Die MACT ist die Weiterentwicklung der ACT. Die autologen Chondrozyten werden hierbei auf ein Trägermaterial aufgebracht und mit diesem replantiert. Dadurch verkürzt sich zum einen die Operationszeit und da der Defekt nicht mehr mit Periost verschlossen werden muss, entfällt auch der kleinere Eingriff zum Gewinnen des Periosts. Das dreidimensionale Trägermaterial gibt dem neu heranwachsendem Gewebe Struktur. Es gibt bereits verschiedene Trägermaterialien aus verschiedenen Materialien, die als Zellträger für die MACT genutzt werden.

### *Autologe matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC)*

Bei dieser Methode wird der Defekt mit einem zellfreien Trägermaterial aufgefüllt. Allerdings wird vor der Implantation des Trägermaterials die subchondrale Knochenplatte perforiert und somit den mesenchymalen Stammzellen die Möglichkeit gegeben in das Material einzuwandern und zu Knorpelzellen zu differenzieren. Da man bei diesem Verfahren nur noch einen Eingriff vornehmen muss, ist es wesentlich Patienten- und Kostenschonender (Wendler, Gellißen et al. 2006).

### **2.3 Tissue Engineering**

Der Begriff des *Tissue Engineering* wurde erstmals 1988 von der National Science Foundation wie folgt definiert:

„Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“ (Skalak et.al. 1988).

Das *Tissue Engineering* stellt somit eine Verbindung der Ingenieur-, Werkstoff- und Biowissenschaften dar und hat das Ziel neue funktionierende Gewebe zu generieren, bestehende Gewebe zu erhalten oder deren Regenerationspotential zu verbessern. Damit zählt es zu den Technologien der regenerativen Medizin. Es basiert auf dem Wissen über die embryologischen Ursprünge der Gewebe, der Gewebeausbildung und deren Regenerationsvermögen (Kneser, Schaefer et al. 2006).

Für die Herstellung der Gewebe benötigt das *Tissue Engineering* drei wesentliche Grundbausteine. Zum einen funktionelle, gewebespezifische Zellen, zum Beispiel aus Biopatmaterial, dreidimensionale Trägerstrukturen (Scaffolds) und Bioreaktoren, in denen die Zellen auf die Matrix aufgetragen werden und reifen können. Man unterscheidet zwei Möglichkeiten für die Defektbehandlung. Zum einen kann man per Biopsie entnommene Zellen enzymatisch isolieren und *in vitro* vermehren. Diese werden dann auf das Scaffold aufgetragen und nach einer Zeit der Reifung im Bioreaktor in einem zweiten Eingriff in den Defekt eingebracht um die Neubildung des Gewebes anzuregen.

Zum anderen kann man auch unbesiedelte resorbierbare Trägerstrukturen in den Defekt einsetzen. Diese sollen dann durch die Zellen aus der Umgebung besiedelt werden. Der Körper wird sozusagen als Bioreaktor genutzt, was für den Patienten den Vorteil hat, nur



einen Eingriff durchführen lassen zu müssen (Winkler 2009). In den folgenden Abschnitten soll ein kurzer Überblick über die derzeit vorhandenen Scaffolds für die Knorpelregeneration geschaffen werden.

### **2.3.1 Scaffolds für die Knorpelregeneration**

Die Anforderungen an ein ideales Trägermaterial sind vielfältig. Idealerweise ist das Scaffold ein dreidimensionales hochporöses Konstrukt mit untereinander vernetzten Poren. Es sollte biokompatibel sein und eine kontrollierbare Degradation haben (Hutmacher 2000). Nicht nur das Trägermaterial selbst, auch dessen Abbauprodukte dürfen in keiner Weise toxisch sein. Es sollte nicht immunogen wirken und möglichst keine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion hervorrufen (Gaissmaier, Fritz et al. 2003) und sollte eine geeignete Oberfläche für die Zellemigration, Zelladhäsion, Interaktion und Differenzierung besitzen (Lee, Oh et al. 2009). Des Weiteren muss es eine geeignete mechanische Stabilität und Schutz für die einwandernden Zellen bieten (Stoop 2008). Außerdem sollte das Material leicht zu sterilisieren sein (Gaissmaier, Fritz et al. 2003), in der Praxis eine einfache Handhabung aufweisen und eine gute Kosteneffizienz zeigen (Kim, Ahn et al. 2007).

Es sind bereits zahlreiche sowohl natürliche als auch synthetische Materialien für die Herstellung von Scaffolds für die Knorpelregeneration getestet worden. Vorteile von Trägermaterialien natürlichen Ursprungs sind vor allem, dass sie oftmals Bestandteile des Körpers sind und somit eine geeignete Oberflächenbeschaffenheit für die Zelladhäsion und Interaktion aufweisen (Chung, Burdick 2008). Darüber hinaus sind die Abbauprodukte physiologisch und nicht toxisch. Nachteilig bei Scaffolds aus natürlichen Materialien ist vorrangig die Beschaffung, das Aufbereiten und Herstellen der Materialien (Stoop 2008). Des Weiteren können sie Immunreaktionen auslösen und Krankheiten übertragen (Chung, Burdick 2008, Stoop 2008). Ebenfalls nachteilig ist oftmals der schnelle Verlust der Stabilität durch die enzymatische Degradierbarkeit der Materialien (Chung, Burdick 2008, Lee, Singla et al. 2001). Als Vertreter natürlicher Materialien für die Herstellung von Gerüstmaterialien sind vor allem Kollagene, Hyaluronsäure, Gelatine, Fibrin, Chitosan, Zellulose, Agarose und Alginat zu nennen (Chung, Burdick 2008, Stoop 2008).

Der Vorteil von synthetischem Material als Scaffold ist vor allem die flexible Formbarkeit (Stoop 2008) und die mechanische Stabilität, die diese Materialien bieten (Gaissmaier, Fritz et al. 2003). Weiterhin sind sie in ihrer Degradationsrate gut kontrollierbar (Kim, Ahn et al.

2007). Nachteilig ist in erster Linie die Gefahr einer starken Fremdkörper- und Entzündungsreaktion. Sowohl das Material selbst, als auch seine Abbauprodukte dürfen nicht zytotoxisch wirken. Die Biokompatibilität wird oft durch die sauren Abbauprodukte der Materialien herabgesetzt (Chung, Burdick 2008). Am meisten verwendet und untersucht für das *Tissue Engineering* von Knorpel sind bisher Polylactide (PLA), Polyglycolide (PGA) und ihre Kopolymere Polylactid-co-Glycolid (PLGA) (Kim, Ahn et al. 2007), aber auch Polyethylenglykol (PEG) und Polyurethan (Chung, Burdick 2008).

Die verschiedenen Materialien, die derzeit für die Herstellung von Trägermaterialien für die Knorpelregeneration genutzt werden zeigen verschiedene Vor- und Nachteile. Ein ideales Trägermaterial für die Knorpelregeneration das alle Vorteile vereint ist bisher noch nicht gefunden worden (Chung, Burdick 2008, Hutmacher 2000, Schneider 2003, Gaissmaier, Fritz et al. 2003, Hunziker EB. 1999).

### **2.4 Ratten als Versuchstiere**

Die Ratte wird seit mehr als hundert Jahren als Versuchstier eingesetzt und ist heute eines der am weit verbreitetsten Tiermodelle überhaupt (Iannaccone 2009). 2010 wurden in Deutschland 442.448 Ratten für wissenschaftliche Zwecke genutzt. Damit ist sie nach der Maus, das am häufigsten eingesetzte Versuchstier überhaupt (BMELV 2010). Im Vergleich zu anderen Tieren bringt die Ratte als Versuchstier zahlreiche Vorteile mit. Einerseits besitzt die Ratte durch ihre kleine Größe und ihre Fortpflanzungseigenschaften eine besonders gute Kosten-Nutzen-Effizienz. So kann man sie besonders gut für Versuche mit hohen Tierzahlen oder Langzeitstudien einsetzen. Andererseits ist die Ratte aber auch, insbesondere im Vergleich zur Maus, groß genug, um sie für chirurgische Tiermodelle einsetzen zu können. Auch als Arthrosemodell wird sie gerne verwendet. (Gerwin, Bendele et al. 2010, Ameye, Young 2006). Insgesamt ist sie im Vergleich zur Maus vom Genom her dem Menschen ähnlicher. So stimmen 40% des Erbguts und 90% der Gene mit dem Menschen überein und es konnte bisher für fast alle krankheitsbestimmenden Gene des Menschen eine Entsprechung bei der Ratte gefunden werden, was die Ratte als Modelltier besonders interessant macht (Lindblad-Toh 2004, Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004, Iannaccone, Jacob 2009). Auch die Gewebeverträglichkeit und die Physiologie der Ratte sind der des Menschen ähnlicher als die der Maus ([o. Verf.], 2010, Ivics, Izsvák et al. 2010).

Aus all diesen Gründen wurde für diese Studie die Ratte als Versuchstier gewählt. Außerdem empfiehlt die DIN EN ISO 10993 kleine Labornager als Versuchstiere für erste Gewebeerträglichkeitsscreenings. Die Ratte passt von den kleinen Labornagern auch größentechnisch am besten zu dem zu untersuchenden Gelatine-PLGA-Scaffold.

### **2.5 Medizinprodukte und Zulassungsverfahren**

Rechtliche Grundlagen für Medizinprodukte im europäischen Raum sind die Richtlinien 93/42/EWG für Medizinprodukte, 90/385/EWG für aktive implantierbare Medizinprodukte und 98/79/EG für In-vitro-Diagnostika. Das Medizinproduktegesetz (MPG) setzt diese drei Richtlinien in nationales Recht um. Die zuständigen Bundesoberbehörden sind das Bundeinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte und das Deutsche Institut für medizinische Dokumentation und Information (Volk, Klüß 2010). Medizinprodukte sind laut 93/42/EWG, Artikel 1 (2) a definiert als „alle einzeln oder miteinander verbunden verwendete Instrumente, Apparate, Vorrichtungen, Stoffe oder andere Gegenstände, einschließlich der für ein einwandfreies Funktionieren des Medizinprodukts eingesetzten Software, die vom Hersteller zur Anwendung für Menschen für folgende Zwecke bestimmt sind:

- Erkennung, Verhütung, Überwachung, Behandlung oder Linderung von Krankheiten;
- Erkennung, Überwachung, Behandlung, Linderung oder Kompensierung von Verletzungen oder Behinderungen;
- Untersuchung, Ersatz oder Veränderung des anatomischen Aufbaus oder eines physiologischen Vorgangs;
- Empfängnisregelung, und deren bestimmungsgemäße Hauptwirkung im oder am menschlichen Körper weder durch pharmakologische oder immunologische Mittel noch metabolisch erreicht wird, deren Wirkungsweise aber durch solche Mittel unterstützt werden kann“.

Alle Medizinprodukte, mit Ausnahme der aktiv implantierbaren Medizinprodukte und der in-vitro-Diagnostika, werden nach den Regeln in Anhang IX der Richtlinie 93/42/EWG in vier Risikokategorien eingeteilt, I (Is für sterile Medizinprodukte und Im für Produkte mit Messfunktion), IIa, IIb und III.

Bei Unstimmigkeiten über die Klassifizierung zwischen dem Hersteller und einer benannten Stelle, hat die benannte Stelle die Entscheidung der Bundesoberbehörde einzuholen (Medizinproduktegesetz §13, Absatz 2). Damit ein Hersteller ein Medizinprodukt Inverkehrbringen darf, bedarf es eines Konformitätsbewertungsverfahrens, um zu beweisen,

dass die „Grundlegenden Anforderungen“ (MPG, § 6 und 7) eingehalten wurden. Ein Zulassungsverfahren wie bei Arzneimitteln gibt es jedoch nicht (Volk, Klüß 2010). Je nach Klassifizierung des Medizinproduktes kann dieses in Eigenverantwortung des Herstellers (nur Klasse I) oder durch eine „benannte Stelle“ (MPG, § 3, Nr. 20) geschehen. Eine benannte Stelle ist eine unabhängige Zertifizierungsstelle, die von einem Vertragsstaat benannt wurde, um Konformitätsbewertungsverfahren durchzuführen (§3 MPG, § 3, Nr. 20). Werden alle Anforderungen an das Produkt erfüllt erhält es die CE-Kennzeichnung. Medizinprodukte bedürfen einer CE-Kennzeichnung um im europäischen Raum verkehrsfähig zu sein. Aus dieser Kennzeichnung geht die Übereinstimmung des Produktes mit der Richtlinie 93/ 42/ EWG hervor. Um eine CE-Kennzeichnung zu bekommen, muss der Hersteller also die klinische Unbedenklichkeit in Form von Daten aus klinischen Studien beweisen (Volk, Klüß 2010). Dies gilt insbesondere für Implantate und Produkte der Klasse III (Anhang X, 93/42/EWG). Dafür gibt es die Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten (MPKPV), aus der insbesondere hervorgeht, dass präklinische Daten Voraussetzung für die Durchführung einer klinischen Studie sind (§3 MPKPV, Absatz 2, Nr. 3).

Zum Erfassen von präklinischen Daten von Medizinprodukten gibt es die DIN EN ISO 10993. Dies ist eine Reihe von verschiedenen Normen zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten. Zielsetzung dieser Normen ist insbesondere die Beurteilung der Verträglichkeit der eingesetzten Materialien im Körper (Biokompatibilität). Sie beschreibt unter anderem geeignete Prüfverfahren und die Grundsätze für die biologische Beurteilung von Medizinprodukten (Bogdanski 2005). In dieser Arbeit wurde insbesondere Teil 6 der DIN EN ISO 10993 (Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantationen) herangezogen, um die Biokompatibilität des Implantates zu untersuchen.

#### **3. Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist die Prüfung der Biokompatibilität eines neuartigen Trägermaterials für die Knorpelregeneration. Im Rattenmodell soll das Material mit dem bereits etablierten Material Ethisorb<sup>®</sup> verglichen werden. Dazu werden die Gewebestrukturen um die Scaffolds histologisch auf Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen untersucht. Die Ergebnisse werden an Hand der DIN EN ISO 10993, einer ISO Normreihe zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten, ausgewertet und bewertet. Mit Hilfe dieser Ergebnisse soll geklärt werden, ob das neue Trägermaterial für die Anwendung in präklinischen Studien geeignet ist.

Konkrete Aufgaben, die sich aus der Aufgabenstellung und Zielsetzung ergeben, sind die Mithilfe bei der Durchführung des Tierversuches (84 Implantationen), Mitarbeit bei der postoperativen Überwachung und Protokollierung, sowie der tierschutzgerechten Tötung und Probenentnahme. Im Anschluss an den Tierversuch, die Auswertung der histologischen Schnitte in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993.

## 4. Material, Tiere und Methoden

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 84 weibliche weiße Wistar Ratten. Die Tiere wurden mit einem Alter von 5-7 Wochen erworben und stammen von Harlan Winkelmann GmbH (Gartenstraße 27, 33178 Borcheln, Deutschland). Bei der Ankunft lag das Gewicht aller Tiere zwischen 200 und 224 g. Die Tiere wurden in der Tierexperimentellen Abteilung der Charite Berlin (Tierexperimentelle Einrichtung Charité Universitätsmedizin Berlin; Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin), in Gruppen zu je 5 Tieren in den regelkonformen Haltungseinrichtungen untergebracht. Die Gruppen wurden nach dem Zufallsprinzip zusammengestellt. Jeder Käfig wurde mit den einzelnen Tiernummern, der Gruppennummer, der Projektnummer, Tierspezies und Gattung sowie dem Datum der Im- und Explantation versehen. Alle Tiere wurden gemeinsam in einem Raum der Tierhaltung untergebracht. Dieser wurde wie jede einzelne Haltungseinrichtung in regelmäßigen Abständen gereinigt und desinfiziert. Die Temperatur im Raum betrug 22 °C, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei etwa 60 % und die Licht/Dunkelphasen hatten einen 12/12 h Rhythmus.

Die Ratten wurden *ad libitum* mit Pellets<sup>1</sup> der Firma Sniff Spezialdiäten GmbH gefüttert. Das Trinkwasser wurde mit Hilfe von Trinkflaschen ebenfalls *ad libitum* bereitgestellt. Das ausreichende Vorhandensein von Trinkwasser wie Futter wurde täglich von den Tierpflegern kontrolliert. Der Boden der Käfige wurde mit Streu ausgebettet. Des Weiteren erhielten die Tiere Papierrollen (*Environmental Enrichment*) zur Beschäftigung.

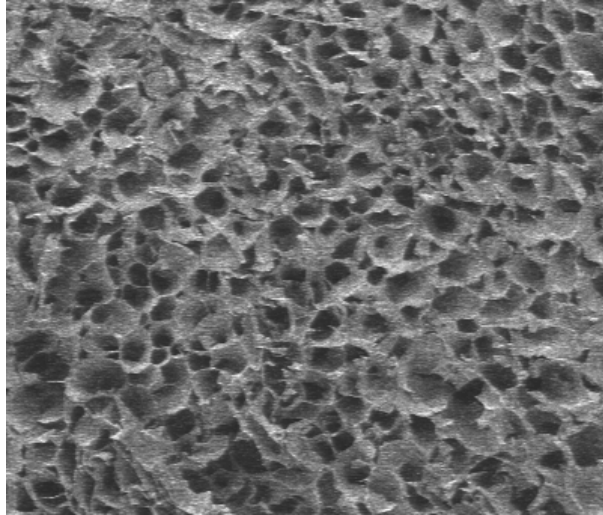
### 4.2 Implantate

#### 4.2.1 Test-Scaffold

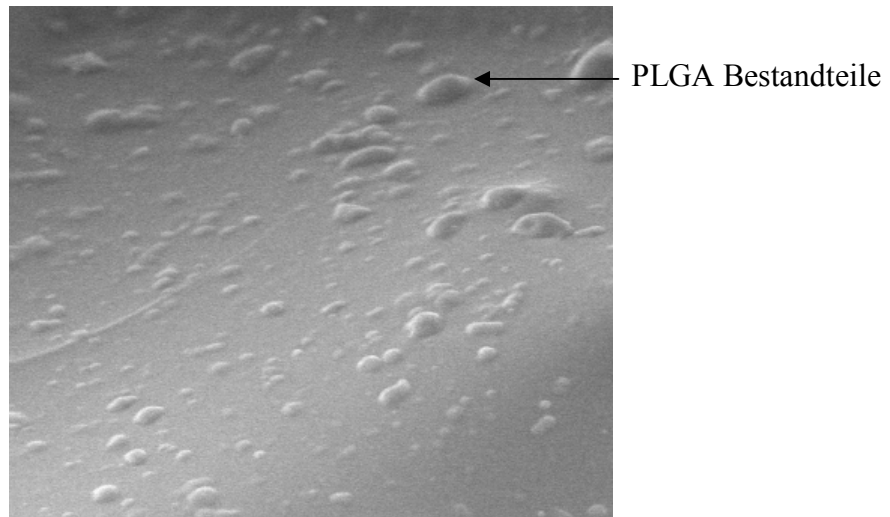
Bei dem zu prüfenden Trägermaterial (Scaffold) handelte es sich um ein Kompositmaterial aus Gelatine und Polylactid-co-Glycolid (PLGA) (Abb. 3). Die Herstellung des Scaffolds erfolgte nach einem neuen patentierten Verfahren (Zehbe et al. 2010) durch gerichtetes Einfrieren einer Gelatine-PLGA-Suspension mit anschließender Gefriertrocknung und thermischer Vernetzung.

---

<sup>1</sup> Firma Sniff Spezialdiäten GmbH (Experimental Animal Diets Ltd., 59494 Soest, Germany), ssniff K-H, Ered, 4 mm, V2373-000



**Abbildung 2. REM Aufnahme (20x) des Test-Scaffolds**



**Abbildung 3. REM Detailaufnahme (800x) des Test-Scaffolds**

Die so hergestellten Gelatine-PLGA-Scaffolds waren von zylindrischer Form, mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 3 mm (Abb. 2). Die Porengröße der vorwiegend parallel ausgerichteten Poren lag bei  $160 \pm 100 \mu\text{m}$ . Chondrozyten weisen eine durchschnittliche Größe von  $20 \mu\text{m}$  auf und haben somit genügend Platz, um in die Poren einzuwandern. Die offene Porosität lag bei 94,5 %, was bedeutet, dass der Materialanteil nur 5,5 % des gesamten Volumens des Scaffolds ausmachte. In Vorversuchen ist das Scaffold bereits genauer charakterisiert worden und insbesondere im Hinblick auf seine Zytotoxizität in *in vitro* Versuchen gemäß DIN EN ISO 10993 getestet worden (Thiem 2011). Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche zeigten keine Hinweise auf zytotoxische Effekte.

### 4.2.2 Kontroll-Scaffold

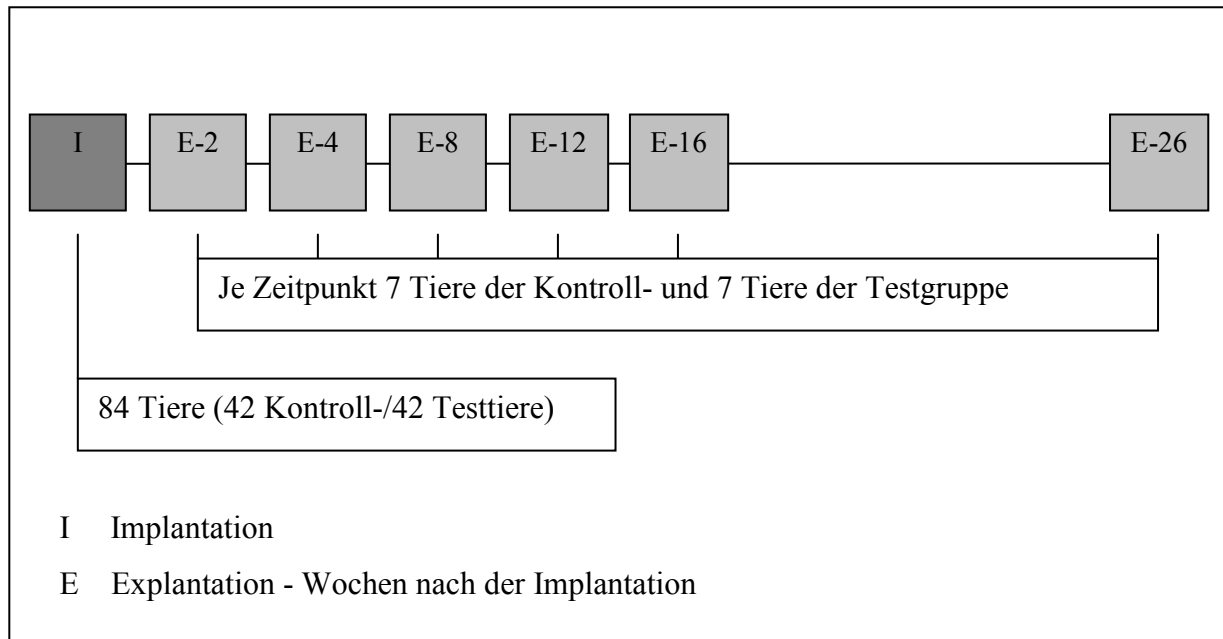
Bei dem Kontrollmaterial handelt es sich um die bereits zugelassene Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade der Firma Ethicon. Das resorbierbare Ethisorb<sup>®</sup> Vergleichsmaterial ist ein Komposit aus Polyglactin 910 (Vicryl) und Poly-p-dioxanon (PDS), das eine vliesartige Struktur ausweist. Es hat eine Resorptionszeit von 90-180 Tagen und wird mit einer guten Biokompatibilität angegeben (Ethicon). Histologisch lassen sich die PDS Anteile bis 180 Tage nach der Implantation nachweisen. Die Resorption des Vicryl ist im Wesentlichen nach 90 Tagen abgeschlossen. Klinisch wird es vorwiegend in der Oralchirurgie zur Hämostase bei Knochendefekten eingesetzt.

### 4.3 Versuchsaufbau

Um die Biokompatibilität des Gelatine-PLGA Scaffolds *in vivo* zu prüfen, wurde für eine Langzeitimplantationsstudie ein Rattenmodell genutzt. Die Studie wurde in der tierexperimentellen Abteilung der Charité Berlin nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo-Nr: G 0445/08) durchgeführt. Jeweils die Hälfte der Tiere bekam den zu beurteilenden Gelatine-PLGA Scaffold (Test-Scaffold) bzw. die Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade (Kontroll-Scaffold) subkutan am Rücken implantiert. Diese wurden anschließend nach unterschiedlich langen Zeitspannen, zwischen 2 und 26 Wochen wieder entnommen, um das den Scaffold umgebene Gewebe histologisch aufzuarbeiten. Die Proben wurden dann in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-6 (Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation) ausgewertet.

Für die Studie wurden die insgesamt 84 Tiere in 2 Gruppen unterteilt. 42 Tiere wurden für die Implantation der Gelatine-PLGA Scaffolds genutzt und die anderen 42 Tiere für die Implantation des Kontrollmaterials Ethisorb<sup>®</sup>.





**Abbildung 4. Schematische Darstellung des Versuchsvorhabens mit Implantation und Explantationen**

Insgesamt wurden sechs verschiedene Zeitpunkte beobachtet: 2, 4, 8, 12, 16 und 26 Wochen. Für jeden Zeitpunkt gab es je sieben Tiere denen das Kontrollmaterial Ethisorb<sup>®</sup> und sieben Tiere denen das Prüfmaterial subkutan auf den Rücken implantiert wurde.

**Tabelle 1. Explantationszeitpunkt für jedes Kontrolltier (Ethisorb<sup>®</sup>) und jedes Testtier (Gelatine-PLGA-Scaffold)**

Gruppe	Tier Nr.	Explantationszeitpunkt (Wochen post OP)					
		2	4	8	12	16	26
Ethisorb <sup>®</sup>	71-77	7					
	1-7		7				
	15-21			7			
	29-35				7		
	43-49					7	
	57-63						7
Testmaterial	78-84	7					
	8-14		7				
	22-28			7			
	36-42				7		
	50-56					7	
	64-70						7

### 4.4 Ablaufpläne

In den folgenden Abschnitten wird der genaue Ablauf der Implantation, des klinischen Verlaufes und der Explantationen gezeigt (Abb. 4; Tab. 1).

#### 4.4.1 Implantation

Die Implantation fand in der tierexperimentellen Abteilung der Charité Berlin statt. Bei Ankunft der Tiere in der Tierhaltung wogen die Ratten zwischen 200 g und 224 g. Die Implantation wurde im Anschluss an eine einwöchige Eingewöhnungsphase für die Tiere durchgeführt. Am Tag der Implantation wurden die Ratten erneut auf ihren Gesundheitszustand geprüft und gewogen. Sie hatten nun ein durchschnittliches Gewicht von 225 g. Die Tiere wurden zunächst in sechs Gruppen zu je 14 Tieren aufgeteilt. Von diesen bekamen immer jeweils sieben Tiere das Prüfmaterial und sieben Tiere das Kontrollmaterial<sup>2</sup> implantiert. Dazu wurden die Tiere zunächst zum Scheren, Markieren, Blutabnehmen<sup>3</sup> und Wiegen<sup>4</sup> mit Inhalationsnarkose (1 % O<sub>2</sub>; 2,5-5 % Isofluran) narkotisiert.

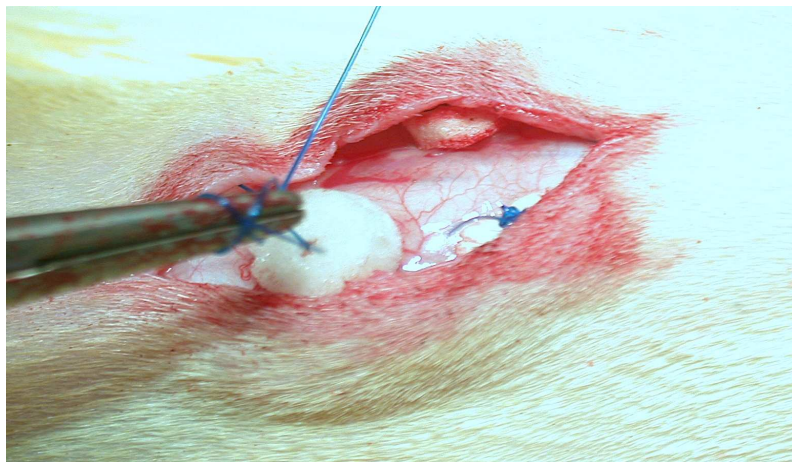


Abbildung 5. Implantation des Gelatine-PLGA-Scaffolds

Nach der Vorbereitung der Tiere, erfolgte eine zweite Narkotisierung der Tiere mit Isofluran<sup>5</sup>, um die Materialien zu implantieren. Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion der Rückenhaut mit Jod<sup>6</sup> wurde zunächst mittig-dorsal ein ca. 2 cm langer Hautschnitt<sup>7</sup> gesetzt.

---

<sup>2</sup> Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade, Ethicon.

<sup>3</sup> Kanülen und Spritzen, Becton Dickinson, Fanklin Lakes, USA.

<sup>4</sup> Analyse Waagen, Sartorius, Göttingen.

<sup>5</sup> Isofluran, Forene<sup>®</sup>, Fa. Abbot.

<sup>6</sup> Braunol<sup>®</sup>, Braun, Melsungen.

<sup>7</sup> Skalpelle, Braun, Melsungen.

Dann erfolgte die Präparation von vier subkutanen Taschen in die anschließend vier Scaffolds (je vier Test- bzw. Kontrollcaffolds) eingesetzt wurden. Diese wurden dann mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial<sup>8</sup> an der Rückenmuskulatur fixiert (Abb. 5). Der nichtresorbierbare Faden sollte später helfen die Lage der Scaffolds bei der Explantation und der histologischen Auswertung zu bestimmen. Abschließend wurde der Hautschnitt mit Einzelheften aus demselben Nahtmaterial vernäht, die Wunde gereinigt und mit einem Pflaster<sup>9</sup> abgedeckt. Bis zum vollständigen Erwachen standen die Tiere unter permanenter Beobachtung.

### 4.4.2 Klinischer Verlauf

In den folgenden Tagen wurden die Tiere adspektorisch beobachtet. Sie zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten und einen guten Wundschluss. Eine Woche nach der Operation wurden alle Tiere noch einmal gewogen um einen Rückschluss auf den Gesundheitszustand zu bekommen. Auch hier zeigten sich keine Auffälligkeiten. Bereits nach 2 Wochen war keine Wunde mehr erkennbar und das Fell hatte sich wieder geschlossen. Im folgenden Verlauf wurden die Tiere alle 4 Wochen auf ihr Gewicht kontrolliert.

### 4.4.3 Explantationen

Die Explantationen einer Gruppe mit je 14 Tieren (7 Prüf- und 7 Kontrolltiere) fanden nach 2, 4, 8, 12, 16 und 26 Wochen statt und erfolgten alle nach dem folgenden Schema. Die Tiere wurden zunächst narkotisiert. Dazu wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (1 % O<sub>2</sub>; 2,5-5 % Isofluran) gewählt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5 % Isofluran. Für die weitere Dauer der Narkose wurde die Tiere an eine Atemmaske angeschlossen. Die Erhaltungsdosis wurde nun individuell je nach Tier auf ca. 2,5-3 % Isofluran herabgesetzt. Die Tiere wurden zunächst gewogen und am Rücken frei geschoren. Anschließend folgten die Blutprobenentnahme und die Euthanasie der Tiere. Nun konnte für den Fall uneindeutiger histologischer Ergebnisse die Organentnahme erfolgen. Es erfolgte immer eine Resektion der rechten Niere, der linken Lunge, des Herzens und des *Lobus accessorius* der Leber.

Abschließend erfolgte nach Palpation der Scaffolds auf dem Rücken der Tiere, die Präparation des ca. 3x3 cm großen Hautlappens. Die Organe von jedem Tier wurden

---

<sup>8</sup> Prolene Nahtmaterial, Ethicon, Norderstedt.

<sup>9</sup> Pflaster Cosmopor E, Hartmann, Heidenheim.

zusammen mit dem dazugehörigen Hautlappen in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Aus diesen wurden anschließend die histologischen Proben im Pathologieinstitut in Mainz hergestellt.

### **4.5 Blutuntersuchungen**

Jedem Tier wurde bei der Implantation sowie der Explantation eine Blutprobe<sup>10</sup> entnommen um den Gesundheitsstatus der Tiere genauer zu beurteilen. Die Bearbeitung der Proben erfolgte über das Synlab vet. Labor Berlin GmbH in (Turmstrasse 21, 10559 Berlin, Germany). Die Ergebnisse sind im Folgenden graphisch<sup>11</sup> dargestellt (Abb. 8 bis 12).

### **4.6 Gewichtserfassung**

Alle Tiere wurden zur Kontrolle des Gesundheitszustandes monatlich gewogen. Zusätzlich wurden alle Tiere bei der Ankunft in der Tierhaltung, vor der Implantation und eine Woche nach der Implantation auf ihr Gewicht kontrolliert. Die Ergebnisse sind graphisch<sup>12</sup> dokumentiert (Abb. 6 und 7).

### **4.7 Histologie**

#### **4.7.1 Verwendete Färbung**

Die Herstellung der histologischen Präparate aus den bei der Explantation entnommenen Proben erfolgte im Institut für Pathologie in Mainz. Als histologische Färbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung gewählt und nach Standardprotokoll durchgeführt. Dies ist eine gute und weit verbreitete Übersichtsfärbung zur morphologischen Beurteilung der Proben. Das Hämaun färbt alle basophilen Zellbestandteile, wie zum Beispiel den Zellkern blau. Dagegen färbt Eosin, der zweite Bestandteil der Färbung alle basischen Strukturen wie zum Beispiel das Zytoplasma rosa bis rot an.

---

<sup>10</sup> EDTA Blutröhrchen, Sartedt, Nürnberg

<sup>11</sup> GraphPad prism 5.01, GraphPad Software, USA

<sup>12</sup> GraphPad prism 5.01, GraphPad Software, USA

### 4.7.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die histologische Auswertung erfolgt in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-6 (Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation). Hierbei handelt es sich um ein halbquantitatives Punktesystem. Es wurden die für die Gewebereaktion wichtigen Zellen gezählt und dann in ein Punktesystem überführt. Die Zählung erfolgte mit Hilfe von ImageJ<sup>13</sup>. Für jedes Präparat wurden vier zufällig gewählte 200x vergrößerte Felder ausgezählt, tabellarisch aufgelistet und schließlich gewertet. Es wurden polymorphkernige Zellen, Makrophagen, Riesenzellen, Fettinfiltrationen, Nekrose, Fibrose, Neovaskularisation, Lymphozyten und Plasmazellen erfasst.

Da für die Auswertung ein Mikroskop<sup>14</sup> und eine sehr gute Mikroskopkamera<sup>15</sup> mit einer sehr hohen Auflösung bereitgestellt wurde, konnte die Auswertung bereits in der 200x Vergrößerung vorgenommen werden. Da die Norm die Punktwerte auf ein je 400x vergrößertes Feld bezieht, wurde die Tabelle entsprechend abgewandelt. Die Originaltabellen der DIN EN ISO 10993-6 befinden sich im Anhang (Tab. 9 bis 11).

**Tabelle 2. Histologisches Punktbewertungssystem in Anlehnung an DIN EN ISO 10993**

Zelltyp/Reaktion	Punktwert				
	0	1	2	3	4
Polymorphkernige Zellen	0	1 bis 20 je f	20 bis 40 je f	Starkes Infiltrat	Gepackt
Lymphozyten	0	1 bis 20 je f	20 bis 40 je f	Starkes Infiltrat	Gepackt
Plasmazellen	0	1 bis 20 je f	20 bis 40 je f	Starkes Infiltrat	Gepackt
Makrophagen	0	1 bis 20 je f	20 bis 40 je f	Starkes Infiltrat	Gepackt
Riesenzellen	0	1 bis 8 je f	8 bis 20 je f	Starkes Infiltrat	Gepackt
Nekrose	0	Minimal	Leicht	Mäßig	Schwer
f = je stark vergrößertes (200x) Feld					

<sup>13</sup> ImageJ, U.S. National Institutes of Health, USA

<sup>14</sup> Durchlicht-Mikroskop, DMRM, Leica, Wetzlar

<sup>15</sup> Mikroskop-Kamera, DFC 320, Leica, Wetzlar

#### 4. Material, Tiere und Methoden

**Tabelle 3. Histologisches Punktbewertungssystem - Reaktion - in Anlehnung an DIN EN ISO 10993**

Reaktion	Punktwert				
	0	1	2	3	4
Neo-vaskularisation	0	Minimale Kapillarwucherung, herdförmig, 1 bis 3 Knospen	Gruppen von 4 bis 7 Kapillaren mit fibroblastischen Trägerstrukturen	Breites Kapillarband mit Trägerstrukturen	Ausgedehntes Kapillarband mit fibroblastischen Trägerstrukturen
Fibrose	0	Schmales Band	Mäßig dickes Band	Dickes Band	Ausgedehntes Band
Fettinfiltration	0	Minimale mit Fibrose verbundene Fettmenge	Mehrere Schichten von Fett und Fibrose	Lange und breite Anhäufung von Fettzellen um die Implantatstelle	Ausgedehntes das Implantat vollständig umgebendes Fett

Die sich aus den Tabellen zwei und drei ergebenden Punktwerte werden in folgender Weise gegeneinander aufgetragen:

**Tabelle 4. Vergleichende semiquantitative Auswertung der Implantate in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993**

	Probe	Kontrolle
<b>Tiernummer</b>		
Polymorphkernige Zellen		
Lymphozyten		
Plasmazellen		
Makrophagen		
Riesenzellen		
Nekrose		
<b>SUBTOTAL(x2)</b>		
Neovaskularisation		
Fibrose		
Fettinfiltration		
<b>SUBTOTAL</b>		
<b>TOTAL</b>		
Gruppe TOTAL		
<b>Mittelwert (Probe – Kontrolle)</b>		

Die DIN EN ISO 10993-6 gibt hier Richtwerte für die Schlussfolgerung an. Die Probe wird anhand ihrer Mittelwerte beurteilt. Demnach gilt eine Probe unter diesen Bedingungen der Untersuchung mit einem Wert von 0 -2,9 als nicht reizend im Vergleich zur Kontrollprobe. Werte zwischen 3,0 - 8,9 gelten als leicht reizend, 9,0 - 15,0 als mäßig reizend und Werte über 15,1 als stark reizend. Eine negative Differenz wird als Null angesehen (DIN EN ISO 10993). Dieses halbquantitative Punktbewertungssystem wird für alle Untersuchungszeitpunkte erstellt und gegeneinander aufgetragen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Klinische Ergebnisse

Alle Tiere standen unter ständiger Beobachtung. Sie zeigten zu keinem Zeitpunkt klinische Hinweise auf ein Krankheitsgeschehen. Einige Tiere wiesen im Verlauf der Studie Stellen mit kürzerem, abgeknabbertem Fell auf. Diese Verhaltensauffälligkeit konnte getilgt werden, indem man den Tieren Papierrollen als Rückzugsorte in die Käfige gelegt hat. Ansonsten waren die Tiere in Futter- und Wasseraufnahme adspektorisch vollkommen unauffällig. Auch Kot- und Harnabsatz zeigten zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf ein gestörtes Allgemeinbefinden. Zur genaueren Abklärung des Gesundheitszustandes wurden die Gewichte der Tiere erfasst und die Blutwerte regelmäßig kontrolliert.

### 5.2 Gewichtserfassungen

Um einen besseren Überblick über den Gesundheitsstatus der Tiere zu bekommen, wurden die Lebendgewichte am Tag der Implantation, eine Woche nach dem Implantationstag und zu den jeweiligen Explantationzeitpunkten nach 2, 4, 8, 12, 16 und 26 Wochen bestimmt.

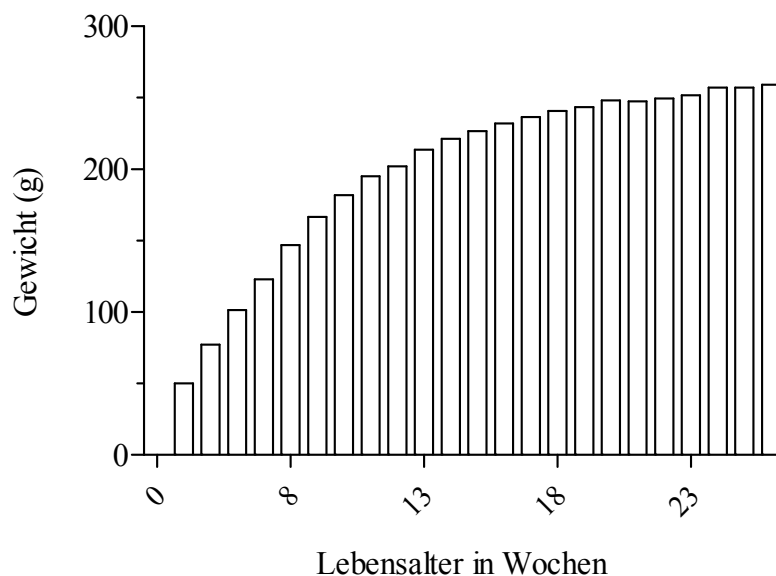
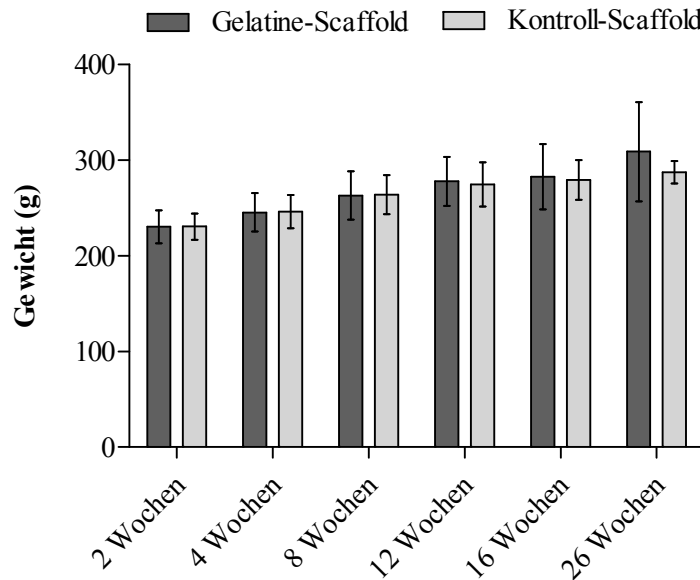


Abbildung 6. Gewichtszunahme der Wistar Ratte mit steigendem Lebensalter<sup>16</sup>

Alle Ratten zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine stetige Gewichtszunahme, die den vom Züchter (Harlan Winkelmann GmbH) angegebenen Normal-Gewichtszunahmen

<sup>16</sup> Gewichtsangaben für Wistar Ratten nach Harlan Winkelmann GmbH

entsprechen (Abb. 6). Die Gewichtszunahmen waren somit ihrem Alter entsprechend und zeugten von einem guten Gesundheitsstatus. Im Durchschnitt nahmen die Tiere von einer Gewichtskontrolle zur nächsten 10,7 g zu.



**Abbildung 7. Vergleichende Darstellung der Gewichtszunahme von den Prüf- und Kontrolltieren (n=83) über den gesamten Versuchszeitraum (Wochen nach Implantation)**

Vergleicht man die Gewichtszunahmen der Tiere der Kontrollgruppe mit den Gewichtszunahmen der Tiere der Prüfgruppe sind keine deutlichen Unterschiede auszumachen (Abb. 7). Die Tiere beider Gruppen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine stetige Gewichtszunahme. Ab dem Explantationszeitpunkt 12 Wochen nach Implantation zeigten die Tiere der Prüfgruppe im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe eine höhere Gewichtszunahme (Abb. 7).

### 5.3 Blutwerte

Jeder Ratte wurde zu Beginn der Studie am Implantationstag eine Blutprobe aus der Schwanzvene entnommen, um den Istzustand der Gesundheit der Tiere zu erfassen. Dieser ist in den graphischen Darstellungen der einzelnen Blutparameter als Zeitpunkt Null angegeben (Abb. 8-12). Anschließend erfolgte eine erneute Überprüfung der Blutwerte zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten. Insgesamt waren die Blutwerte der Tiere zu fast jedem Zeitpunkt im physiologischen Rahmen und zeigten keinen Hinweis auf eine systemische Erkrankung. Eine Auswahl der Blutwerte ist im Folgenden graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien grenzen den Normalbereich der Blutparameter ein.



## 5. Ergebnisse

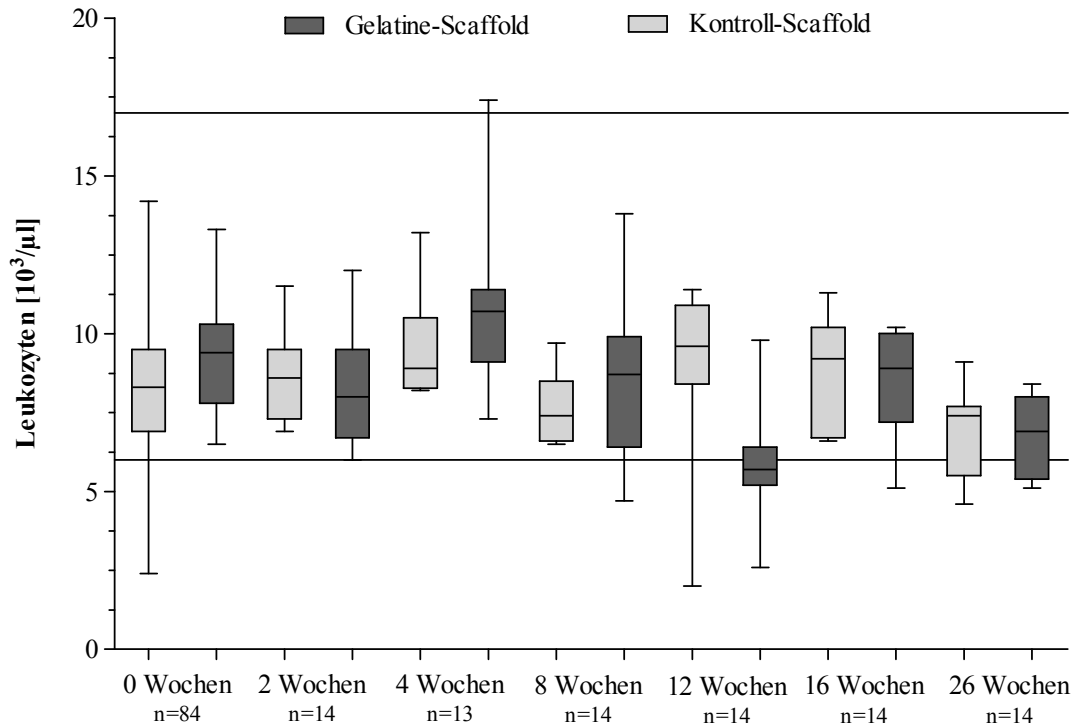


Abbildung 8. Vergleichende Darstellung der Leukozytenkonzentration im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum

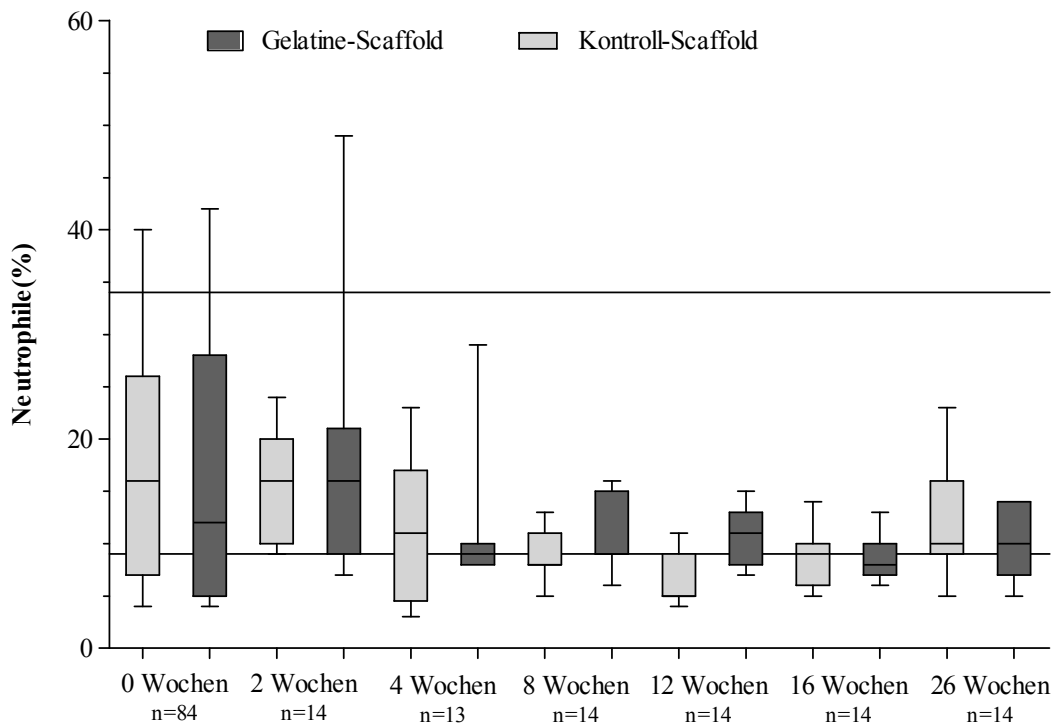


Abbildung 9. Vergleichende Darstellung der Neutrophilen im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum

## 5. Ergebnisse

Leukozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sind ausschlaggebende Blutparameter für Entzündungsreaktionen im Körper. Der Mittelwert der Blutparameter der Tiere befindet sich zu jedem Erhebungszeitpunkt im physiologischen Bereich (Abb. 8 bis 12). Ausnahmen hiervon sind nur die Monozytenkonzentration der Kontrolltiere nach 26 Wochen (Abb. 11; Mittelwert 6,57 %) und die Neutrophilenkonzentration der Kontrolltiere nach 2 Wochen (Abb. 10; 6,71 %). Betrachtet man die Einzelwerte der Blutparameter zu den verschiedenen Zeitpunkten, sind sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Prüftieren Ausreißer der Blutparameter aus den physiologischen Bereichen zu erkennen (Abb. 8; 9; 10 und 12). Insbesondere die Monozytenkonzentrationen (Abb. 10) sind bei den Kontrolltieren zu den Zeitpunkten 0, 4, 16 und 26 Wochen erhöht. Die Prüftiere zeigen ebenfalls nach 0, 4, 8, 16 und 26 bei den Lymphozyten Konzentrationserhöhungen auf. Bei den Prüftieren treten außer 2 Wochen nach der Implantation Erhöhungen der Lymphozytenkonzentrationen auf. Diese Erhöhungen der Blutparameter über die physiologischen Bereiche hinaus sind möglicherweise auf die Fremdkörperreaktion bzw. auf leichte physiologische Entzündungsreaktionen auf die Implantate zu zurückzuführen.

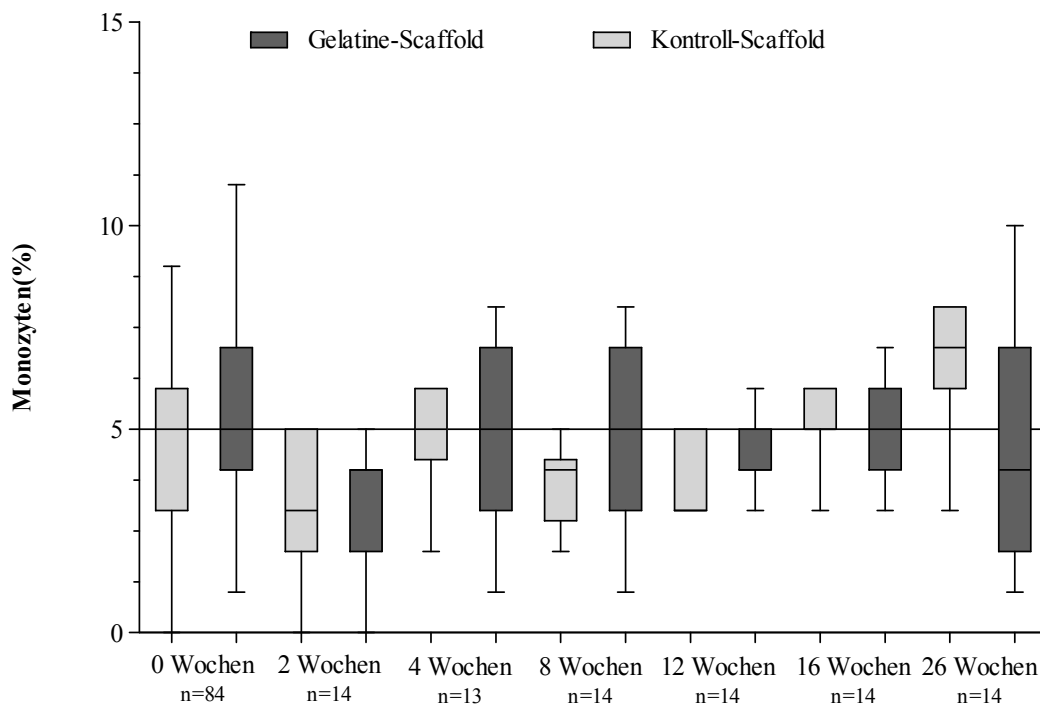


Abbildung 10. Vergleichende Darstellung der Monozyten im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum

## 5. Ergebnisse

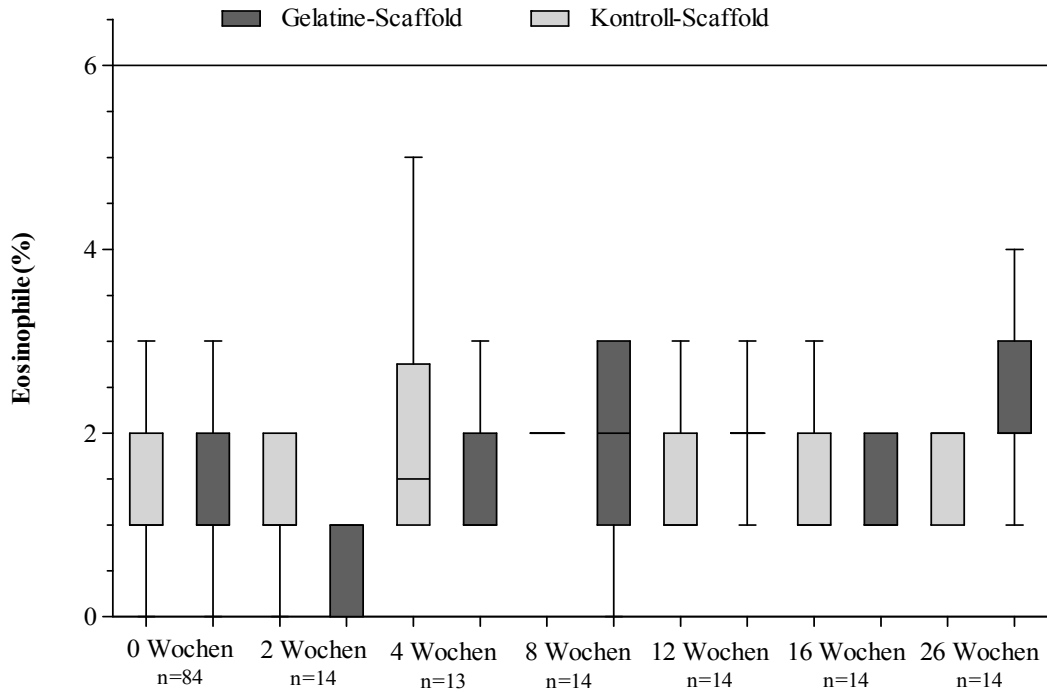


Abbildung 11. Vergleichende Darstellung der Eosinophilen im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum

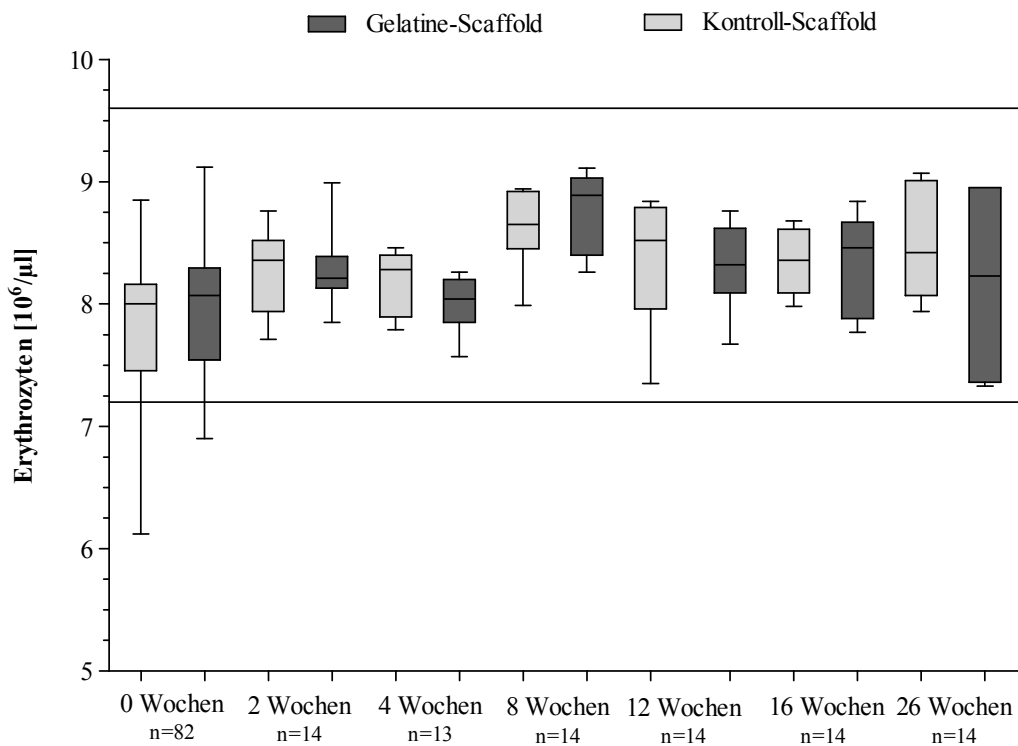


Abbildung 12. Vergleichende Darstellung der Erythrozytenkonzentration im Blut der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum

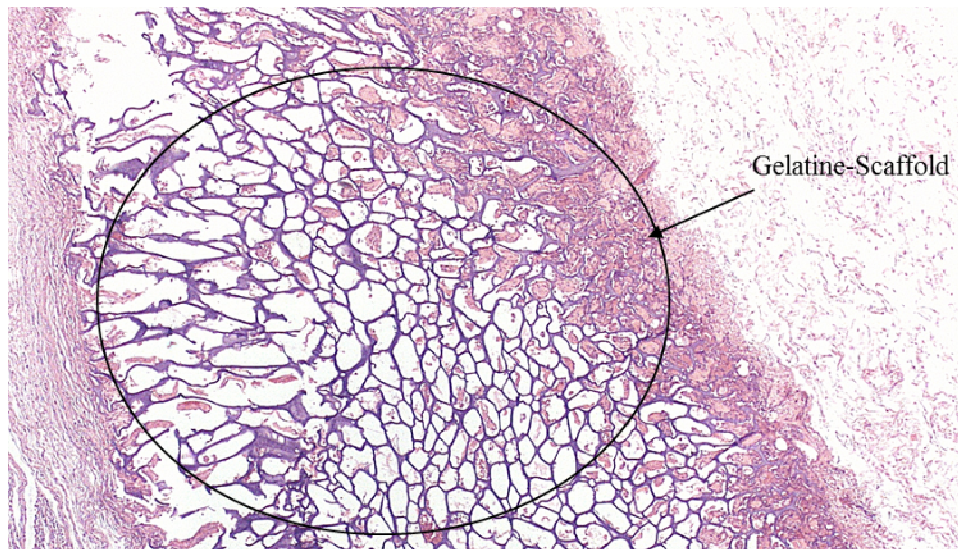
Insgesamt zeigen die Blutparameter, dass sich die Tiere in einem guten Gesundheitszustand befanden. Es waren zu keinem Zeitpunkt der Studie Hinweise auf besondere Entzündungsreaktionen oder Erkrankungen gegeben.

### 5.4 Histologische Ergebnisse

Alle histologischen Präparate wurden gemäß DIN EN ISO 10993 (Abschnitt 4.7.2) bearbeitet und ausgewertet. Die Ergebnisse werden im Folgenden nach Explantationszeitpunkten sortiert dargestellt.

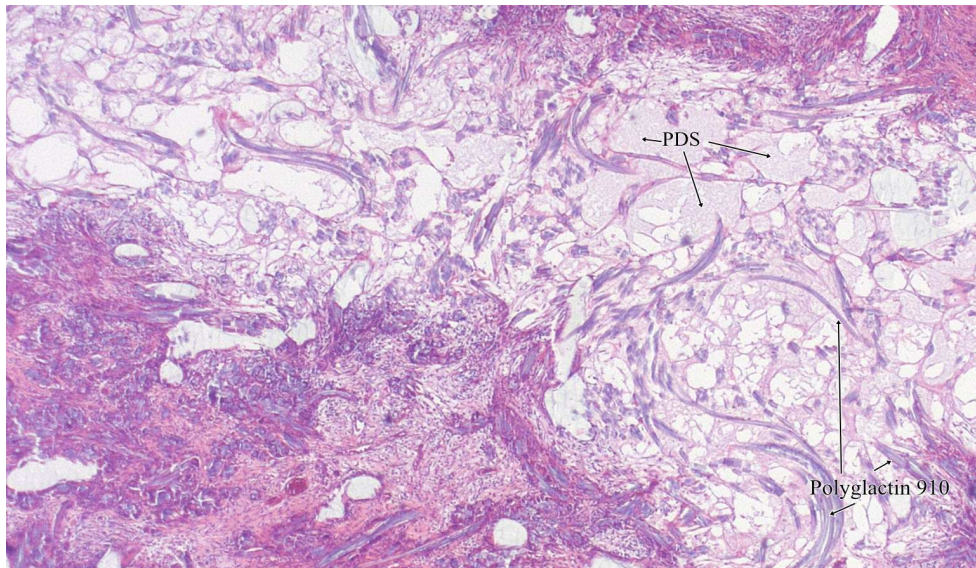
#### 5.4.1 Zeitpunkt 2 Wochen

2 Wochen nach der Implantation fand die erste Probenentnahme statt. Das Prüfimplantat zeigte sich gut in die umgebende Subcutis eingebettet (Abb. 13).



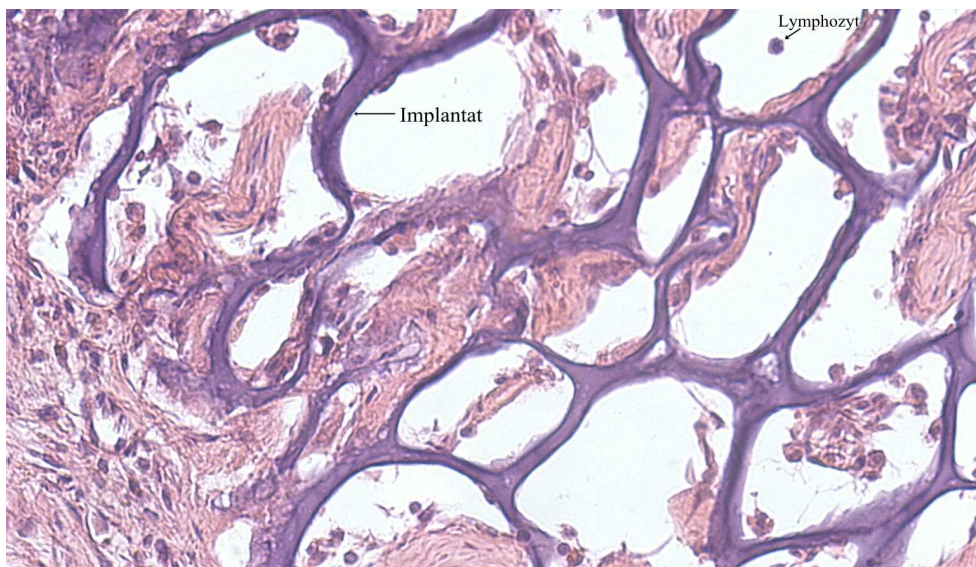
**Abbildung 13. Histologische Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 79) des Gelatine-PLGA-Scaffolds 2 Wochen nach Implantation**

Es war vollständig darstellbar und bereits mit Zellen besiedelt. Das umgebende Gewebe zeigte keine Auffälligkeiten.



**Abbildung 14. Histologische Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 72) des Kontrollimplantats Ethisorb® 2 Wochen nach Implantation**

Auch das Kontrollimplantat war 2 Wochen nach der Implantation gut histologisch darstellbar (Abb. 14). Es zeigte sich gut in das umgebende Gewebe integriert und war bereits mit Zellen durchwachsen.

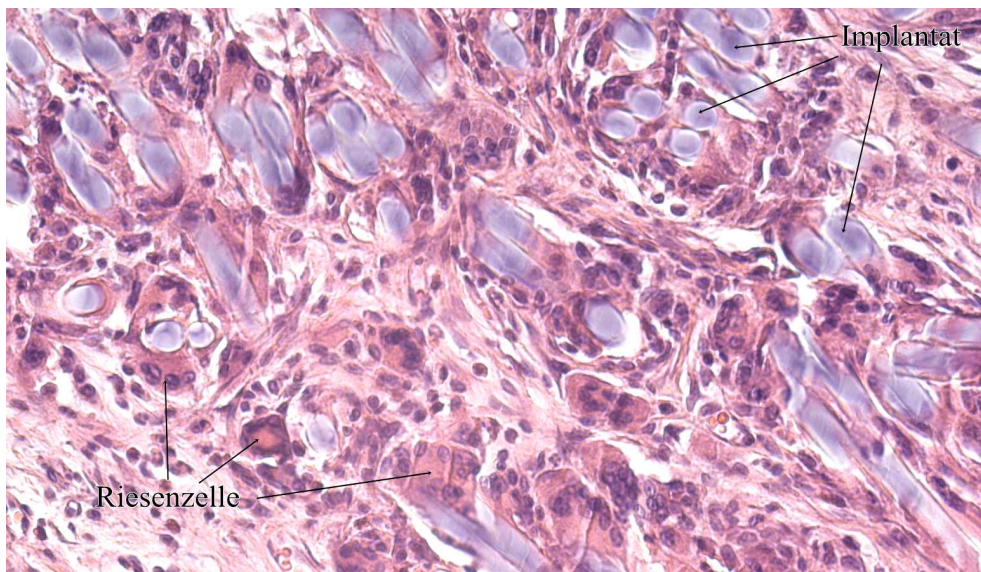


**Abbildung 15. Detailaufnahme (20x; HE; Tier 79) des Gelatine-PLGA-Scaffolds 2 Wochen nach Implantation**

Beide Implantate waren gut darstellbar und wenig degradiert. Sie sind vom umliegenden Gewebe noch deutlich abgrenzbar. Im Vergleich zum Kontrollimplantat war das Testimplantat weniger mit Zellen infiltriert.



Darstellbar waren vornehmlich Fibroblasten, Bindegewebe und Makrophagen (Abb. 15 und 16). Das Kontrollpräparat erschien deutlich stärker mit Zellen durchwachsen. Es handelte sich hierbei in absteigender Reihenfolge um Makrophagen, Riesenzellen und Fibroblasten. Makrophagen, ebenso die Riesenzellen sind phagozytierende Zellen, die vornehmlich für den Abbau von Gewebe bzw. Fremdkörpern zuständig sind. Es zeigte sich hier das Bild einer mittelgradig ausgeprägten Entzündungs- und Fremdkörperreaktion. Des Weiteren ließ sich eine geringgradige Fibrose mit einem zellreichen Bindegewebe darstellen. Hinweise auf Gewebeentartungen konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 16. Detailaufnahme (20x; HE; Tier 74) des Kontrollimplantates Ethisorb®  
2 Wochen nach Implantation**

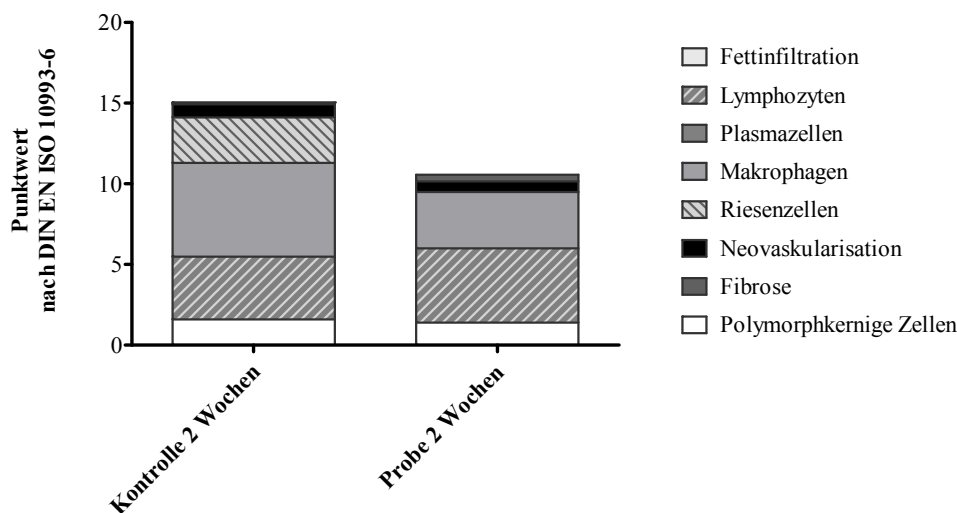
Die genaue Auswertung zur Ermittlung der Biokompatibilität des Testimplantates erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-6. Dazu wurden die verschiedenen Zelltypen gezählt, nach dem Punktwert der DIN Norm umgerechnet und gegeneinander ausgewertet (Tab. 5).

## 5. Ergebnisse

**Tabelle 5. Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe -und Kontrollgewebes 2 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993<sup>17</sup>**

Zeitpunkt 2 Wochen	Kontrolle (n=7)							Probe (n=7)						
Tiernummer	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Polymorphkernige Zellen	1	0,8	0,8	1	1	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	1	0,8	1	1
Lymphozyten	3	2	2	1,3	1,5	2,3	1,5	1,5	2,5	1	2,5	2,8	2,8	3
Plasmazellen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Makrophagen	3	2,8	3	3	3	2,5	3	0,8	1	0,3	1,3	3	3	2,8
Riesenzellen	1,3	1,8	2	1,8	1,5	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0
Nekrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>SUBTOTAL(X2)</b>	<b>16,5</b>	<b>14,5</b>	<b>15,5</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>12,5</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>9,5</b>	<b>13</b>	<b>13,5</b>	<b>13,5</b>
Neovaskularisation	0,8	1	1	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,8	0,3	1	0,8	0,8	0,5
Fibrose	0	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0,3	1	0	0,5	0,3	0,3
Fettinfiltration	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0
<b>SUBTOTAL</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1,3</b>	<b>1</b>	<b>1,3</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>
<b>TOTAL</b>	<b>17,3</b>	<b>15,5</b>	<b>16,5</b>	<b>14,8</b>	<b>15,3</b>	<b>13,3</b>	<b>11,8</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>4,3</b>	<b>10,5</b>	<b>14,3</b>	<b>14,5</b>	<b>14,3</b>
<b>GRUPPE TOTAL</b>	<b>14,9</b>							<b>10,4</b>						
<b>MITTELWERT</b>	<b>-4,5</b>													

Rechnet man die sich aus der DIN Norm ergebenden Punktwerte gegeneinander auf ergibt sich ein Mittelwert von – 4,5 (Tab. 5). Dieser wird gemäß DIN Norm als Null gewertet. Damit wird die Probe unter den gegebenen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle als nicht reizend angesehen.



**Abbildung 17. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 2 Wochen nach der Implantation**

Betrachtet man die Gesamtreaktion vom Kontroll- und Testimplantat, ist deutlich zu erkennen, dass das Testimplantat eine insgesamt geringere Gewebereaktion zeigte (Abb. 17). In beiden Implantaten überwogen deutlich die Makrophagen und Lymphozyten gegenüber den restlichen Bewertungsbestandteilen (Abb. 18). Dies spiegelt die oben bereits genannte Entzündungsreaktion des Gewebes auf die Implantate wieder. Im Gegensatz zum Kontrollimplantatgewebe waren allerdings bei den Geweben mit den Testimplantaten keine Fremdkörperriesenzellen darstellbar (Abb. 18). Das Kontrollimplantat hatte einen

<sup>17</sup> siehe 4.7.2 Mikroskopische Untersuchungen Seiten 19 bis 20

Makrophagen-Punktmittelwert von 2,9; das Testimplantat von 1,7. Die polymorphkernigen Zellen wiesen im Kontrollimplantat einen Punktmittelwert von 0,8 im Gegensatz zu 0,7 beim Testimplantat auf. Die Lymphozyten waren mit einem Punktmittelwert von 2,6 im Testimplantat etwas ausgeprägter vorhanden als im Kontrollimplantat (Punktmittelwert 1,9).

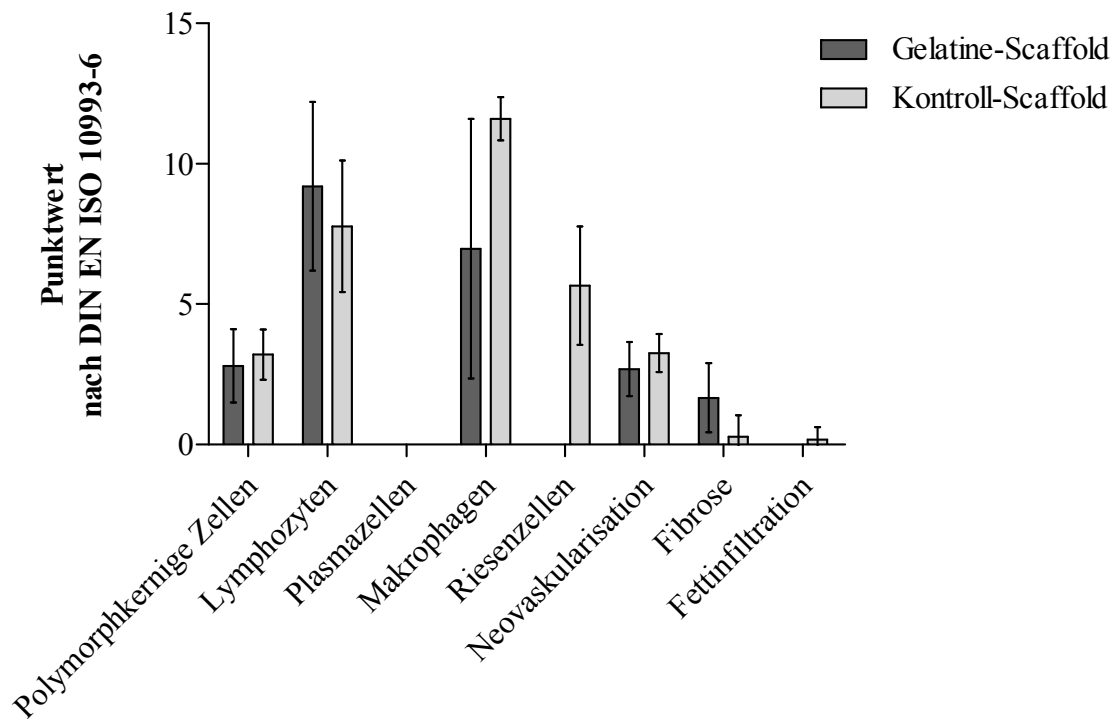
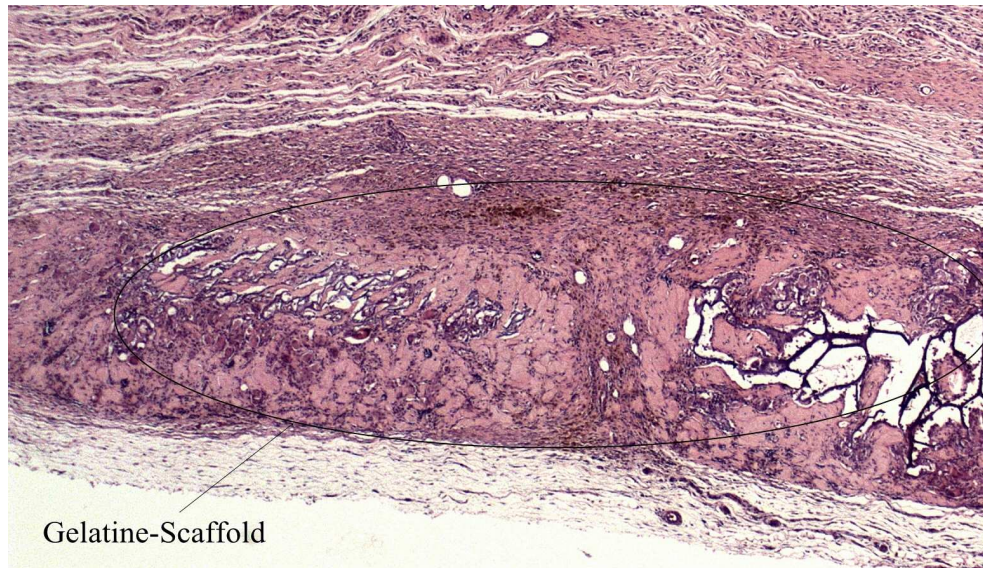


Abbildung 18. Gegenüberstellung der Zellgehalte von Probe- und Kontrolltieren

#### 5.4.2 Zeitpunkt 4 Wochen

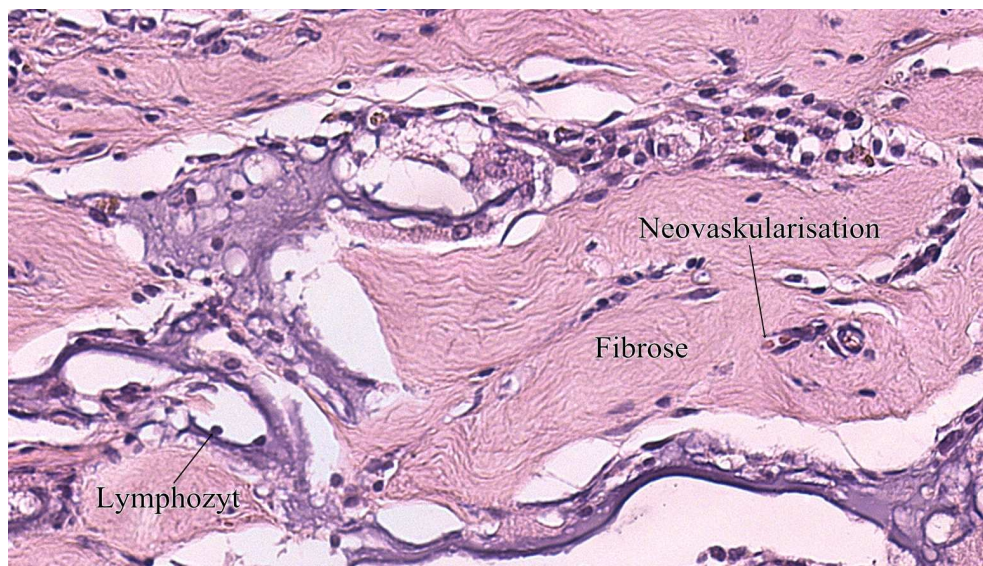
4 Wochen nach der Implantation waren beide Implantate noch nicht vollständig degradiert. Sowohl das Kontroll- als auch das Testimplantat waren noch gut histologisch darstellbar (Abb. 19). Das Testimplantat war noch deutlich von der Umgebung abgrenzbar und fast vollständig mit Zellen durchwachsen. Die umgebende Subcutis war physiologisch.





**Abbildung 19. Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 11) des Gelatine-PLGA-Scaffolds 4 Wochen nach Implantation**

Das eingewachsene Gewebe in das Testimplantat war im Vergleich zum Kontrollgewebe deutlich zellärmer (Abb. 20 und 21). Das Kontrollgewebe wies auch nach 4 Wochen zahlreiche Fremdkörperriesenzellen und weitere Entzündungszellen auf. Im Testimplantat waren deutlich fibrosierende Bindegewebsanteile erkennbar (Abb. 20).



**Abbildung 20. Detailaufnahme (20x; HE; Tier 12) des Gelatine-PLGA-Implantates 4 Wochen nach Implantation**

## 5. Ergebnisse

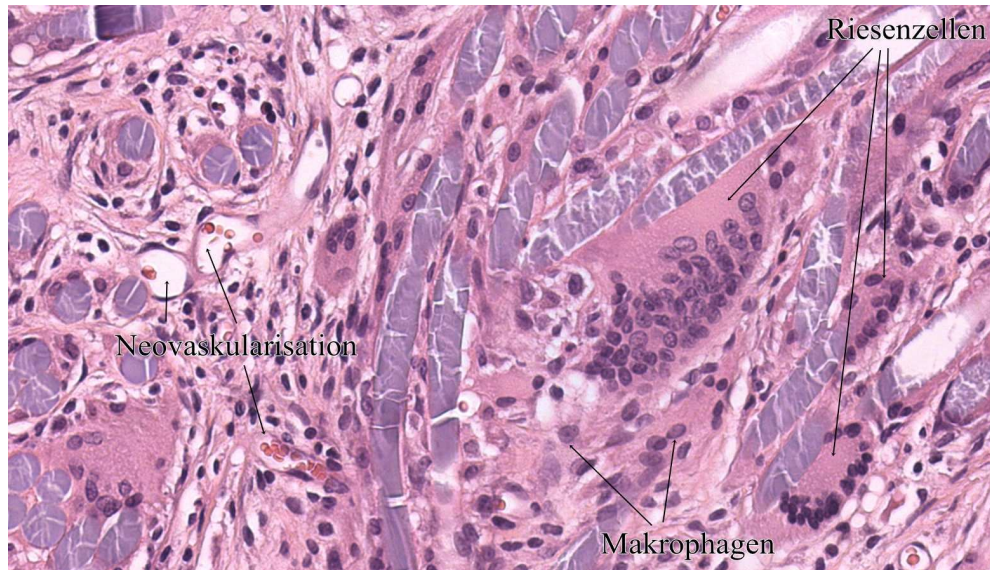


Abbildung 21. Detailaufnahme (20x;HE; Tier 2) des Kontrollimplantates 4 Wochen nach Implantation

Tabelle 6. Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe -und Kontrollgewebes 4 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993

Zeitpunkt 4 Wochen	Probe (n=6)							Kontrolle (n=6)						
Tiernummer	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7
Polymorphkernige Zellen	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0
Lymphozyten	2	2,75	1	2,5	2	2,75		1	2	2,5	1,5	2,5	1,25	
Plasmazellen	1	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5		0,25	0	0,5	0	0	0,5	
Makrophagen	1	2,75	2	2,25	1,5	2,25		3	3	3	3	3	3	
Riesenzellen	0,5	1,25	0,25	1	1,5	0,5		2,75	2,5	2,75	3	3	2,25	
Nekrose	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
<b>SUBTOTAL (X2)</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>12,5</b>	<b>10,5</b>	<b>12</b>		<b>14</b>	<b>15,5</b>	<b>17,5</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	
Neovaskularisation	0,75	0	0	0,25	0	0		0,5	0,25	0	0	0,25	0	
Fibrose	0	1,25	1	1,75	1	1		0,25	0,75	1	0,75	0,75	0,5	
Fettinfiltration	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
<b>SUBTOTAL</b>	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>0,75</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,75</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>9,75</b>	<b>15,3</b>	<b>9</b>	<b>14,5</b>	<b>11,5</b>	<b>13</b>		<b>14,75</b>	<b>16,5</b>	<b>18,5</b>	<b>15,75</b>	<b>18</b>	<b>14,5</b>	
<b>GRUPPE TOTAL</b>	<b>12,17</b>							<b>16,33</b>						
<b>MITTELWERT</b>								<b>-4,1</b>						

Der Mittelwert des gegeneinander aufgetragenen halbquantitativen Punktsystems ist nach 4 Wochen mit -4,1 erneut negativ (Tab. 6). Damit ist das Testmaterial wieder als weniger reizend als das Kontrollmaterial anzusehen. Das Gewebe mit dem Testimplantat wies erneut eine geringere Gesamtreaktion auf das Implantat auf, als das Gewebe mit den Kontrollimplantat (Abb. 22 und 23). Wieder dominierten Makrophagen, Riesenzellen und Lymphozyten. Nach 4 Wochen *in vivo* war auch bei dem Testimplantat eine geringe Fremdkörperreaktion nachweisbar. Diese war allerdings deutlich niedriger ausgeprägt als beim Kontrollimplantat. So können nun Riesenzellen in beiden Geweben dargestellt werden (Abb. 23). Im Testimplantatgewebe allerdings deutlich weniger als im Kontrollgewebe (Punktmittelwert Testimplantat 0,8 zu Kontrollimplantat 2,7). Wie im ersten Explantationszeitraum, waren auch nach 4 Wochen im Testgewebe mehr Lymphozyten (Punktmittelwert Testgewebe 2,2 und Kontrollgewebe 1,8) als im Kontrollgewebe



## 5. Ergebnisse

nachweisbar. Makrophagen waren die im Kontrollgewebe vorrangig vorhandenen Zellen (Punktmittelwert 3,0; Testgewebe 2,0). Die fibrosierenden Gewebeanteile traten im Testgewebe mit einem Punktmittelwert von 1 im Vergleich zum Punktmittelwert von 0,7 im Kontrollgewebe stärker hervor.

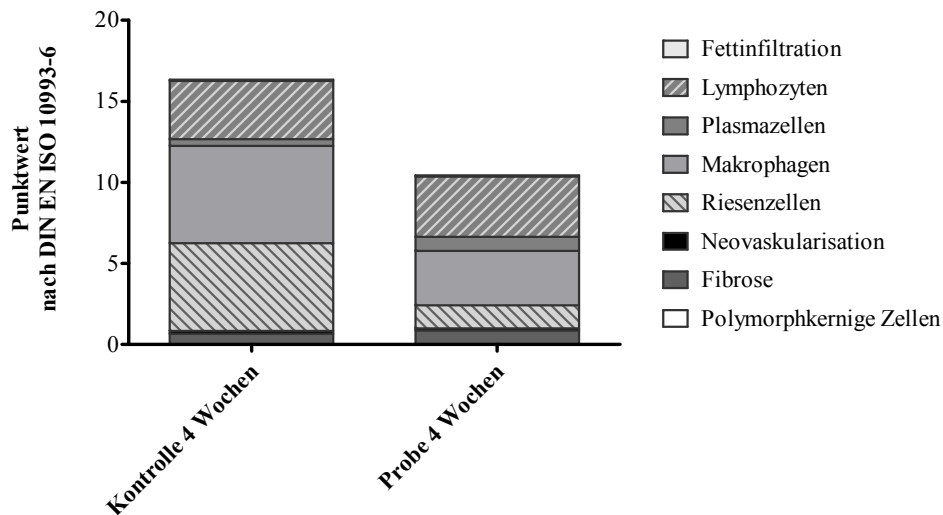


Abbildung 22. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 4 Wochen nach der Implantation

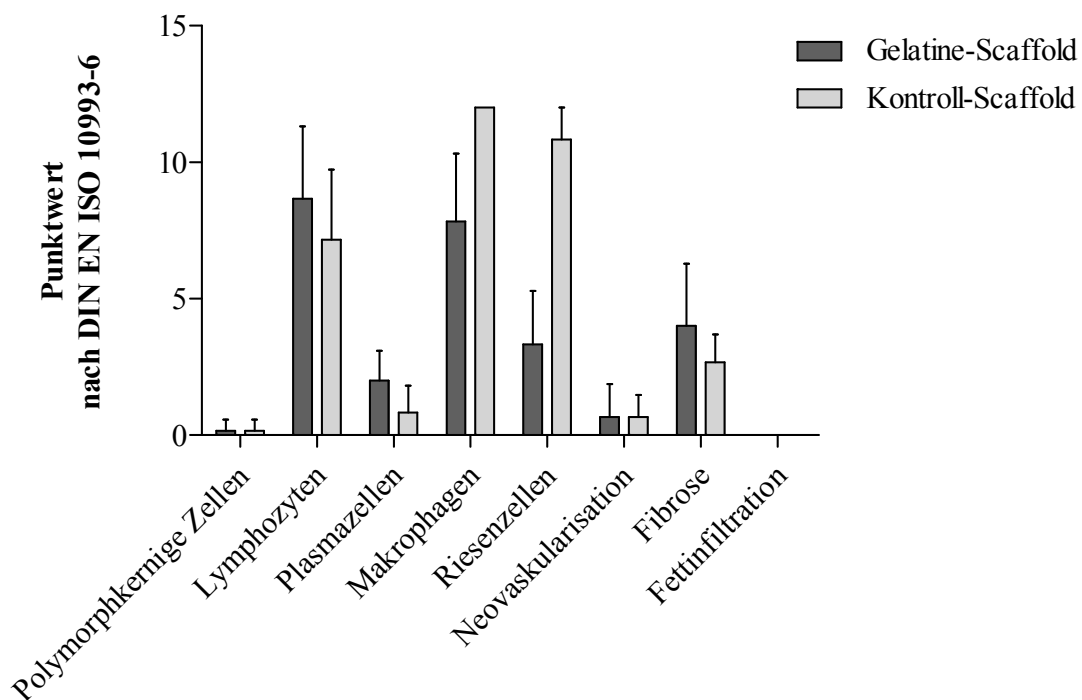
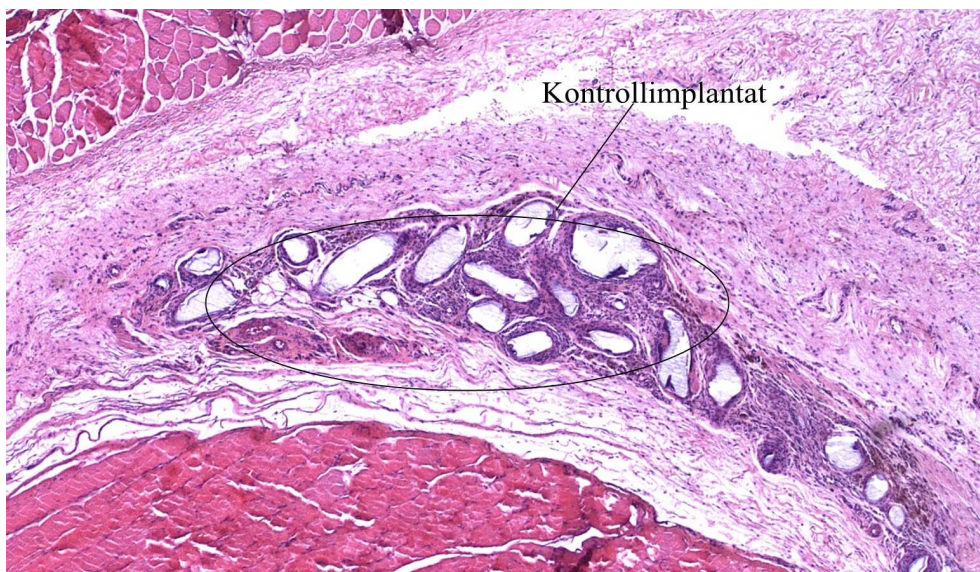


Abbildung 23. Gegenüberstellung der Zellgehalte von Probe- und Kontrolltieren

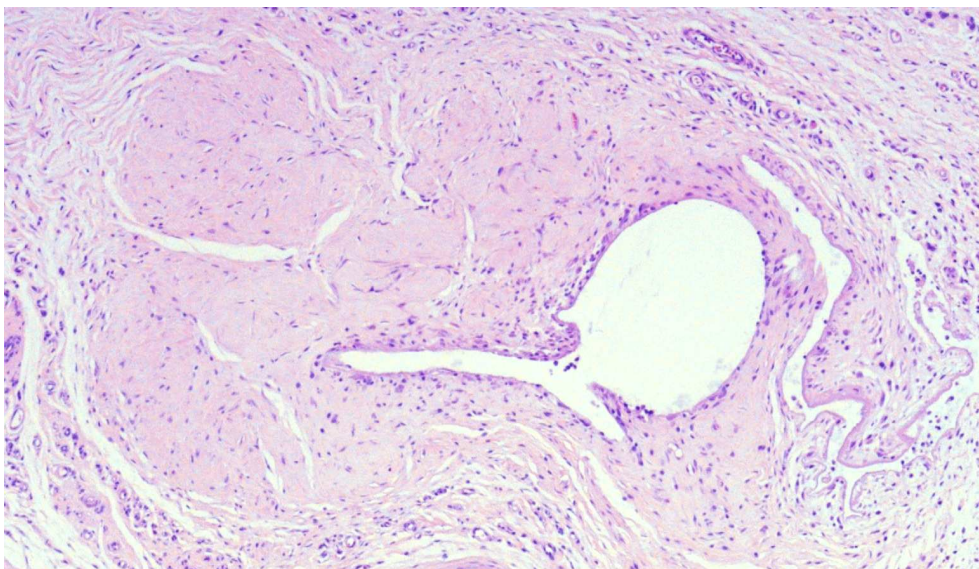
### 5.4.3 Zeitpunkt 8 Wochen

8 Wochen nach der Implantation war das Testmaterial bereits nahezu vollständig degradiert. Es waren große Hohlraumbildungen zu erkennen, die durch das abgebaute Material entstanden sind (Abb. 25). Das Implantat war histologisch nicht mehr darstellbar.

Auch das Kontrollmaterial Ethisorb<sup>®</sup> zeigte vorschreitende Degenerationserscheinungen. Die Polymerfaserstrukturen begannen sich aufzulösen. Das Implantat war insgesamt aber noch gut erkennbar und von der umgebenden Subcutis gut abgrenzbar (Abb. 24).

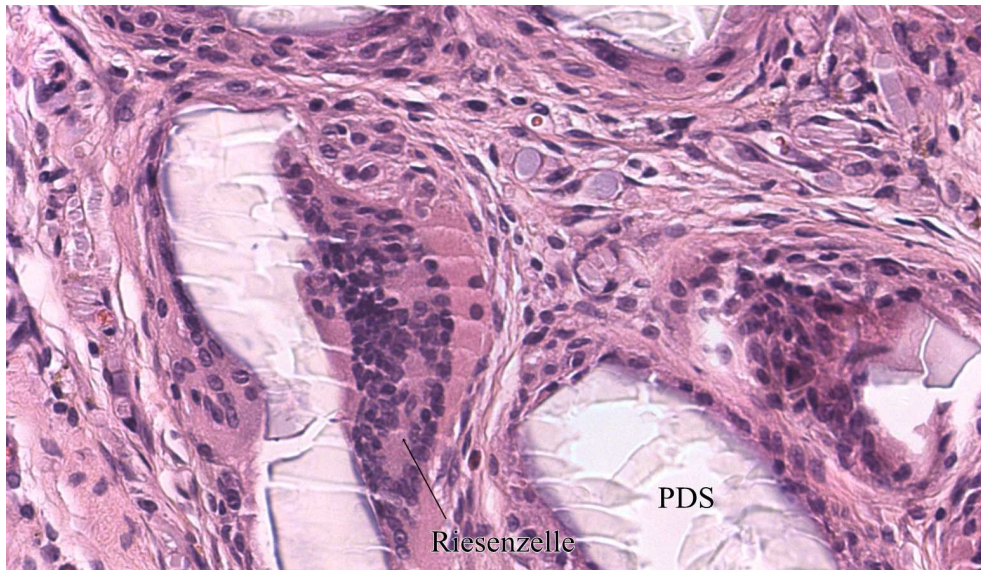


**Abbildung 24. Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 17) des Kontrollimplantates Ethisorb<sup>®</sup> 8 Wochen nach Implantation**

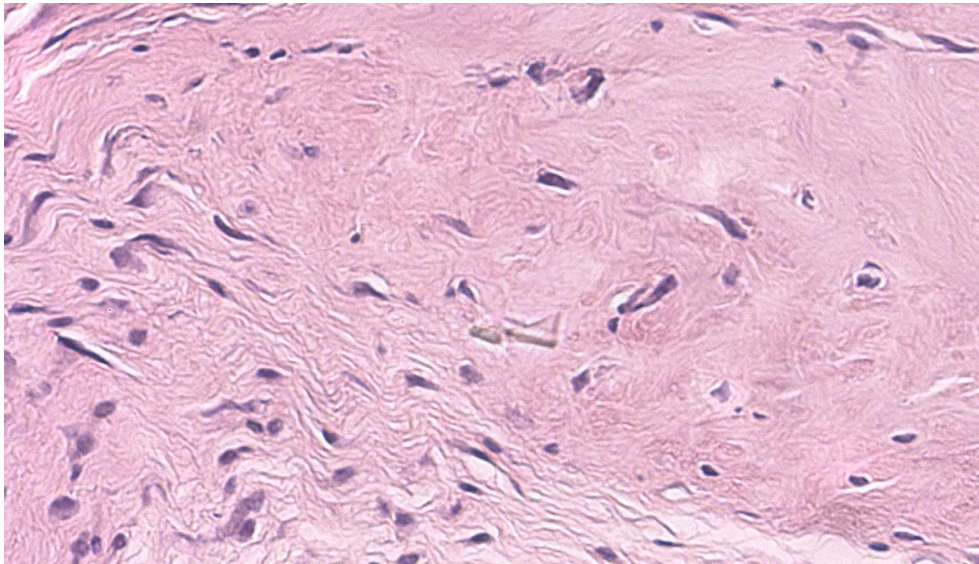


**Abbildung 25. Übersichtsaufnahme (2,5x; HE; Tier 27) des Testgewebereiches 8 Wochen nach Implantation**





**Abbildung 26. Detailaufnahme (20x; HE; Tier 16) des Kontrollimplantates 8 Wochen nach Implantation**



**Abbildung 27. Detailaufnahme (20x; HE; Tier 26) des Testgewebes 8 Wochen nach Implantation**

In Bereichen, in denen das Testimplantat vermutlich vorher anzutreffen war, waren vor allem gleichmäßige zellarme Bindegewebschollen anzutreffen (Abb. 27). Auch die unregelmäßige Struktur des Gewebes half bei der Lokalisation des ehemaligen Implantatbereiches (Abb. 25). Zum Lumen hin war diese Struktur von einem Fibroblastenrand umgeben. Auch dies ist ein Merkmal dafür, dass hier zunächst das Scaffold implantiert war. Dieser noch vorhandene Hohlraum wurde mit fortschreitender Zeit durch lockeres Bindegewebe gefüllt.

Das Kontrollmaterial zeigte nach 8 Wochen die sich auflösende Polymerfaserstruktur. In direkter Umgebung des Fremdmaterials saßen mehrere mehrkernige Riesenzellen (Abb. 26). Die Fremdkörperreaktion war somit noch deutlich darstellbar. Immer noch war eine

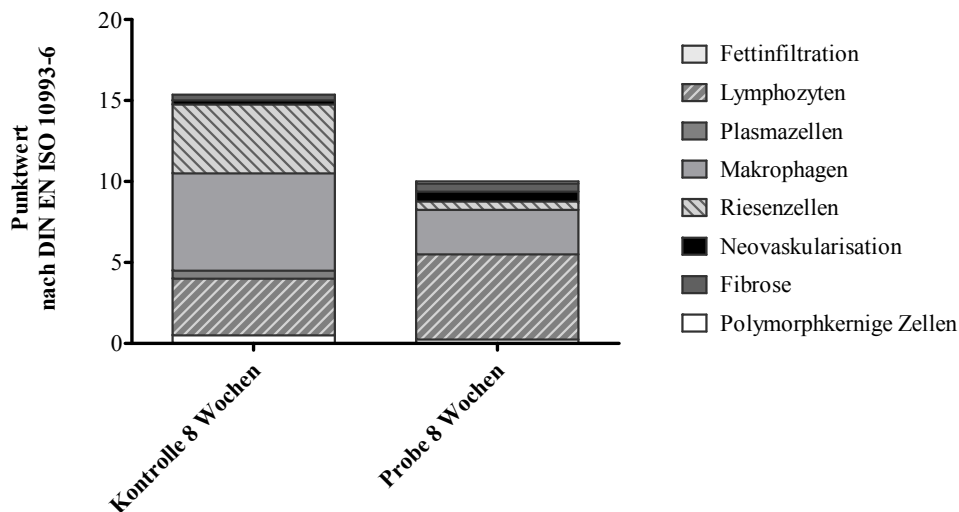
## 5. Ergebnisse

mittelgradige Makrophageninfiltration im Kontrollmaterial zu verzeichnen (Punktmittelwert 3,0). Vereinzelt waren Lymphozyten, Plasmazellen und Hämosiderophagen anzutreffen.

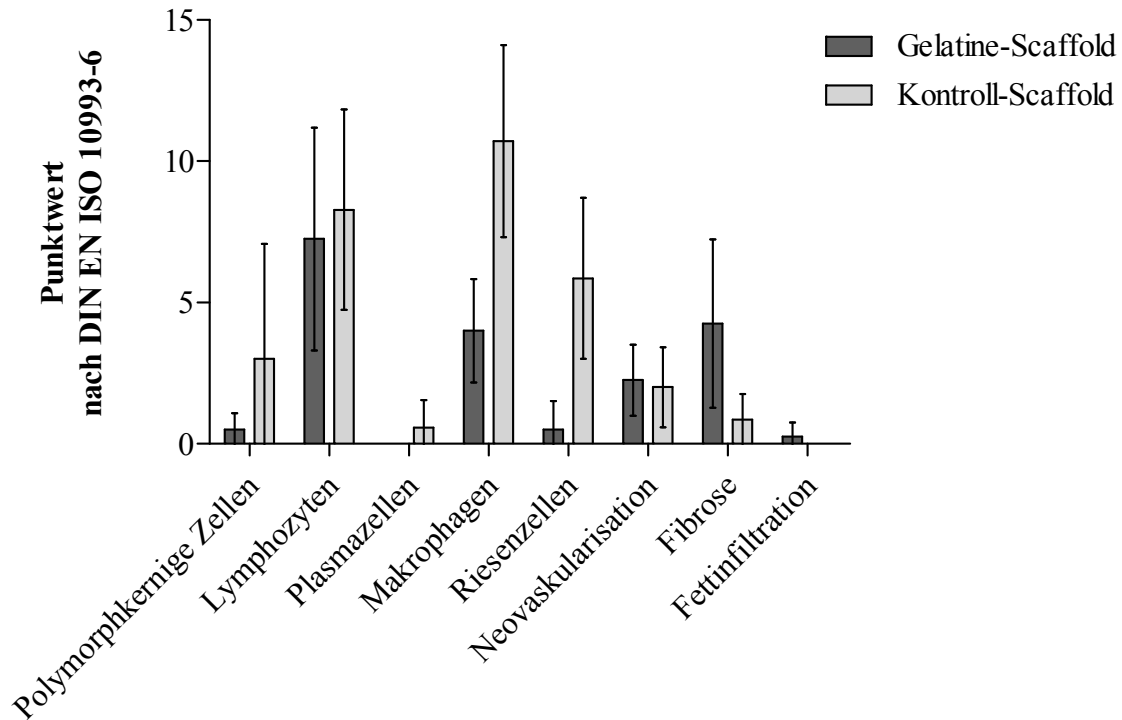
**Tabelle 7. Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe -und Kontrollgewebes 8 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993**

Zeitpunkt 8 Wochen	Probe (n=2)		Kontrolle (n=2)	
	22	23	15	16
<b>Tiernummer</b>				
Polymorphkernige Zellen	0,25	0	0	0,5
Lymphozyten	2,25	3	1,5	2
Plasmazellen	0	0	0	0,5
Makrophagen	1,5	1,25	3	3
Riesenzellen	0,5	0	2	2,25
Nekrose	0	0	0	0
<b>SUBTOTAL(X2)</b>	<b>9</b>	<b>8,5</b>	<b>13</b>	<b>16,5</b>
Neovaskularisation	0,25	1	0,25	0,25
Fibrose	0,75	0,25	0,25	0,5
Fettinfiltration	0,25	0	0	0
<b>SUBTOTAL</b>	<b>1,25</b>	<b>1,25</b>	<b>0,5</b>	<b>0,75</b>
<b>TOTAL</b>	<b>10,25</b>	<b>9,75</b>	<b>13,5</b>	<b>17,25</b>
<b>GRUPPE TOTAL</b>	<b>10</b>		<b>14,1</b>	
<b>MITTELWERT</b>	<b>-4,1</b>			

Der nach DIN Norm errechnete Mittelwert ist mit -4,1 erneut negativ. Damit kann das Prüfmaterial im Vergleich zum Kontrollmaterial unter den untersuchten Bedingungen auch nach 8 Wochen als weniger reizend für das Gewebe angesehen werden.



**Abbildung 28. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 8 Wochen nach der Implantation**

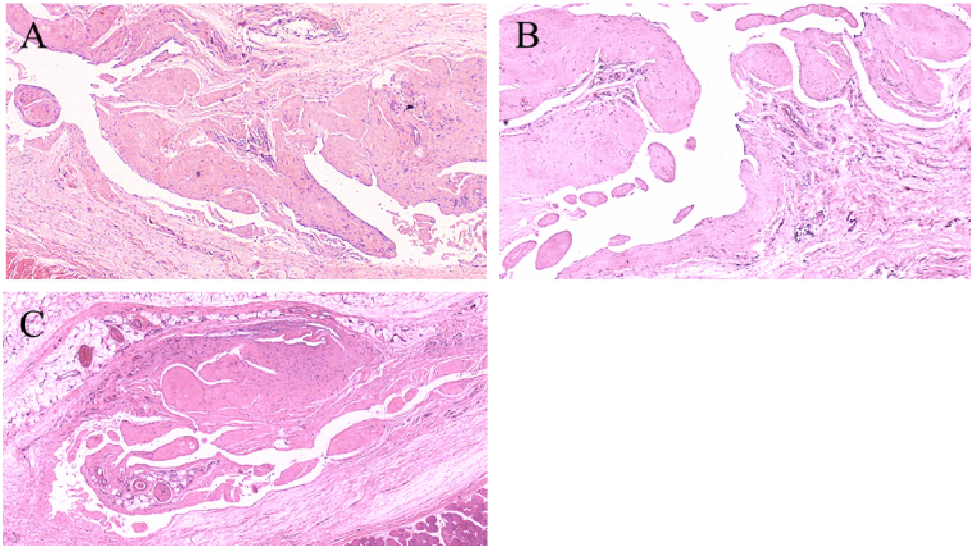


**Abbildung 29. Vergleichende Darstellung der Zellgehalte von Prüf- und Kontrollgewebe 8 Wochen nach Implantation**

Wie zu den Zeitpunkten vorher war das Testgewebe zellärmer und bindegewebsreicher (Abb. 28). Die Fibrose war nun beim Testgewebe deutlich ausgeprägter als beim Kontrollgewebe (Abb. 29). Bei diesem waren erneut deutlich Anzeichen der Fremdkörperreaktion darstellbar. Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen waren im Kontrollmaterial gering- bis mittelgradig nachweisbar, während sie im Testgewebe nicht bis minimal vorhanden waren (Abb. 29).

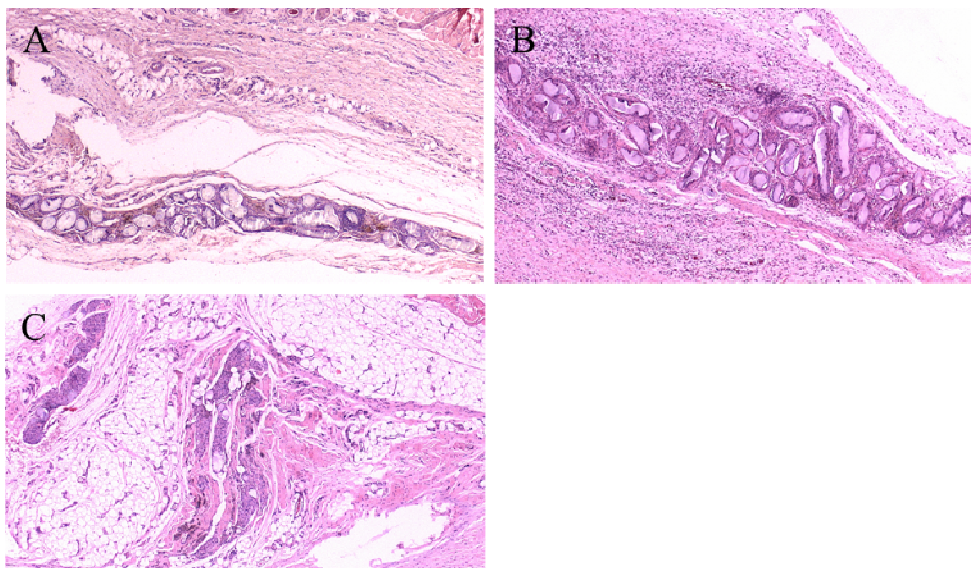
#### **5.4.4 Zeitpunkt 12, 16 und 26 Wochen**

Die Explantationszeitpunkte 12, 16 und 26 Wochen sind in den folgenden Abbildungen vergleichend dargestellt, da hier beim Testimplantat keine Veränderungen mehr vorzufinden waren. Das Material war bereits vollständig degradiert und in den histologischen Präparaten nicht mehr darstellbar.



**Abbildung 30. Übersichtsaufnahmen (20x, HE) des Testisgewebes im zeitlichen Verlauf nach 12 (A; Tier 36), 16 (B; Tier 55) und 26 (C; Tier 69) Wochen**

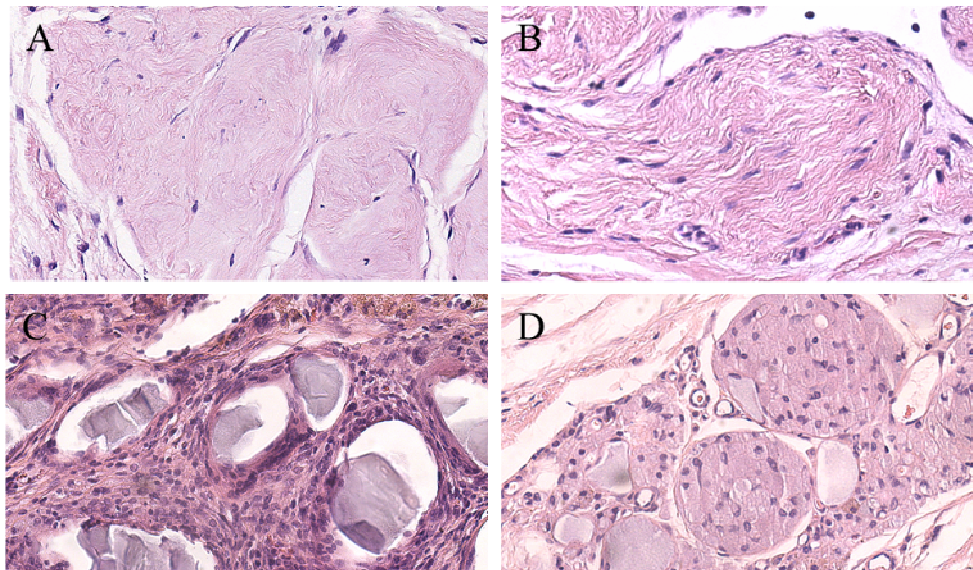
In keinem der histologischen Präparate waren noch Implantatreste zu erkennen (Abb. 30 A bis C). Das Material war bereits vollständig degradiert. Die unregelmäßige Struktur des Unterhautgewebes in diesem Bereich und das lockere Bindegewebe ließen darauf schließen, dass sich in diesem Bereich das Scaffold befunden hat. Es zeigten sich nur fibrosierende, zellarme Bindegewebsnarben und leichte Hohlrumbildungen (Abb. 30 B). Das Gewebe im Implantationsbereich war regeneriert und zeigte keine Anzeichen einer entzündlichen oder neoplastischen Reaktion.



**Abbildung 31. Übersichtsaufnahmen (20x, HE) des Kontrollgewebes im zeitlichen Verlauf nach 12 (A; Tier 35), 16 (B; Tier 49) und 26 (C; Tier 63) Wochen**



Im Gegensatz zu dem Testimplantat war das Kontrollimplantat auch nach 12, 16 und 26 Wochen histologisch deutlich darstellbar (Abb. 31 A bis C). Dies war zu erwarten und entspricht den Angaben des Herstellers. Die Degradationsanzeichen waren aber auch hier deutlich und fortschreitend zu erkennen. Zum letzten Zeitpunkt der Studie nach 26 Wochen war auch das Kontrollmaterial nun nicht mehr als zusammenhängende Struktur zu sehen (Abb. 31 C). Auch die Abgrenzung zur umliegenden Subcutis verschwamm. In Teilen war das Material von Fett- und Bindegewebe durchwachsen (Abb. 31 C).



**Abbildung 32. Detailaufnahmen (40x, HE) des Testgewebes nach 12 (A; Tier 36) und 26 Wochen (B; Tier 68), sowie des Kontrollgewebes nach 12 (C; Tier 30) und 26 Wochen (D; Tier 59)**

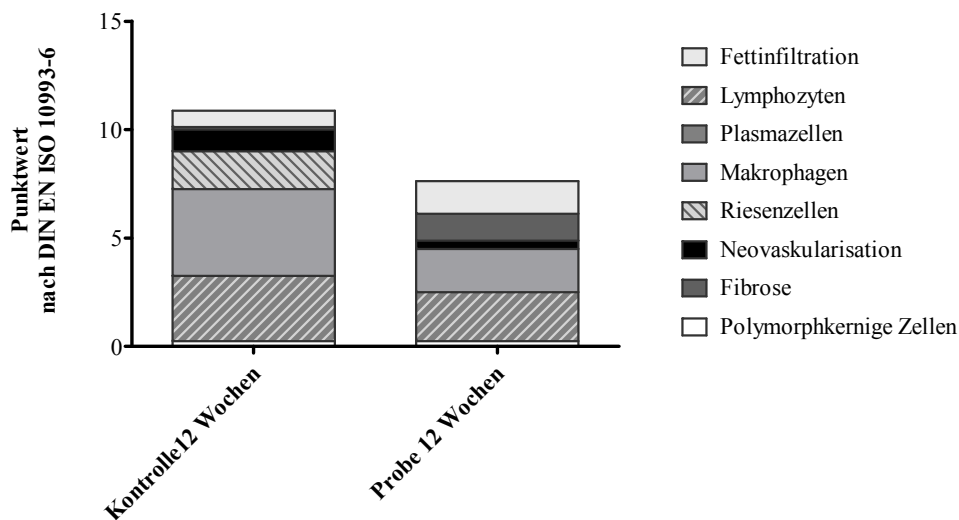
Bei dem Testmaterial waren dagegen lediglich zellarme Bindegewebsnarben zu sehen (Abbildung 32 A). Vereinzelt waren Fibroblasten und Lymphozyten darstellbar. Eine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion war nicht vorhanden. In dem Gewebe mit dem Kontrollmaterial war nach 16 Wochen noch eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion darstellbar. Makrophagen, Riesenzellen und Hämosiderophagen waren anzutreffen. Nach 26 Wochen war auch bei dem Kontrollmaterial eine deutliche Verringerung der Zellzahlen zu erkennen (Abb. 32 D). Das Material war noch darstellbar, aber weitestgehend degeneriert.

## 5. Ergebnisse

**Tabelle 8. Ergebnisse der vergleichenden semiquantitativen Auswertung des Probe -und Kontrollgewebes 12, 16 und 26 Wochen nach Implantation in Anlehnung an DIN EN ISO 10993**

Explantationszeitpunkt	12 Wochen (n=4)				16 Wochen (n=4)				26 Wochen (n=4)			
	Probe		Kontrolle		Probe		Kontrolle		Probe		Kontrolle	
Implantat												
Tiernummer	36	38	30	31	54	55	44	47	68	69	58	59
Polymorphkernige Zellen	0,25	0	0,25	0	0,25	0,25	0	0	0,75	0,25	0,5	0,75
Lymphozyten	1,25	1	1,75	1,25	0,25	0,75	0,25	0	1,25	1,25	1,75	1,5
Plasmazellen	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0
Makrophagen	1	1	3	1	0,25	0,75	2	1,5	0,75	1	2,5	1,25
Riesenzellen	0	0	1,5	0,25	0	0	1	1	0	0	0	0
Nekrose	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>SUBTOTAL(X2)</b>	<b>5</b>	<b>4,5</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,75</b>	<b>6,5</b>	<b>5</b>	<b>5,5</b>	<b>5</b>	<b>9,5</b>	<b>7</b>
Neovaskularisation	0,5	0,25	1	1	0,25	0,25	0,75	0,75	0,25	0,5	1,75	1,5
Fibrose	2,5	0	0	0,25	0,5	0,25	0	0	1,25	2,5	0	0
Fettinfiltration	0	3	0	1,5	0	0	1,75	0	0	0	2	1,25
<b>SUBTOTAL</b>	<b>3</b>	<b>3,25</b>	<b>1</b>	<b>2,75</b>	<b>0,75</b>	<b>0,5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,75</b>	<b>1,5</b>	<b>3</b>	<b>3,75</b>	<b>2,75</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>7,75</b>	<b>14</b>	<b>7,75</b>	<b>2,25</b>	<b>2,25</b>	<b>9</b>	<b>5,75</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>13,25</b>	<b>9,75</b>
<b>GRUPPE TOTAL</b>	<b>7,9</b>		<b>10,9</b>		<b>2,3</b>		<b>7,4</b>		<b>7,5</b>		<b>11,5</b>	
<b>MITTELWERT</b>	<b>-3</b>				<b>-5,1</b>				<b>-4</b>			

Die sich nach der DIN Norm ergebenden Mittelwerte sind für jeden Zeitpunkt negativ (Tab. 8). Das bedeutet, dass das Prüfmateriale im Vergleich zum Kontrollmateriale unter den untersuchten Bedingungen auch nach 12, 16 und 26 Wochen als weniger reizend für das Gewebe angesehen werden kann.



**Abbildung 33. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 12 Wochen nach der Implantation**

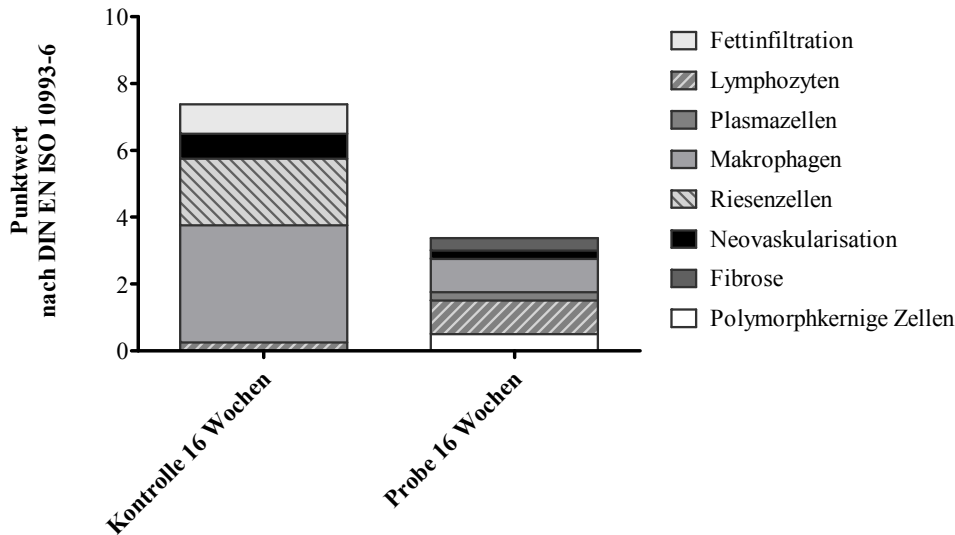


Abbildung 34. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 16 Wochen nach der Implantation

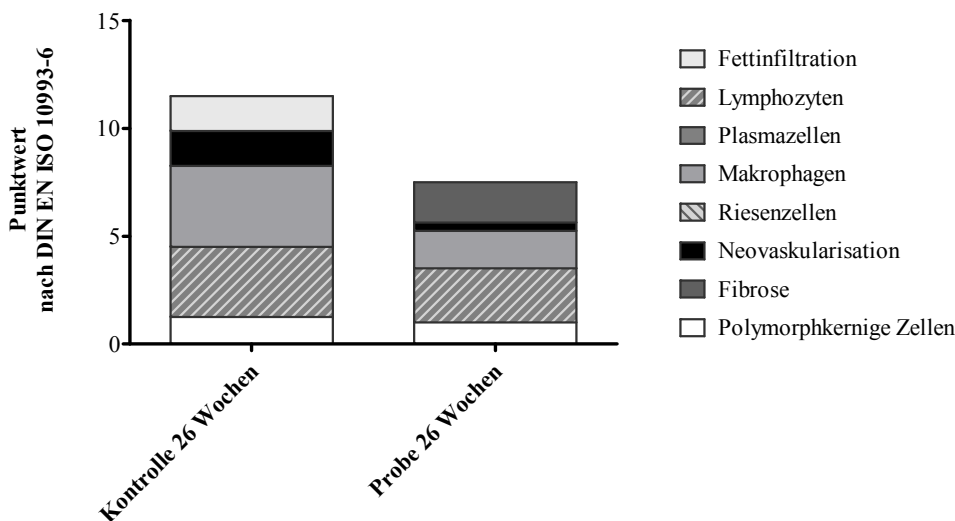


Abbildung 35. Vergleich der Gesamtreaktion des Gewebes 26 Wochen nach der Implantation

Trägt man die Punktwerte der Bewertungskriterien der DIN Norm zu den Explantationszeitpunkten 12, 16 und 26 Wochen jeweils im Vergleich vom Kontrollmaterial zum Testmaterial gegeneinander auf, stellt sich das Gewebe mit dem Kontrollmaterial durchweg gewebereaktionsstärker dar (Abb. 33 bis 35). Wie bereits in den vorherigen Zeitpunkten erreichte das Testmaterial einen geringeren Punktwert. In den Bildern der histologischen Präparate konnte man bereits gesehen, dass das Kontrollmaterial noch vermehrt eine Fremdkörperreaktion zeigte. Dies spiegelte sich auch in den Zellgraphiken wieder (Abb. 33 bis 35). Makrophagen, Lymphozyten und Riesenzellen überwogen vor den anderen Bewertungskriterien beim Kontrollimplantat. Beim Testimplantat war vornehmlich

fibrosierendes Gewebe vorzufinden. Über diese drei Zeitpunkte gesehen wies das Gewebe mit dem Testimplantat einen Punktmittelwert für das Bewertungskriterium Fibrose von 1,2 auf, das Kontrollgewebe einen Punktmittelwert von nur 0,04. In dem Gewebe mit dem Kontrollimplantat war der Punktmittelwert für Makrophagen über die drei Zeitpunkte im Kontrollgewebe 1,9 und im Testgewebe 0,8. Der deutlichste Unterschied zwischen den Geweben zeigte sich hier in der Betrachtung der Riesenzellinfiltration. So wies das Gewebe mit dem Kontrollimplantat eine minimale Riesenzellinfiltration auf, das Gewebe mit dem Testimplantat dagegen keine Infiltration mit Riesenzellen. Die Lymphozyteninfiltration war in beiden Geweben minimal (Punktmittelwert 1).

### **5.4.5 Fazit**

Das Prüfmaterial ist gemäß DIN Norm 10993 zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung unter den Bedingungen dieser Untersuchung als nicht reizend im Vergleich zum Kontrollmaterial anzusehen.

Der zu untersuchende Gelatine-PLGA-Scaffold war in seiner Struktur für die Zellen gut zu durchwachsen und lies sich sehr gut in die Umgebung integrieren. Des Weiteren war keine Fremdkörperreaktion darstellbar und es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung Hinweise auf Neoplasien. Im Vergleich zu dem Kontrollmaterial Ethisorb<sup>®</sup>, zeigte das Testimplantat einen deutlich schnelleren Abbau.

Das Kontrollmaterial stellte sich mit einer mäßig bis stark ausgeprägten Entzündungsreaktion dar. Auch eine Fremdkörperreaktion konnte identifiziert werden. Im Gegensatz zu dem Prüfkörper zeigte sich hier sehr zellreiches Bindegewebe.

Das Testmaterial zeigte also im Vergleich zum Kontrollmaterial eine bessere Biokompatibilität.

### **6. Diskussion der histologischen Ergebnisse**

Im Rahmen der Biokompatibilitätsprüfung des Gelatine-PLGA-Scaffold gemäß DIN EN ISO 10993 wurden 84 Ratten mit subkutanen Implantaten versorgt. Die Hälfte von ihnen bekam als Prüfgruppe je 4 Testimplantate subkutan implantiert. Analog wurden die verbleibenden 42 Ratten als Kontrollgruppe mit Ethisorb<sup>®</sup>-Vliese subkutan versorgt. Die Ethisorb<sup>®</sup>-Vliese dienen dabei als Referenzmaterial für ein bereits zugelassenes Medizinprodukt mit bekannter Biokompatibilität. Nach verschiedenen Zeitspannen zwischen 2 und 26 Wochen wurden die Implantate wieder entnommen, das umliegende Gewebe histologisch aufgearbeitet und im Hinblick auf die Gewebereaktionen ausgewertet. Ziel der Arbeit war die qualitative und quantitative Bestimmung der eingewanderten Zellen und die Bewertung der Gewebereaktion auf das Implantat, insbesondere im Hinblick auf die Gewebeverträglichkeit.

#### *Biokompatibilität der Implantate im Vergleich*

Schon 1988 meint Ziats, dass die Reaktionen des Gewebes auf ein implantiertes Material die Biokompatibilität eines Materials maßgeblich bestimmen. Ein Material gilt als biokompatibel wenn es in einer biologischen Umgebung eine gewünschte Funktion erfüllen kann und dabei eine bestimmte Reaktion hervorruft (D.F. Williams, 1987). Hong konkretisiert 2004 diese Reaktion, in dem er sagt, dass ein Scaffold als biokompatibel gilt, wenn es nur eine dünne Lage von Makrophagen um das Implantat gibt.

Jede Implantation ist mit einer lokalen entzündlichen Gewebereaktion vergesellschaftet (Hong et al. 2004). Da eine Implantation immer mit Verletzungen von Blutgefäßen einhergeht, ist das Blut das erste Medium, das mit dem Implantat in Kontakt tritt. So kommt es zunächst zu Blut-Implantatinteraktionen mit Ausbildung einer provisorischen Matrix durch Proteinadhäsionen aus dem Blut an der Oberfläche des Implantats (Anderson, Rodriguez et al. 2008). Diese enthält vorrangig Fibrinogen und zahlreiche Entzündungszellmediatoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine, die weitere Zellen aktivieren. Es folgt eine Phase der akuten Entzündung, dessen Zellbild vorrangig durch polymorphkernige Zellen geprägt ist (Anderson, Rodriguez et al. 2008). In dieser Studie fand die erste histologische Beurteilung der Gewebereaktion 2 Wochen nach der Implantation statt. Sowohl das Testimplantat, als auch das Kontrollimplantat war histologisch deutlich darstellbar und gut in die umgebende Subcutis integriert und großteils mit Gewebe durchwachsen worden. Das Zellbild war bereits durch deutlich mehr Makrophagen und Lymphozyten im Vergleich zu polymorphkernigen Zellen geprägt. Dies ist mit der Aussage von Anderson 2008 zu vereinbaren, dass die Phase

der akuten Entzündung abhängig vom Grad der Verletzung durch die Implantation etwa eine Woche andauert (Anderson 2008). In diesem Fall war der Eingriff sehr klein und nur oberflächlich. Es ist also zu erwarten gewesen, dass die akute Entzündung bereits am Abklingen ist. Die akute Entzündung geht anschließend in eine chronische Entzündung über. Diese ist vorrangig geprägt durch mononukleäre Zellen, wie Monozyten und Makrophagen und ist ebenfalls meist nur von kurzer Dauer. Ihr folgt die Fremdkörperreaktion, in welcher zusätzlich zu den Monozyten und Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen auftreten. Diese phagozytierende Zellen entstehen durch Fusion von Makrophagen und interagieren mit der Oberfläche des Implantates (Anderson, Rodriguez et al. 2008). Im Gegensatz zu dem Kontrollgewebe waren 2 Wochen *post implantationem* im Testgewebe keine Fremdkörperriesenzellen nachweisbar. So befand sich das Kontrollgewebe bereits in der Fremdkörperreaktion, während im Testgewebe keine Fremdkörperreaktion, sondern nur eine milde chronische Entzündungsreaktion darstellbar war. 4 Wochen nach der Implantation hatte sich das Zellbild im Testgewebe etwas verändert. Nun waren auch hier vereinzelt Fremdkörperriesenzellen darstellbar. Im Vergleich mit dem Kontrollgewebe fiel die Fremdkörperreaktion allerdings mild aus. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Testmaterial vorrangig aus Gelatine besteht und daher schneller für die phagozytierenden Zellen abbaubar ist, als die Polyglactin und Polydioxanon Bestandteile des Kontrollmaterials. Die nächste Stufe in der Reaktion eines Gewebes auf einen Fremdkörper ist die Ausbildung von granulierendem Gewebe. Das Granulationsgewebe ist vorrangig geprägt durch Neovaskularisation, Fibroblasten und Makrophagen. Beide Gewebe zeigten bereits nach 2 Wochen Ansätze von Neovaskularisation. Dies bedeutet, dass hier bereits die chronische Entzündung bzw. die Fremdkörperreaktion mit Granulationsgewebe durchsetzt wird. Nach Anderson 2008 dauert die Phase der chronischen Entzündung bei biokompatiblen Materialien, sofern keine Infektion vorliegt, nur etwa 2 Wochen. Dies ist mit beiden Materialien zu vereinbaren. Die granulierende Gewebereaktion ist die Grundlage der abschließenden Fibrosierung des Gewebes bzw. der Ausbildung einer fibrösen Kapsel um das Implantat. Nach 8 Wochen war im Testgewebe histologisch kein Implantat mehr nachweisbar, da das Scaffold bereits vollständig degradiert war. Im ehemaligen Implantatbereich war vorrangig zellarmes fibröses Gewebe mit Neovaskularisation darstellbar. Laut Ziats 1988 wäre die Ausbildung einer nur minimalen Fibrose das optimale Ergebnis der Gewebereaktion auf ein Implantat. Er sagt aber auch, dass die Fibroblastenmigration und Proliferation im Zuge der Remodellierung des Gewebes und Wundheilung oft zu eher avaskulären und zellarmen Geweben führt. Da das Gelatineimplantat in Knorpeldefekte eingesetzt werden soll und

Knorpelgewebe ein sehr matrixreiches und zellarmes Gewebe ist, sollte dieser Aspekt dem Implantat nicht negativ angewertet werden.

Da das Kontrollmaterial deutlich länger erhalten blieb als das Testmaterial ist auch die Gewebereaktion auf das Kontrollmaterial anders ausgeprägt. Hier waren nach 8 Wochen *post implantationem* noch deutlich mehr Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen und Lymphozyten anzutreffen. Die granulierende Reaktion war deutlich ausgeprägt aber die Ausbildung von zellarmem fibrosierendem Gewebe war noch deutlich geringer. Nach 16 und 26 Wochen war das Gewebe mit dem Testimplantat weitgehend regeneriert und wie bereits nach 8 Wochen war vorrangig zellarmes fibröses Bindegewebe darstellbar. Vereinzelt waren noch Lymphozyten und Makrophagen anzutreffen. Eine Fremdkörperreaktion war allerdings nicht mehr nachweisbar. Aufgrund der langsamen Degradationsrate des Kontrollimplantates war erst nach 26 Wochen im Kontrollgewebe ein deutliches Abklingen der Fremdkörperreaktionen nachweisbar. Insgesamt war das Gewebe noch zellreich und die granulierende Gewebereaktion noch ausgeprägter.

### *Vergleichbarkeit der Implantate*

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, war besonders in der Endphase der Untersuchung die Reaktion des Gewebes auf das Kontrollimplantat deutlich ausgeprägter. Im Vergleich zum Testgewebe befand sich das Kontrollgewebe aber auch noch in einer anderen Stufe der Gewebereaktion. Nach 26 Wochen war das Testmaterial bereits seit Wochen degradiert, während im Kontrollmaterial noch Implantatbestandteile nachweisbar waren. Demnach müsste man das Gewebe des Kontrollmaterials nach einer späteren Zeitspanne erneut untersuchen, um es in einen direkten zeitlichen Vergleich mit dem Testgewebe stellen zu können.

### *Abbaubarkeit des Gelatine-PLGA-Scaffolds*

Betrachtet man die Resorptionszeit des Test-Scaffolds so war festzustellen, dass der Gelatine-Scaffold nach 8 Wochen bereits vollständig degradiert und histologisch nicht mehr nachweisbar ist. Im Vergleich zum Kontroll-Scaffold fand also eine wesentlich schnellere Degradation statt. Es stellt sich daher die Frage, ob das Implantat eine ausreichende Stabilität für den Einsatz als Scaffold in der Knorpelregeneration besitzt. Idealerweise sollte das Scaffold eine Degradierungskinetik besitzen, die mit der sukzessiven Regeneration eines Knorpeldefektes synchron läuft (Freed, Vunjak-Novakovic et al. 1994). Der Hauptbestandteil des Test-Scaffolds ist Gelatine. Gelatine wird hauptsächlich enzymatisch durch Kollagenasen

abgebaut, was auf den Scaffold übertragbar ist. Thiem konnte in in-vitro-Versuchen zeigen, dass die Abbaurate des Gelatine-Scaffolds unter Anwesenheit von Kollagenasen am höchsten ist. Zu beachten ist, dass die Enzymaktivität und der Kollagenasegehalt in der Subkutis höher sind als im Knorpelgewebe. Laut Aigner 2003 wird im adulten Knorpelgewebe nahezu keine Kollagenase exprimiert. Man kann also annehmen, dass die Degradation des Gelatine-Scaffolds im Knorpeldefekt langsamer vonstattengeht. Dies sollte allerdings in weiteren Versuchen, mit direkter Implantation im Knorpelgewebe abgeklärt werden.

### *Schlussfolgerung und Ausblick*

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Gelatine-Scaffold gut in die umgebende Subkutis integriert und gut mit Gewebe durchwachsen worden ist. Im Vergleich zum Kontrollmaterial Ethisorb<sup>®</sup> zeigte er eine schnellere Degradationsrate. Diese gilt es im Hinblick auf die Funktionalität des Gelatine-Scaffolds als Trägermaterial für die Knorpelregeneration genauer zu untersuchen. Die Gewebereaktion auf den Gelatine-Scaffold verlief wie erwartet. Es zeigte sich der typische Ablauf einer Gewebereaktion auf einen Fremdkörper. Im Vergleich zu dem bereits zugelassenen Kontroll-Scaffold verlief die Fremdkörperreaktion aber ausgesprochen mild. Insgesamt zeigten die zu untersuchenden Gelatine-PLGA-Scaffolds eine gute Biokompatibilität. Demnach ist das Gelatine-Scaffold geeignet, um in weiteren in-vivo-Tests, wie präklinischen Studien im Arthrosemodell eingesetzt werden zu können.



## 7. Zusammenfassung/Summary

### *Biokompatibilitätsprüfung eines Gelatine-PLGA-Scaffolds für die Knorpelregeneration im Rattenmodell*

Aufgrund des schlechten Eigenreparationspotentials des Gelenkknorpels führen Fehlbelastungen, Traumata und chronische entzündliche Erkrankungen des Gelenks oftmals zu progressiven Gelenkbeschwerden oder Arthrosen. Um die Regeneration von Knorpeldefekten zu unterstützen gibt es verschiedenste Ansätze in Therapie und Forschung. Bei der derzeit vielversprechendsten Methode werden Trägermaterialien (Scaffolds) in die Knorpeldefekte eingebracht, welche den Knorpelzellen Struktur und Stabilität beim Einwachsen in den Defekt bieten sollen. Nichtsdestotrotz bieten die meisten bisher erhältlichen Trägermaterialien nicht alle gewünschten Eigenschaften für eine effiziente Knorpelregeneration. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein neuartiges Trägermaterial, basierend auf Gelatine und PLGA, auf seine Biokompatibilität, im Rahmen einer Langzeitimplantationsstudie im Rattenmodell, getestet. Der Hälfte der insgesamt 84 weiblichen Wistar Ratten wurden die Gelatine-PLGA-Testimplantate subkutan implantiert, der anderen Hälfte die Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade als Vergleichsimplantat mit bekannter Biokompatibilität. Nach unterschiedlich langen Zeitintervallen, zwischen 2 und 26 Wochen, wurde das Gewebe um die Implantate histologisch aufgearbeitet und die Gewebereaktion in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993 ausgewertet und bewertet. Dabei zeigte sich, dass das Gelatine-Scaffold gut in die umgebende Subkutis integriert und bindegewebig durchwachsen wurde. Im Vergleich zum Kontrollmaterial Ethisorb<sup>®</sup> zeigte er eine schnellere Degradationsrate. So war das Gelatine-Scaffold nach 8 Wochen histologisch nicht mehr nachweisbar, während das Kontroll-Scaffold auch nach 26 Wochen noch histologisch erkennbar war. Im Vergleich zu dem bereits zugelassenen Kontroll-Scaffold verlief die Fremdkörperreaktion auf das zu untersuchenden Gelatine-PLGA-Scaffold ausgesprochen mild. Das Gelatine-PLGA-Scaffold weist also über den gesamten Versuchszeitraum eine gute Biokompatibilität auf. Je nach gewünschter Eigenschaft stellt das Gelatine-PLGA-Scaffold somit eine potenzielle, gut abbaubare und gewebeverträgliche Alternative zu den momentan erhältlichen Scaffolds dar.

### *Biocompatibility control of a gelatin-PLGA-scaffold for cartilage regeneration in a rat model*

Cartilage has a limited capacity for repair. Inappropriate biomechanical stress and inflammatory diseases of the joint can result in progressive pain or osteoarthritis. There are various approaches to treatment and research to support the regeneration of cartilage. The most promising method adopts scaffolds into the cartilage defects. Ideally they would provide the cartilage with cells and offer stability for the ingrowth of new tissue. However, currently available scaffolds don't offer all desired qualities for efficient cartilage regeneration. Therefore, a new scaffold based on gelatin and PLGA was tested for its biocompatibility over an extended time period in a rat model. This was compared against Ethisorb<sup>®</sup> Tamponade, an implant with well-known biocompatibility. Half of the total 84 female Wistar rats had the gelatin-PLGA-scaffold subcutaneously implanted, the other half the control. After various time intervals between 2 and 26 weeks the tissue around the implants was examined histologically and the foreign body reaction was evaluated according to DIN EN ISO 10993. The new scaffold was well integrated into the surrounding subcutaneous tissue and infiltrated with connective tissue. Compared to the control, the new scaffold showed improved resorption. Thus after 8 weeks the test item was no longer detectable histologically, while the control item was still histologically evident after 26 weeks. Compared to the control, the new scaffold caused a milder inflammatory response. The gelatin-PLGA-scaffold is a potential, biodegradable and biocompatible alternative to currently available scaffolds.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aigner, T.; Eger, W.; Dimmler, A. W. (2003): Morphologie und Biochemie des Gelenkknorpels. *Biomaterielien*, Jg. 4, H. 1, S. 6–10.
- Ameys, L. G.; Young, M. F. (2006): Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". *Current opinion in rheumatology*, Jg. 18, H. 5, S. 537–547.
- Anderson, J.; Rodriguez, A.; Chang, D. (2008): Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, Jg. 20, H. 2, S. 86–100.
- BMELV (2010): Anzahl der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Abgerufen am 05.3.2012 um 12.03 Uhr, von [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.pdf?__blob=publicationFile)
- Bogdanski, D. (2005): Untersuchungen zur Biokompatibilität und Biofunktionalität von Implantatmaterialien am Beispiel von Nickel-Titan-Formgedächtnislegierungen. Dissertation. Bochum. Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie.
- Brittberg M., Lindahl A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine*, Jg. 331, H. 14, S. 889–895.
- Bruns, J.; Steinhagen, J. (2000): Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität – Biologische Grundlagen. *Lesions of articular cartilage and osteoarthritis*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jg. 51, H. 2, S. 42–47.
- Chung, C.; Burdick, J. (2008): Engineering Cartilage Tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Jg. 60, H. 2, S. 243–262.
- DIN-Norm DIN EN ISO 10993-6 (2007): Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- Engelhardt, M. (2003): Die intraartikuläre Hyaluronsäurebehandlung der Arthrose. *Intraarticular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jg. 54, H. 6, S. 205–208.
- Erggelet, C.; Mandelbaum, B.; Lahm, A. (2000): Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe – Klinische Grundlagen. *The therapy of cartilage defects - clinical concepts*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jg. 51, H. 2, S. 48–54.
- Freed, L. E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R. J.; Eagles, D. B.; Lesnoy, D. C.; Barlow, S. K.; Langer, R. (1994): Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Nat Biotechnol*, Jg. 12, H. 7, S. 689–693.
- Gaissmaier, C.; Fritz, J.; Benz, K.; Stoop, R.; Schewe, B.; Weise, K. (2003): Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *SFA Arthroskopie Aktuell*, Jg. 16, 16 der Gesamtfolge, S. 4–14.
- Gerwin, N.; Bendele, A. M.; Glasson, S.; Carlson, C. S. (2010): The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*, Jg. 18, H. 3, S. 24–34.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde (2004): Tiergerechte Haltung von Laborratten. Herausgegeben von Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung. Abgerufen am 6.3.2012 um 12.30 Uhr, von <http://www.gv-solas.de/auss/hal/rattenhaltung.pdf>

- Gesetz über Medizinprodukte (1995): Medizinproduktegesetz. MPG. Fundstelle: 7102-47. Abgerufen am 5.03.2012 um 11.55 Uhr, von <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/mpg/gesamt.pdf>
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2011): Das Informationssystem der Gesundheitsberichterstattung. Definition Arthrose. Abgerufen am 6.03.2012 um 12.18 Uhr, von [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de).
- Hong, S. R.; Chong, M. S.; Lee, S. B.; Lee, Y. M.; Song, K. W.; Park, M. H.; Hong, S. H. (2004): Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *Journal of biomaterials science*, Jg. 15, H. 2, S. 201-211.
- Hunziker, E. B. (1999): Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage*, Jg. 7, H. 1, S. 15–28.
- Hutmacher, D. W. (2000): Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, Jg. 21, H. 24, S. 2529–2543.
- Iannaccone, R.; Jacob, H. (2009): Rats! *Disease Models & Mechanisms*, Jg. 2, 5-6, S. 206–210.
- Ivics, Z.; Izsvák, Z.; Chapman, K. M.; Hamra, F. K. (2010): Sleeping Beauty transposon mutagenesis of the rat genome in spermatogonial stem cells. *Methods*, Jg. 53, H. 4, S. 356–365.
- Kim, M. S.; Ahn, H.; Shin, Y. N.; Cho, M. H.; Khang, G.; Lee, H. B. (2007): An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds. *Biomaterials*, Jg. 28, H. 34, S. 5137–5143.
- Kneser, U.; Schaefer, D. J.; Polykandriotis, E.; Horch, R. E. (2006): Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine.*, Jg. 10, H. 1, S. 7–19.
- Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. (2001): Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, Jg. 221, 1-2, S. 1–22.
- Lee, N. K.; Oh, H. J.; Hong, C. M.; Suh, H.; Hong, S. H. (2009): Comparison of the Synthetic Biodegradable Polymers, Polylactide (PLA), and Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) as Scaffolds for Artificial Cartilage. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Jg. 14, H. 2, S. 180–186.
- Li, H.; Zheng, Q.; Xiao, Y.; Feng, J.; Shi, Z.; Pan, Z. (2009): Rat Cartilage Repair Using Nanophase PLGA/HA Composite and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Jg. 24, H. 1, S. 83–99.
- Lindblad-Toh, K. (2004): Three's company. *Nature*, Jg. 428, H. 4, S. 475–476.
- Martinek, V. (2003): Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, Jg. 54, H. 6, S. 166–170.
- o. Verf. (2010): Rats! In: *Nature Methods*, Jg. 7, H. 6, S. 413.
- Outerbridge, R. E. (1961): The Etiology Of Chondromalacia Patellae. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume.*, Jg. 43, H. 4, S. 752–757.
- Pelttari, K.; Wixmertens, A.; Martin, I. (2009): Do we really need cartilage tissue engineering? *Swiss medical weekly*, Jg. 139, 41-42, S. 602–609.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004): Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, Jg. 428, H. 1, S. 493–521.

- Richtlinie 90/385/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über aktive implantierbare medizinische Geräte. Abgerufen am 6.03.2012 um 12.37 Uhr von [http://www.gaa.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16498/1\\_1\\_1.pdf](http://www.gaa.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16498/1_1_1.pdf)
- Richtlinie 93/42/EWG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 14. Juni 1993 über Medizinprodukte. Medizinprodukte-Richtlinie. Abgerufen am 6.03.2012 um 12.39 Uhr von <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1993L0042:20071011:de:PDF>
- Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika. Abgerufen am 6.03.2012, um 12.41 Uhr, von <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:331:0001:0037:DE:PDF>
- Scharf, H.; Rüter, A.; Pohlemann, T.; Marzi, I.; Kohn, D.; Günther, K. (2009): Orthopädie und Unfallchirurgie. Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung. München: Urban und Fischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Schneider, U. (2003): Perspektiven des Tissue Engineerings am Gelenkknorpel. Akt Rheumatol, Jg. 28, H. 6, S. 322-327.
- Skalak, R. (26-29 Februar 1988): Tissue Engineering. Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, 26-29 Februar 1988. Lake Tahoe, California. New York, Alan Liss.
- Stoop, R. (2008): Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. Injury, Jg. 39, H. 1, S. 77-87.
- Thiem, A. (2011): Entwicklung und Testung eines resorbierbaren Trägermaterials für die Behandlung von artikulären Knorpeldefekten. Dissertation. Berlin. Technische Universität Berlin.
- Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten. MPKPV (2010). Abgerufen am 6.03.2012 um 12.45 Uhr, <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/mpkpv/gesamt.pdf>
- Volk, N.; Klüß, C. (2010): Klinische Studien von Medizinprodukten. Übersicht und Ausblick der aktuellen Gesetzgebung und Normen. Kardiotechnik, Jg. 5, H. 1, S. 12-19.
- Wendler, N. O.; Gellißen, J.; Russlies, M.; Behrens, P. (2006): Autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC®) – ein neues Therapiekonzept zur Knorpeldefektbehandlung. MedReview, Jg. 7, H. 1, S. 8-9.
- Williams, D. F. (3.-5. März 1986): Definitions in biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, 3.-5. März 1986, Elsevier, New York.
- Winkler, M. G. (2009): Einfluss des Wachstumsfaktors VEGF auf die initiale Kapillarisation beim Einbringen von PLGA-Scaffolds in Defekte kritischer Größe der Schädelkalotte der Maus – Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in einem neuartigen Schädelkammermodell. Dissertation. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Zacher, J. (2000): Arthrose: Ätiologie und Pathogenese. Klinik und Forschung, Jg. 6, H. 2, S. 4-5.
- Zehbe, R.; Goebbels, J.; Ibold, Y.; Gross, U.; Schubert, H. (2010): Three-dimensional visualization of in vitro cultivated chondrocytes inside porous gelatine scaffolds: A tomographic approach. Acta biomaterialia, Jg. 6, H. 6, S. 2097-2107.
- Ziats, N.; Miller, K.; Anderson, J. (1988): In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. Biomaterials, Jg. 9, H. 1, S. 5-13.

## 9. Anhang

**Tabelle 9. Histologisches Punktbewertungssystem (Zelltyp/Reaktion) aus DIN EN ISO 10993, Anhang E**

Zelltyp/Reaktion	Punktwert				
	0	1	2	3	4
Polymorphkernige Zellen	0	selten, 1 bis 5 je phf <sup>a</sup>	5 bis 10 je phf	starkes Infiltrat	gepackt
Lymphozyten	0	selten, 1 bis 5 je phf	5 bis 10 je phf	starkes Infiltrat	gepackt
Plasmazellen	0	selten, 1 bis 5 je phf	5 bis 10 je phf	starkes Infiltrat	gepackt
Makrophagen	0	selten, 1 bis 5 je phf	5 bis 10 je phf	starkes Infiltrat	gepackt
Riesenzellen	0	selten, 1 bis 2 je phf	3 bis 5 je phf	starkes Infiltrat	Lagen
Nekrose	0	minimal	leicht	mäßig	schwer

<sup>a</sup> phf = je stark vergrößertes (400x) Feld

**Tabelle 10. Histologisches Punktbewertungssystem (Reaktion) aus DIN EN ISO 10993, Anhang E**

Reaktion	Punktwert				
	0	1	2	3	4
Neovascularisation	0	minimale Kapillarwucherung, herdförmig, 1 bis 3 Knospen	Gruppen von 4 bis 7 Kapillaren mit fibroblastischen Trägerstrukturen	breites Kapillarband mit Trägerstrukturen	ausgedehntes Kapillarband mit fibroblastischen Trägerstrukturen
Fibrose	0	schmales Band	mäßig dickes Band	dickes Band	ausgedehntes Band
Fettinfiltration	0	minimale mit Fibrose verbundene Fettmenge	mehrere Schichten von Fett und Fibrose	lange und breite Anhäufung von Fettzellen um die Implantatstelle	ausgedehntes das Implantat vollständig umgebendes Fett

**Tabelle 11. Halbquantitatives Punktbewertungssystem aus DIN EN ISO 10993, Anhang E**

	UNTERSUCHUNGSPROBE			KONTROLLPROBE		
<b>Tier-Nummer:</b>						
Entzündung						
Polymorphkernige Zellen						
Lymphozyten						
Plasmazellen						
Makrophagen						
Riesenzellen						
Nekrose						
SUBTOTAL (X2)						
Neovascularisation						
Fibrose						
Fettinfiltration						
SUBTOTAL						
TOTAL						
GRUPPE TOTAL						
MITTELWERT <sup>a</sup>	PROBE (-) KONTROLLE =					
Traumatische Nekrose						
Fremdstoffrümmer						
Anzahl der untersuchten Stellen						

<sup>a</sup> Wird zur Ermittlung der Rangwertung für Reizung, unten als Schlussfolgerung dargestellt, verwendet. Eine negative Differenz wird als Null registriert.

### **10. Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die umfassende Unterstützung bei der Implantationsstudie möchte ich zunächst Privatdozent Dr. Christian Große-Siestrup herzlichst danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch für das besonders große Engagement im Rahmen der Betreuer- und Gutachter-Tätigkeit und den damit verbundenen immer konstruktiven Gesprächen.

Außerdem möchte ich hier Frau Dr. Annette Thiem, die zu jedem Zeitpunkt der Arbeit eine hervorragende und geduldige Hilfe war, danken. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Rolf Zehbe für die umfassende Unterstützung bei der histologischen Bildgebung. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Christoph Brochhausen der Universitätsmedizin Mainz für die Bereitstellung der histologischen Schnitte bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Mohammad Bagheri von Bagheri Life Science eK für die außerordentliche Hilfe bei der Planung und Durchführung der Implantationsstudie.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre andauernde und liebevolle Unterstützung in allen Bereichen.

*Dieses Projekt wurde im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsprojekts der „Dritte Patentportfolio Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. KG“ durchgeführt, welche zudem Inhaberin der korrespondierenden Patente ist.*

## **11. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 10.07.2012

Sarah Jeuthe