

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

**Vergleich der Fremdkörperantwort auf permanente Implantate und
bioresorbierbare reine Magnesiumimplantate mittels
Durchflusszytometrie im Rattenmodell**

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

vorgelegt von
Marie-Christin Jungmann, geb. Heinze
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4088

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Frank Witte
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, implantation, magnesium, foreign bodies, immune response,
flow cytometry

Tag der Promotion: 05.04.2019

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

© 2019 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-478-4

1. Auflage 2019

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvj.de
www.dvj.de

Für Michel und Johanna

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Biomaterialien.....	3
2.1.1 Nachweis der Biokompatibilität.....	3
2.1.2 Nicht resorbierbare Implantatmaterialien.....	4
2.1.2.1 Polyetheretherketon (PEEK).....	4
2.1.2.2 Polystyrol (PS).....	5
2.1.3 Bioresorbierbare Implantatmaterialien.....	5
2.1.3.1 Magnesium.....	6
2.1.3.2 <i>In-vivo</i> -Korrosion von Magnesium.....	8
2.2 Tiermodelle zur Biokompatibilitätsprüfung von Implantatmaterialien ...	10
2.2.1 Tiermodell Ratte.....	12
2.2.2 Weitere Kleintiermodelle.....	12
2.2.3 Großtiermodelle.....	13
2.3 Allgemeine und spezifische Merkmale der Entzündungsreaktion.....	14
2.4 Fremdkörperantwort.....	15
2.5 Morphologie und Funktion der Leukozyten im Rahmen der Fremdkörperantwort.....	19
2.5.1 Lymphozyten.....	21
2.5.2 Granulozyten.....	22
2.5.3 Monozyten, Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen.....	23
2.5.4 Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen.....	25
2.5.5 Mastzellen.....	26
2.6 Verfahren zur Untersuchung der Fremdkörperantwort.....	26
2.6.1 Histopathologie.....	26
2.6.2 Durchflusszytometrie.....	27
3. Eigene Untersuchungen.....	29
3.1 Implantatmaterialien.....	29
3.2 Tiermodell.....	29
3.3 Versuchsaufbau.....	31
3.3.1 Operative Implantation.....	32
3.3.2 Postoperatives Management.....	33
3.3.3 Entnahme der Implantate.....	34
3.4 Methoden.....	35
3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
3.4.2 Etablierung der durchflusszytometrischen Methoden.....	36
3.4.2.1 Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut.....	37
3.4.2.2 Isolierung von Leukozyten aus der Milz.....	37
3.4.2.3 Isolierung von Leukozyten aus der Fremdkörperkapsel....	37
3.4.2.4 Bestimmung der relativen Zellzahl der Milzsuspension	38

3.4.2.5	Färbung der Leukozyten für die durchflusszytometrischen Messungen	39
3.4.2.6	Messung der durchflusszytometrischen Proben	41
3.4.2.7	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	41
3.4.2.8	Berechnung von Werten	44
3.4.3	Zellsortierung, Zytozentrifugation und histologische Färbung	45
3.4.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	46
3.4.5	Bestimmung der <i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium	48
3.5	Statistik	49
3.5.1	Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	49
3.5.1.1	Studieninterner Referenzbereich für Blut	50
3.5.1.2	Post-hoc-Verfahren für Blut und Milz	50
3.5.1.3	Post-hoc-Verfahren für die Fremdkörperkapsel	50
3.5.1.4	In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben ..	50
3.5.2	Statistische Auswertung der Korrosionsdaten	52
4.	Ergebnisse	53
4.1	Klinische Befunde	53
4.2	Makroskopische Befunde	53
4.3	Morphologische Charakterisierung der Leukozyten im Blut	54
4.4	Morphologische Charakterisierung der Leukozyten in der Fremdkörperkapsel	55
4.5	Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression	57
4.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen im Blut	58
4.6.1	Lebende Leukozyten	60
4.6.2	T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	61
4.6.3	Monozyten und neutrophile Granulozyten	62
4.6.4	Aktivierte Monozyten	63
4.6.5	B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen	64
4.7	Durchflusszytometrische Untersuchungen in der Milz	65
4.7.1	Lebende Leukozyten	66
4.7.2	T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	67
4.7.3	Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten	68
4.7.4	Aktivierte Monozyten/Makrophagen	69
4.7.5	B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen ..	70
4.8	Durchflusszytometrische Untersuchungen in der subkutanen Fremdkörperkapsel	70
4.8.1	Lebende Leukozyten	72
4.8.2	T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	73
4.8.3	Neutrophile Granulozyten und CD4-negative Monozyten/Makrophagen	74
4.8.4	Eosinophile Granulozyten	75
4.8.5	Frühe Monozyten/Makrophagen	76
4.8.6	Späte ein- und mehrkernige Makrophagen	78
4.8.7	Mastzellen, natürliche Killerzellen und nicht spezifisch gefärbte Leukozyten	80
4.9	Durchflusszytometrische Untersuchungen in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	81
4.9.1	Lebende Leukozyten	82

4.9.2	T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen	83
4.9.3	Neutrophile Granulozyten und CD4-negative Monozyten/Makrophagen	84
4.9.4	Eosinophile Granulozyten.....	85
4.9.5	Frühe Monozyten/Makrophagen.....	86
4.9.6	Späte ein- und mehrkernige Makrophagen	88
4.9.7	Mastzellen, natürliche Killerzellen und nicht spezifisch gefärbte Leukozyten	90
4.10	Ausschluss einer bakteriellen Kontamination.....	91
4.11	<i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium.....	91
5.	Diskussion.....	93
5.1	Validität des Tiermodells.....	94
5.2	Validität der Methoden	96
5.2.1	Versuchsaufbau	96
5.2.2	Durchflusszytometrie	98
5.2.3	Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Krankheitserreger.....	101
5.2.4	<i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit	101
5.2.5	Statistisches Modell.....	102
5.3	Diskussion der Ergebnisse	102
5.3.1	Durchflusszytometrische Untersuchung des Blutes und der Milz	102
5.3.2	Beurteilung der systemischen Immunantwort.....	103
5.3.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der Fremdkörperkapsel.....	105
5.3.4	Beurteilung der lokalen Immunantwort	107
5.3.5	Beurteilung der <i>In-vivo</i> -Korrosion von reinem Magnesium.....	114
6.	Schlussfolgerungen.....	116
7.	Zusammenfassung.....	118
8.	Summary.....	120
9.	Literaturverzeichnis	122
10.	Anhang.....	136
10.1	Materialien	136
10.2	Postoperative Überwachungsbögen	141
10.3	Plausibilitätskriterien	143
10.4	Ausgeschlossene Proben	144
10.5	Signifikanztabellen.....	145
11.	Publikationsverzeichnis	154
12.	Danksagung.....	155
13.	Selbstständigkeitserklärung	156

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)
BCRT	Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien am Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
C3bi	Spaltprodukt von Komplementfaktor C3b
CD	Differenzierungscluster (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CE	Europäische Gemeinschaft (franz. <i>Communauté Européenne</i>)
Ct	engl. <i>cycle threshold</i>
Cy7	Cyanin 7 (Fluorochrom)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Diff-Quick	HAEMA Schnellfärbung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
eFluor	organischer Farbstoff (Fluorochrom)
engl.	englisch
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBR	Fremdkörperantwort (engl. <i>foreign body response</i>)
FBS	fötales bovines Serum
FEM	Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorochrom)
FMO	engl. <i>fluorescence minus one</i>
franz.	französisch
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
FSC-A	Vorwärtsstreulicht (Fläche)
FSC-H	Vorwärtsstreulicht (Höhe)
<i>g</i>	Ortsfaktor (9,81 m/s ²)
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KU	Kunitz-Einheit (Beschreibung der Nukleaseaktivität)
lat.	lateinisch
Ly6C	Lymphozyten Antigen 6 Komplex
Mg	reines Magnesium, das im Rahmen dieser Studie verwendet wurde
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
n	Anzahl, Stichprobenumfang
n. s.	nicht signifikant
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin (Fluorochrom)
PEEK	Polyetheretherketon
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein (Fluorochrom)

postOP	postoperativ
ppm	Anteile pro Million (engl. <i>parts per million</i>)
präOP	präoperativ
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RTQ-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>realtime quantitative polymerase chain reaction</i>)
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
WE43	Magnesiumlegierung mit Yttrium, seltenen Erden und Zirkonium

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Folgen der Implantat-Gewebe-Interaktionen	3
Tab. 2:	Mechanische Eigenschaften von Knochen und verschiedenen Implantatmaterialien	7
Tab. 3:	Kriterien für die Auswahl eines Tiermodells.....	11
Tab. 4:	Häufige lokale und systemische Merkmale der Entzündungsreaktion.....	15
Tab. 5:	An der Entzündungsreaktion beteiligte Kompartimente.....	15
Tab. 6:	Ausgewählte Leukozyten-Oberflächenantigene der Ratte.....	20
Tab. 7:	Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen.....	30
Tab. 8:	Antikörper-Panel für Blut und Milz	40
Tab. 9:	Antikörper-Panel für die Fremdkörperkapsel	40
Tab. 10:	Übersicht über die Zielzellen der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper bei der Ratte.....	40
Tab. 11:	Primernukleotidsequenzen	48
Tab. 12:	In die statistische Auswertung eingeschlossene finale Blutproben	51
Tab. 13:	In die statistische Auswertung eingeschlossene Milzproben	51
Tab. 14:	In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben der subkutanen Fremdkörperkapsel	52
Tab. 15:	In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben der intramuskulären Fremdkörperkapsel	52
Tab. 16:	Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression in Blut und Milz	58
Tab. 17:	Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression in der Fremdkörperkapsel.....	58
Tab. 18:	Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellpopulationen im Blut	59
Tab. 19:	Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellpopulationen in der Milz	65
Tab. 20:	Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA bei der subkutanen Fremdkörperkapsel	71
Tab. 21:	Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA bei der intramuskulären Fremdkörperkapsel	81
Tab. 22:	<i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium	92
Tab. 23:	Zeitpunktvergleiche der <i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium	92
Tab. 24:	Vergleich der Implantatlokalisierung der <i>In-vivo</i> -Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium	92
Tab. 25:	Referenzwerte für die Leukozytenpopulationen im Blut der Ratte	100
Tab. 26:	Referenzwerte für die Leukozytenpopulationen in der Milz der Ratte.....	105
Tab. A1:	Verwendete Chemikalien.....	136
Tab. A2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	137

Tab. A3:	Hergestellte Puffer.....	138
Tab. A4:	Verwendete Geräte	138
Tab. A5:	Tierexperimentelle Materialien und Geräte.....	139
Tab. A6:	Verwendete Computerprogramme	140
Tab. A7:	Hergestellte Aliquots.....	140
Tab. A8:	Verwendete Isotyp-Kontrollen	140
Tab. A9:	Ausgeschlossene Proben.....	144
Tab. A10:	Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse im Blut	145
Tab. A11:	Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse im Blut.....	145
Tab. A12:	Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Milz.....	146
Tab. A13:	Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Milz	147
Tab. A14:	Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der subkutanen Fremdkörperkapsel	147
Tab. A15:	Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der subkutanen Fremdkörperkapsel	149
Tab. A16:	Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der intramuskulären Fremdkörperkapsel	150
Tab. A17:	Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der intramuskulären Fremdkörperkapsel	152

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zellulärer Verlauf der Fremdkörperantwort.....	16
Abb. 2:	Implantatmaterialien	29
Abb. 3:	Versuchsaufbau	32
Abb. 4:	Operative Implantation subkutan und intramuskulär	33
Abb. 5:	Entnahme der Implantate subkutan und intramuskulär	35
Abb. 6:	Kollagenase-Verdau der Fremdkörperkapsel	38
Abb. 7:	Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten im Blut der Ratte	42
Abb. 8:	Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten in der Fremdkörperkapsel der Ratte	43
Abb. 9:	Gates bei der Zellsortierung von Blut und Fremdkörperkapsel....	46
Abb. 10:	Makroskopische Befunde an der subkutanen Fremdkörperkapsel.....	54
Abb. 11:	Morphologische Charakterisierung der Blutleukozyten.....	55
Abb. 12:	Morphologische Charakterisierung der Nicht-T-Lymphozyten in der Fremdkörperkapsel.....	57
Abb. 13:	Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten im Blut	60
Abb. 14:	Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten im Blut	61
Abb. 15:	Prozentualer Anteil der Monozyten (CD3-CD11b/c+HIS48low) und der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med) an den lebenden Leukozyten im Blut.....	62
Abb. 16:	Prozentualer Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten im Blut	63
Abb. 17:	Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-) und der natürlichen Killerzellen (CD3-CD11b/c+HIS48-) an den lebenden Leukozyten im Blut	64
Abb. 18:	Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der Milz.....	66
Abb. 19:	Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der Milz.....	67
Abb. 20:	Prozentualer Anteil der Monozyten/Makrophagen (CD3-CD11b/c+HIS48low) und der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med) an den lebenden Leukozyten in der Milz	68
Abb. 21:	Prozentualer Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten/Makrophagen und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten in der Milz.....	69
Abb. 22:	Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-) und der natürlichen Killerzellen/dendritischen Zellen (CD3-CD11b/c+HIS48-) an den lebenden Leukozyten in der Milz	70

Abb. 23:	Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	72
Abb. 24:	Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	73
Abb. 25:	Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh) und der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel.....	74
Abb. 26:	Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	75
Abb. 27:	Prozentualer Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	76
Abb. 28:	Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der subkutanen Fremdkörperkapsel	77
Abb. 29:	Prozentualer Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	78
Abb. 30:	Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) in der subkutanen Fremdkörperkapsel....	79
Abb. 31:	Prozentualer Anteil der Mastzellen/natürlichen Killerzellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+) und der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel	80
Abb. 32:	Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	82
Abb. 33:	Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	83
Abb. 34:	Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh) und der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel.....	84
Abb. 35:	Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	85
Abb. 36:	Prozentualer Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	86
Abb. 37:	Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den	

	frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	87
Abb. 38:	Prozentualer Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	88
Abb. 39:	Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel.....	89
Abb. 40:	Prozentualer Anteil der Mastzellen/natürlichen Killerzellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+) und der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel	90
Abb. 41:	Korrosion von reinem Magnesium <i>in vivo</i>	91
Abb. 42:	FSC/SSC-Diagramm von subkutanen Fremdkörperkapseln und Lymphknoten der Ratte	101
Abb. 43:	Verlauf der Fremdkörperantwort nach intramuskulärer Implantation.....	108

1. Einleitung

Die Anwendung von Biomaterialien in der Human- und Veterinärmedizin ist vielfältig und weit verbreitet. Insbesondere in der Orthopädie und Traumatologie werden implantierbare Biomaterialien wie beispielsweise Titan oder rostfreier Stahl zur Versorgung von Frakturen eingesetzt (Müller-Färber, 2003). Nach Abschluss der Frakturheilung haben die Implantate ihre Funktion erfüllt und sollten meist in einer zweiten Operation wieder entfernt werden (Kim et al., 1997). Dieser erneute chirurgische Eingriff zur Materialentfernung kann mit operationsbedingten Komplikationen verbunden sein (Müller-Färber, 2003). Zudem sind die zusätzlichen Kosten für Operation, Nachbehandlung und Arbeitsausfall von Bedeutung (Amini et al., 2011; Staiger et al., 2006).

Eine mögliche Lösung stellen bioresorbierbare Implantatmaterialien dar, die im Gegensatz zu den herkömmlichen permanenten Biomaterialien, nach einer Phase mechanischer Stabilität, die für die Frakturheilung erforderlich ist, vom Organismus vollständig resorbiert werden können (Rokkanen et al., 2000). Magnesiumbasierte, bioresorbierbare Biomaterialien sind ein vielversprechender Werkstoff für die zukünftige Herstellung von temporären, orthopädischen, kardiovaskulären und anderen Implantaten (Chen et al., 2017; Willbold et al., 2013). Das Leichtmetall Magnesium kommt physiologisch im Organismus vor und weist nur in sehr hohen Dosierungen toxische Eigenschaften auf (Möhnle und Goetz, 2001). Zudem ähneln seine mechanischen Eigenschaften im Gegensatz zu anderen Biomaterialien denen des natürlichen Knochens (Poinern et al., 2012). Magnesiumbasierte, bioresorbierbare Biomaterialien befinden sich bereits in Form von kleinen Schrauben zur Osteosynthese und kardiovaskulären Stents in klinischer Anwendung (Rapetto und Leoncini, 2017; Willbold et al., 2017).

Die Implantation von Biomaterialien in den Organismus löst eine lokale Immunantwort auf das körperfremde Material aus, die sogenannte Fremdkörperantwort (engl. *foreign body response*, FBR) (Major et al., 2015). Die FBR ist charakterisiert durch die Infiltration von Makrophagen und deren Fusion zu Fremdkörperriesenzellen sowie durch die Ausbildung einer Fremdkörperkapsel (siehe Kapitel 2.4). Während nach Anderson (2001) der zeitliche Ablauf der FBR auf herkömmliche Biomaterialien bereits eingehend untersucht wurde, ist der detaillierte Verlauf der FBR auf bioresorbierbare, magnesiumbasierte Materialien weitgehend unbekannt.

Für die Implantation in den Organismus müssen Biomaterialien vor ihrem klinischen Einsatz auf ihre Biokompatibilität untersucht werden (siehe Kapitel 2.1). Die Biokompatibilität eines Materials bedingt die angemessene Interaktion zwischen Implantatmaterial und Wirtsgewebe unter Berücksichtigung der daraus resultierenden lokalen und systemischen Effekte im Organismus (Remes und Williams, 1992; Wancket, 2015). Die Beurteilung der Biokompatibilität unterliegt der Normenreihe DIN EN ISO 10993 und beinhaltet neben der Prüfung auf lokale biologische Effekte nach Implantation (DIN EN ISO 10993-6:2009-08) auch die Prüfung auf systemische Toxizität (DIN EN ISO 10993-11:2009-08). Der Goldstandard für die Beurteilung der lokalen Effekte ist die histopathologische Untersuchung des Fremdkörperkapselgewebes, welche jedoch nur einen Ausschnitt der gesamten Implantat-Gewebe-Interaktion berücksichtigt (DIN EN ISO 10993-6:2009-08). Eine durchflusszytometrische Analyse

des Gewebes der Fremdkörperkapsel nach Implantation eines Biomaterials wurde bisher nicht durchgeführt. Mithilfe der Durchflusszytometrie ist eine schnelle, quantitative sowie multiparametrische Analyse der Leukozyten der gesamten Fremdkörperkapsel möglich (Catelas et al., 1998).

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die FBR nach Implantation von reinem Magnesium im Vergleich zu permanenten Biomaterialien im subkutanen und intramuskulären Gewebe der Ratte mithilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen und im zeitlichen Verlauf darzustellen. Das Wissen über die zellulären Mechanismen der FBR auf reines Magnesium soll als Basis für die Weiterentwicklung und Evaluierung von magnesiumbasierten, bioresorbierbaren Implantaten dienen. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Isolierung einer vitalen Einzelzellsuspension aus der Fremdkörperkapsel sowie die Etablierung einer durchflusszytometrischen Analyse der Leukozyten in der Fremdkörperkapsel. Zusätzlich wurden systemische Effekte nach Implantation der Materialien mittels Durchflusszytometrie im Blut und in der Milz untersucht. Dabei wurden die *In-vivo*-Korrosion von reinem Magnesium sowie eine mögliche bakterielle Kontamination berücksichtigt.

Zusammenfassend ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

- Wie ist der zelluläre Ablauf der FBR im untersuchten Zeitraum auf reines Magnesium im Vergleich zu den permanenten Implantatmaterialien Polyetheretherketon und Polystyrol qualitativ und quantitativ charakterisiert?
- Zeigt reines Magnesium gegenüber den permanenten Implantatmaterialien infolge der Korrosion eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion?
- Gibt es einen Unterschied in der zellulären Immunantwort zwischen der subkutanen und intramuskulären Implantatlokalisierung?
- Gibt es eine systemische Immunantwort auf lokale Implantate?

2. Literaturübersicht

2.1 Biomaterialien

Ein Biomaterial ist ein „Werkstoff aus kondensierter, nicht lebensfähiger Materie zur Herstellung biokompatibler medizinischer Produkte mit einer definierten Struktur, Oberfläche und Funktion für eine reproduzierbare Wechselwirkung mit lebenden humanen und tierischen Zellsystemen, Geweben und Organen und/oder für eine Integration in Mensch und Tier“ (VDI 5701:2016-09).

Die Anwendungsbereiche von Biomaterialien in der modernen Medizin sind vielfältig. Zu den Arzneimitteln bzw. Medizinprodukten, die in der Veterinär- und Humanmedizin eingesetzt werden, gehören beispielsweise Nahtmaterial, chirurgische Instrumente, Wundverbände, Zahnfüllungen, orthopädische und kosmetische Implantate sowie kardiovaskuläre Stents und Kunstherzen (Arzneimittelgesetz, 2017; VDI 5701:2016-09).

Biomaterialien können in vier Werkstoffklassen unterschieden werden: metallische, keramische, polymerchemische und biomolekulare Werkstoffe (Jennissen, 2000). Die verschiedenen Werkstoffe können zudem zu Verbundwerkstoffen kombiniert werden.

Nach der Implantation von Biomaterialien werden diese vom Organismus als körperfremd erkannt (Nuss und von Rechenberg, 2008). Der Organismus reagiert auf den Fremdkörper mit einer Gewebereaktion. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des Implantates werden biologisch nahezu inerte, toxische, bioaktive und bioresorbierbare Implantat-Gewebe-Interaktionen unterschieden (Hench und Wilson, 2013) (Tab. 1). Wichtige Anforderungen an implantierbare Biomaterialien sind Korrosions- bzw. Degradationsbeständigkeit im biologischen Milieu, ausreichende mechanische Stabilität für die erforderliche Anwendungsdauer, Sterilisierbarkeit, gute Verarbeitbarkeit sowie Biokompatibilität (Thull, 1994; VDI 5701:2016-09).

Tab. 1: Folgen der Implantat-Gewebe-Interaktionen modifiziert nach Hench und Wilson (2013)

Implantat-Gewebe-Interaktion	Reaktion des Gewebes
biologisch nahezu inert (nicht resorbierbar)	Ausbildung einer nicht-adhärennten Bindegewebskapsel um das Implantat
toxisch	Gewebsnekrose
bioaktiv	chemische Bindung zwischen Implantat und Gewebe oder Geweberegeneration
bioresorbierbar	Gewebe ersetzt Implantat

2.1.1 Nachweis der Biokompatibilität

Damit Medizinprodukte für die klinische Anwendung zugelassen werden können, ist der Nachweis über die Biokompatibilität der verwendeten Werkstoffe erforderlich (90/385/EWG). Unter Biokompatibilität versteht man die „Fähigkeit eines Medizinpro-

dukts oder Materials, mit einer angemessenen Host-Reaktion Leistung in einer spezifischen Anwendung zu erbringen“ (DIN EN ISO 10993-1:2017-04). Das bedeutet, dass ein Biomaterial für den geplanten Verwendungszweck keine toxischen, karzinogenen oder mutagenen Effekte auf den Wirtsorganismus aufweisen darf (Helmus et al., 2008).

Die präklinische Beurteilung der Biokompatibilität von Medizinprodukten bzw. deren Komponenten ist in Deutschland durch die Normenreihe DIN EN ISO 10993 geregelt und beinhaltet physikalische, chemische sowie biologische Prüfungen. Die biologischen Prüfungen umfassen *In-vitro*- und *In-vivo*-Prüfverfahren, wobei die *In-vitro*-Prüfverfahren gegenüber Tierversuchen bevorzugt werden müssen, wenn sie angemessen validiert, zuverlässig, praktisch verfügbar und reproduzierbar sind (DIN EN ISO 10993-2:2006-10). *In-vitro*-Prüfverfahren liefern beispielsweise Informationen zur Zytotoxizität und Genotoxizität von Biomaterialien (Pearce et al., 2007). Die Gewebereaktion auf implantierte Biomaterialien ist komplex und kann durch *In-vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen nur unzureichend nachgebildet werden (Muschler et al., 2010). Lokale und systemische Effekte, die infolge von Implantat-Gewebe-Interaktionen entstehen, können somit nur im Tiermodell mittels Implantationsstudien untersucht werden (Pearce et al., 2007; Wancket, 2015).

2.1.2 Nicht resorbierbare Implantatmaterialien

Zu den nicht resorbierbaren bzw. permanenten Implantatmaterialien gehören Metalle, Polymere, Keramiken und Verbundwerkstoffe (VDI 5701:2016-09). Nicht resorbierbare Implantate sind chemisch stabil und nicht vom Organismus abbaubar. Sie können daher dauerhaft ihre Funktion ausüben.

Nahezu alle Implantate für die Osteosynthese wie Platten, Schrauben oder Marknägel bestehen aus nicht resorbierbaren Metallen, da diese eine hohe mechanische Stabilität und Bruchfestigkeit aufweisen (Staiger et al., 2006). Die am häufigsten in der Human- und Veterinärmedizin verwendeten nicht resorbierbaren metallischen Biomaterialien sind rostfreier Stahl, Titanlegierungen und Cobalt-Chrom-Legierungen (Guiot und Déjardin, 2011; Niinomi, 2002). Diese Metalle weisen allerdings einige negative Eigenschaften auf: Knochenatrophie durch *stress shielding*, Artefakte bei radiologischer Bildgebung, toxische partikelbedingte Osteolysen sowie die Notwendigkeit einer zweiten Operation zur Entfernung des Implantats (Staiger et al., 2006; Waizy et al., 2013).

Neben den Metallen werden Polymere und Keramiken als nicht resorbierbare Implantatmaterialien klinisch genutzt (VDI 5701:2016-09). Keramiken werden hauptsächlich zum Ersatz harter Gewebe in der Zahnheilkunde und in der Endoprothetik eingesetzt. Zu den nicht resorbierbaren stabilen Polymeren zählen beispielsweise Polyethylen, Polyamid, Polyurethan und Polyetheretherketon. Sie werden als Nahtmaterialien, Gefäßprothesen, künstliche Herzklappen sowie in der Endoprothetik verwendet.

2.1.2.1 Polyetheretherketon (PEEK)

Der Kunststoff PEEK ist ein nicht resorbierbares, aromatisches Polymer und gehört zur Familie der Polyaryletherketone (Kurtz und Devine, 2007). Er ist in seiner soliden Form biokompatibel, biologisch inert und nicht bioaktiv (Toth, 2011). Für eine Verwendung als Implantatmaterial weist PEEK neben der guten Biokompatibilität hervorragende physikalische und chemische Eigenschaften auf (Schwitalla et al., 2014). Das

Polymer PEEK verfügt über knochenähnliche elastische Eigenschaften und ist aufgrund seiner geringen Dichte sehr leicht. Es ist zudem hochbeständig gegenüber Verschleiß, sterilisierbar, röntgentransparent und bietet vielfältige Möglichkeiten der Verarbeitung (Kurtz und Devine, 2007; Schwitalla et al., 2014).

Implantate aus dem Werkstoff PEEK werden in der Orthopädie, Traumatologie und Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie sowie in der Zahnheilkunde eingesetzt (VDI 5701:2016-09). Um die Materialeigenschaften von PEEK gezielt an die jeweilige Anwendung anzupassen, werden dem Polymer beispielsweise Kohlefasern, Farbstoffe oder Apatite zugesetzt (Schwitalla et al., 2014).

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wird nach der Implantation von PEEK eine sehr milde FBR des Organismus beobachtet, die mit der Ausbildung einer kollagenreichen Fremdkörperkapsel einhergeht (Jockisch et al., 1992; Williams et al., 1987).

2.1.2.2 Polystyrol (PS)

Der Kunststoff PS ist ebenfalls ein biokompatibles, nicht resorbierbares Polymer (Gretzer et al., 2006; Rajabi, 2014). Polystyrol gehört zur Gruppe der Polyvinylbenzole und wird durch Polymerisation von Styrol gewonnen (Sastri, 2014). Das Polymer besitzt eine geringe Dichte, gute Verformbarkeit, Beständigkeit gegenüber Gammastrahlung, hohe Steifigkeit und Härte sowie keine toxischen Eigenschaften (Chen et al., 2013b; Sastri, 2014). Je nach Verarbeitung ist PS transparent oder weiß geschäumt.

Polystyrol ist ein wichtiger Verpackungskunststoff im medizinischen Bereich und wird beispielsweise in Form von Pharmaverpackungen, Infusionsbehältern und Einweg-Laborartikeln wie Zellkulturflaschen und Petrischalen verwendet (Richter et al., 1988; Sastri, 2014).

Für Biokompatibilitätsprüfungen im Tiermodell wird PS häufig als Referenzmaterial in Form von kleinen Kügelchen oder scheibenförmigen Proben genutzt (Bratlie et al., 2010; Gretzer et al., 2006). Die scheibenförmigen Proben werden aus Zellkulturflaschen oder Petrischalen hergestellt. Die Implantation von scheibenförmigen Polystyrolproben resultiert in der Ausbildung einer fibrösen Fremdkörperkapsel um das Implantat (Gretzer et al., 2006). Hingegen führt die Implantation von bis zu 10 µm großen Partikeln aus PS zur Aktivierung von Makrophagen und nachfolgender Phagozytose der Partikel (Bratlie et al., 2010; Jay et al., 2010).

2.1.3 Bioresorbierbare Implantatmaterialien

Gegenüber konventionellen, nicht resorbierbaren Implantatmaterialien stellen bioresorbierbare Materialien eine Alternative dar. Bioresorbierbare Materialien werden im Organismus über Degradations- bzw. Korrosionsprodukte aufgelöst und durch zelluläre Aktivität in einer biologischen Umgebung vollständig abgebaut und entfernt (VDI 5701:2016-09).

Die bioresorbierbaren Implantatmaterialien können in drei Werkstoffklassen eingeteilt werden: Polymere, Metalle und biomolekulare Werkstoffe (VDI 5701:2016-09). Bioresorbierbare Polymere wie z. B. Poly-g-Lactin werden klinisch hauptsächlich in Form von Nahtmaterial eingesetzt. Für die Anwendung als orthopädisches Implantatmaterial besitzen bioresorbierbare Polymere unzureichende mechanische Eigenschaften (Lévesque et al., 2004). Die reinen Metalle Magnesium, Eisen und Wolfram sind in physiologischer Umgebung bioresorbierbar und Gegenstand der aktuellen Forschung

(Peuster et al., 2003; Zheng et al., 2014). Biomolekulare Werkstoffe sind biotechnisch oder gentechnisch hergestellte Materialien biologischer Herkunft, die beispielsweise in Form von Fibrin oder Kollagen im klinischen Einsatz sind (VDI 5701:2016-09).

Bioresorbierbare Biomaterialien müssen für die klinische Anwendung verschiedene Voraussetzungen erfüllen: gute Biokompatibilität des Materials und seiner Degradationsprodukte, angemessene mechanische Eigenschaften sowie eine ausreichende Funktionsbeständigkeit des Implantates mit einer Degradationsrate, die an den Heilungsprozess angepasst ist (Hurschler et al., 2013; Waizy et al., 2013). Nach Erfüllung seiner Funktion sollte sich das Implantatmaterial langsam auflösen und die dabei entstehenden Degradationsprodukte sollten vom Körper aufgenommen sowie rückstandsfrei ausgeschieden werden (Poinern et al., 2012).

2.1.3.1 Magnesium

Magnesium ist ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Körpers und seine Nutzung als medizinischer bioresorbierbarer Werkstoff wird seit Ende des 19. Jahrhunderts erforscht (Witte, 2010). Zahlreiche tierexperimentelle Studien belegen eine gute Biokompatibilität für magnesiumbasierte Biomaterialien und ein geringes immunogenes Potential (Waizy et al., 2013; Witte et al., 2005; Xu et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Magnesium eignet sich hervorragend als bioresorbierbares Implantatmaterial, da es physiologisch im Organismus vorkommt. Magnesium ist neben Calcium, Kalium und Natrium das vierthäufigste Kation und ein essentieller Mineralstoff im menschlichen Organismus (Maguire und Cowan, 2002). Das zweiwertige Kation wirkt als Kofaktor zahlreicher enzymatischer Reaktionen und stabilisiert die Struktur von Nukleinsäuren (Hartwig, 2001; Misra und Draper, 1998; Möhnle und Goetz, 2001). Magnesium wird mit der Nahrung aufgenommen, intestinal resorbiert und hauptsächlich im Knochen eingelagert (Maguire und Cowan, 2002; Möhnle und Goetz, 2001). Etwa 60–65 % des Gesamtmagnesiumgehaltes des Körpers befinden sich in der Knochensubstanz, wohingegen im Blut nur 1 % gespeichert ist. Der verbleibende Anteil ist in Muskulatur und Weichteilgewebe gebunden (Möhnle und Goetz, 2001). Die Nieren regulieren die Magnesiumserumkonzentration und scheiden überschüssiges Magnesium mit dem Urin aus (Saris et al., 2000). Infolge einer Behandlung mit Diuretika, einer Fehlernährung oder erhöhter gastrointestinaler Verluste kann sich ein Magnesiummangelzustand entwickeln (Möhnle und Goetz, 2001). Hypomagnesiämie geht mit unspezifischen Symptomen einher. Eine Hypermagnesiämie ist hingegen selten und meistens auf eine übermäßige iatrogene Zufuhr von Magnesium zurückzuführen (Möhnle und Goetz, 2001). Klinische Symptome einer Hypermagnesiämie treten in Abhängigkeit von der Serumkonzentration auf und umfassen gastrointestinale Symptome, Hyporeflexie bis hin zu Atemversagen und Koma.

Magnesium und seine Korrosionsprodukte besitzen kein allergisches und nur ein sehr geringes toxisches Potential (Niemeyer et al., 2001; Seal et al., 2009; Witte et al., 2008b). Die mechanischen Eigenschaften von Magnesium wie Dichte, Elastizitätsmodul, Druck- und Zugfestigkeit ähneln den Eigenschaften des natürlichen Knochens (Poinern et al., 2012) (Tab. 2). Wenn orthopädische Implantatmaterialien wie Titanlegierungen verwendet werden, die andere mechanische Eigenschaften als natürlicher Knochen besitzen, kann das Phänomen des *stress shielding* beobachtet werden (Poinern et al., 2012). Beim *stress shielding* trägt das Implantat mehr Last als der verbleibende Knochen, wodurch es zu Umbau- und Resorptionsvorgängen des weniger

belasteten Knochens kommt (Sumner, 2015). Für magnesiumbasierte Implantate ist bisher kein *stress shielding* beschrieben (Salahshoor und Guo, 2012). Zudem verursachen magnesiumbasierte, orthopädische Implantate bei den radiologischen Schichtbildverfahren Computer- und Magnetresonanztomographie weniger Artefakte im Vergleich zu herkömmlichen metallischen Biomaterialien (Filli et al., 2015).

Tab. 2: *Mechanische Eigenschaften von Knochen und verschiedenen Implantatmaterialien modifiziert nach Poinern et al. (2012) und ASTM F2026 - 02 (2002)*

Mechanische Eigenschaften	Dichte (g/cm ³)	Elastizitätsmodul (GPa)	Druckfestigkeit (MPa)	Zugfestigkeit (MPa)
kortikaler Knochen	1,8 – 2,0	5 – 23	160 – 240	35 – 283
spongioser Knochen	1,0 – 1,4	0,01 – 1,57	1,5 – 9,3	1,5 – 38
reines Magnesium	1,74	45	20 – 115	90 – 190
Titanlegierungen	4,4	100 – 125	–	550 – 985
rostfreier Stahl	7,9	193 – 200	–	480 – 620
Polyetheretherketon	1,3	3	–	90

Implantate aus reinem Magnesium weisen herstellungsbedingt Verunreinigungen von Eisen, Nickel und Kupfer auf, die die Korrosionseigenschaften des Metalls negativ beeinflussen können (Song und Atrens, 1999; Waizy et al., 2013). Die Korrosionsgeschwindigkeit von Magnesium ist deutlich erhöht, wenn eine bestimmte Grenze an Verunreinigungen, das sogenannte Toleranzlimit, überschritten wird.

Die beschriebenen Eigenschaften von reinem Magnesium zeichnen es als ein vielversprechendes bioresorbierbares Implantatmaterial aus, jedoch verhindern eine hohe Korrosionsgeschwindigkeit mit entsprechend starker Gasbildung und unzureichende mechanische Eigenschaften den klinischen Einsatz von reinem Magnesium als Biomaterial (Seitz et al., 2014; Waizy et al., 2013). Diese Probleme und die Markteinführung von rostfreiem Stahl als orthopädisches Implantatmaterial führten in der Mitte des 20. Jahrhunderts zum Erliegen der Forschung an magnesiumbasierten Biomaterialien (Witte et al., 2005). Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurde mit der Verfügbarkeit neuartiger Legierungszusammensetzungen und Verarbeitungstechniken die Forschung an magnesiumbasierten Implantatmaterialien wiederaufgenommen (Witte et al., 2005; Xu et al., 2007).

Die Entwicklung von Magnesiumlegierungen stellt einen Ansatz zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, der Korrosionseigenschaften und der Verarbeitungseigenschaften im Herstellungsprozess von magnesiumbasierten Biomaterialien dar (Nassif und Ghayad, 2013; Poinern et al., 2012). Legierungen ermöglichen eine bedarfsadaptierte Anpassung der mechanischen Materialeigenschaften für die klinische Anwendung und können den negativen Einfluss von Verunreinigungen auf die Korrosionsgeschwindigkeit reduzieren (Poinern et al., 2012; Song und Atrens, 1999). Typische chemische Elemente für die Herstellung von Magnesiumlegierungen sind Aluminium, Calcium, Lithium, Mangan, Zink, Zirkonium und die seltenen Erden Gadolinium und Yttrium (Witte et al., 2008a). Dabei werden aluminiumhaltige Magnesiumlegierungen wie z. B. AZ91 und LAE442 und aluminiumfreie Magnesiumlegierungen

wie z. B. WE43 und MgCa0.8 unterschieden. Während der Korrosion werden Legierungsbestandteile zusammen mit Magnesium in den Organismus freigesetzt, daher dürfen diese in der verwendeten Menge keine toxischen Reaktionen hervorrufen (Nassif und Ghayad, 2013; Song und Song, 2007). Aufgrund der Toxizität von Aluminium sollten nur aluminiumfreie Legierungen für die Implantation in den menschlichen Körper entwickelt werden (Witte et al., 2008a). Weitere Ansätze zur Verbesserung der Materialeigenschaften von magnesiumbasierten Biomaterialien sind die Erhöhung des Reinheitsgrades, die Oberflächenmodifikation, die Verfeinerung der Mikrostruktur, die Hitzebehandlung und die Kombination mit anderen Materialien zur Erzeugung von Verbundwerkstoffen (Chen et al., 2015; Zheng et al., 2014).

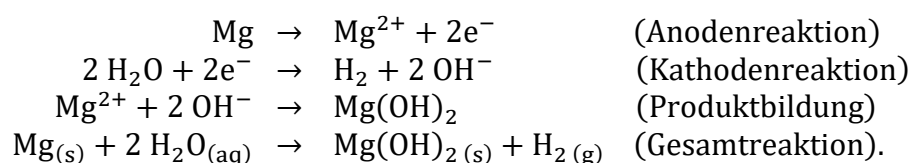
Neben tierexperimentellen Studien gibt es zunehmend auch Studien über den Einsatz von Magnesium als Biomaterial in der Humanmedizin. Dabei werden magnesiumbasierte Implantate für orthopädische und endovaskuläre Zwecke untersucht (Haude et al., 2013; Windhagen et al., 2013). In klinischer Anwendung befinden sich bereits die MAGNEZIX®-Schrauben der Firma Syntellix und der Magmaris Stent der Firma BIOTRONIK (Rapetto und Leoncini, 2017; Willbold et al., 2017). Beide Produkte basieren auf einer Weiterentwicklung der Magnesiumlegierung WE43 und sind CE-zertifiziert.

2.1.3.2 *In-vivo-Korrosion von Magnesium*

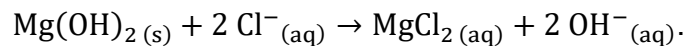
Reines Magnesium korrodiert im physiologischen Milieu und weist dabei eine schlechte Korrosionsbeständigkeit auf (Nassif und Ghayad, 2013; Staiger et al., 2006). Die DIN EN ISO 8044:2015-12 bezeichnet Korrosion als die „physikochemische Wechselwirkung zwischen einem Metall und seiner Umgebung, die zu einer Veränderung der Eigenschaften des Metalls führt und die zu erheblichen Beeinträchtigungen der Funktion des Metalles [oder] der Umgebung [...] führen kann“.

Bei der *In-vivo*-Korrosion von reinem Magnesium treten verschiedene Korrosionsarten auf: elektrochemische Korrosion, chemische Korrosion, Lochkorrosion und galvanische Korrosion (Poinern et al., 2012; Zheng et al., 2014). Die folgenden Korrosionsprodukte werden bei allen magnesiumbasierten Implantatmaterialien im physiologischen Milieu gebildet: Magnesiumhydroxid, Magnesiumchlorid, Magnesiumcarbonat, magnesiumhaltiges Calciumphosphat, Magnesiumionen, Hydroxidionen und Wasserstoffgas (Seitz et al., 2014; Zheng et al., 2014).

Direkt nach der Implantation findet im physiologischen Milieu eine sauerstoffunabhängige, elektrochemische Reaktion des Magnesiums mit Wasser in der Implantatumgebung statt (Witte et al., 2008a). Dabei entstehen Magnesiumhydroxid und Wasserstoffgas. In der Anodenreaktion wird Magnesium oxidiert und es werden Magnesiumionen sowie Elektronen freigesetzt (Agarwal et al., 2016). Die Elektronen reagieren in der Kathodenreaktion mit Wasser und bilden Hydroxidionen sowie Wasserstoffgas. Die elektrochemischen Reaktionen von Magnesium im wässrigen Milieu lassen sich nach Witte et al. (2008a) wie folgt zusammenfassen:



Es bildet sich eine Schutzschicht aus Magnesiumhydroxid auf der gesamten Implantatoberfläche aus, die die Korrosionsgeschwindigkeit verringert (Poinern et al., 2012; Witte et al., 2005). Diesen Vorgang nennt man Passivierung (DIN EN ISO 8044:2015-12). Die im Rahmen der FBR (siehe Kapitel 2.4) an die Magnesiumoberfläche adsorbierten Plasma- und Gewebeproteine verlangsamen die initiale Korrosionsgeschwindigkeit ebenfalls (Liu et al., 2007). Im physiologischen Milieu besitzt die Schutzschicht aus Magnesiumhydroxid jedoch nur eine geringe Korrosionsbeständigkeit (Nassif und Ghayad, 2013). Die hohe physiologische Konzentration von Chloridionen (~100 mmol/l) führt durch eine chemische Reaktion zum lokalen Aufbruch der Schutzschicht aus Magnesiumhydroxid (Staiger et al., 2006). Chloridionen reagieren mit Magnesiumhydroxid unter Bildung von Magnesiumchlorid, welches leicht löslich ist (Poinern et al., 2012):



Die Lochkorrosion ist die Folge der lokalen Zerstörung der Schutzschicht (Zheng et al., 2014). Es entstehen punktförmige Korrosionsstellen an der Oberfläche des Metalls, die tief in das Metallinnere vordringen und die mechanischen Eigenschaften des Implantates negativ beeinflussen (Poinern et al., 2012). Durch die Bildung eines Korrosionsloches liegt das reine Magnesium frei und ist erneut elektrochemischer Korrosion ausgesetzt (Nassif und Ghayad, 2013). Hat sich ein solches Loch erst gebildet, schreitet die lokale Korrosion sehr schnell voran (Agarwal et al., 2016).

Die galvanische Korrosion bzw. Bimetallkorrosion beschreibt die Korrosion zwischen verschiedenen Metallen in Anwesenheit von Elektrolyten (DIN EN ISO 8044:2015-12). Sie tritt bei reinem Magnesium durch Verunreinigung mit anderen Metallen auf und begünstigt die Lochkorrosion im physiologischen Milieu (Poinern et al., 2012).

Die während der Korrosionsreaktionen freigesetzten Hydroxidionen führen zu einem Anstieg des pH-Wertes auf der Implantatoberfläche, welcher jedoch durch die Puffersysteme im Organismus weitgehend in physiologischen Bereichen gehalten wird (Seitz et al., 2014; Zheng et al., 2014). Die Hydroxidionen reagieren unter anderem mit dem Bicarbonat-Puffersystem, wobei Magnesiumcarbonat ausfällt (Xin et al., 2011). Die physiologische Selbstregulierung des pH-Wertes kann nur aufrechterhalten werden, wenn die Korrosion von reinem Magnesium langsam abläuft und nur geringe Mengen an Hydroxidionen freigesetzt werden (Seitz et al., 2014).

Aufgrund der Anwesenheit von Calcium- und Phosphationen sowie dem lokal alkalischen pH-Wert an der Implantatoberfläche lagern sich magnesiumhaltige Calciumphosphate ab, die als Anlagerungsstelle für biologisches Calciumphosphat dienen und die Knochenneubildung begünstigen (Witte et al., 2005; Xu et al., 2007). Die Ausbildung von biologischen Calciumphosphaten kann als bioaktive Implantat-Gewebe-Interaktion angesehen werden.

Auf der Schicht der Korrosionsprodukte werden mit zunehmender Implantationsdauer Zellansammlungen beobachtet (Zheng et al., 2014). Mit fortschreitender Korrosion lösen sich zudem Magnesiumpartikel und Korrosionsprodukte vom Metall und interagieren mit der Umgebung des Implantates. Zum einen können Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen die freigesetzten Partikel abhängig von deren Größe phagozytieren oder extrazellulär degradieren (Witte et al., 2005; Zheng et al., 2014). Zum anderen können lösliche Korrosionsprodukte wie die freien Magnesiumionen ins Blut diffundieren und vom Organismus eliminiert werden (Witte et al., 2005). Schließlich führen alle

beschriebenen Korrosionsarten *in vivo* zu einem vollständigen Abbau eines Implantates aus reinem Magnesium (Witte et al., 2005; Zheng et al., 2014).

In-vivo-Korrosionsgeschwindigkeit

Die Korrosionsgeschwindigkeit beschreibt das Auftreten von Korrosionserscheinungen an einem Metall je Zeit (DIN EN ISO 8044:2015-12). Sie kann bei reinen Magnesiumimplantaten über den Masseverlust der entnommenen Implantate pro Zeit berechnet werden, nachdem die Korrosionsprodukte mithilfe einer wässrigen Lösung von Chrom(VI)-oxid entfernt wurden (ASTM G31 - 72(2004); Avedesian und Baker, 1999).

Die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium ist abhängig von der Reinheit des Magnesiums, dem Oberfläche-Volumen-Verhältnis des Implantates und dem Implantationsgewebe sowie seiner Durchblutung (Andrews, 1917; Xu et al., 2007; Zheng et al., 2014).

Wasserstoffgas

Bei der elektrochemischen Korrosion von reinem Magnesium im physiologischen Milieu entsteht aus einem Gramm reinen Magnesiums etwa ein Liter Wasserstoffgas (Witte et al., 2005). Nach der Implantation von Magnesium werden im Tierversuch häufig subkutane Gasansammlungen innerhalb der ersten Wochen beobachtet, die mit zunehmender Implantationsdauer ohne Intervention verschwinden und keine negativen Effekte auf die Tiere haben (Witte et al., 2005; Witte et al., 2007). Die beschriebenen lokalen Gasansammlungen treten auf, wenn mehr Wasserstoff pro Zeiteinheit gebildet wird, als im Gewebe gelöst oder in den Extrazellularraum diffundieren kann (Witte et al., 2008a). Dabei sind Diffusion und Löslichkeit von den lokalen Löslichkeits- und Diffusionskoeffizienten für Wasserstoff in der Implantatumgebung abhängig. Durch eine geringe *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit mit folglich geringer Produktion von Wasserstoffgas und einen hohen lokalen Blutfluss, der den Abtransport von Wasserstoffgas begünstigt, kann die Bildung von Gasansammlungen im Gewebe vermieden werden. Kuhlmann et al. (2013) zeigten, dass die Gasansammlungen nicht primär aus Wasserstoffgas bestehen. Stattdessen enthalten sie ein Gemisch aus Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, wobei der Anteil von Wasserstoffgas weniger als 1 % beträgt. Als Ursache des niedrigen Wasserstoffgehaltes wird ein schneller Gasaustausch mit dem Umgebungsgewebe angegeben.

2.2 Tiermodelle zur Biokompatibilitätsprüfung von Implantatmaterialien

Tierversuche sind für die Prüfung der Biokompatibilität, der mechanischen Funktion und des Degradationsverhaltens von neu entwickelten Biomaterialien vor der klinischen Anwendung in der Veterinär- und Humanmedizin unverzichtbar (Pearce et al., 2007; Waizy et al., 2013).

Für die Planung und Durchführung von Tierversuchen zur Biokompatibilitätsprüfung gibt die DIN EN ISO 10993-2:2006-10 tierschutzrechtliche Anforderungen sowie Empfehlungen vor und berücksichtigt dabei das 3R-Prinzip (Richmond, 2008). Ziel des 3R-Prinzips ist die vollständige Vermeidung von Tierversuchen (engl. *replacement*), die Verminderung der Versuchstierzahl (engl. *reduction*) sowie die Minimierung von

Schmerzen und Leiden der Versuchstiere durch Verbesserung des Verfahrens (engl. *refinement*) (Russel und Burch, 1959).

Die Prüfverfahren zur Beurteilung der lokalen Effekte nach der Implantation von Biomaterialien sind in der DIN EN ISO 10993-6:2009-08 festgelegt und sehen weiterhin den Einsatz von Tiermodellen vor. Den Versuchstieren werden Implantatprüfkörper subkutan, intramuskulär oder in den Knochen implantiert, um die biologische Reaktion des jeweiligen Gewebes auf den implantierten Werkstoff bewerten zu können. Die durch das zu prüfende Biomaterial hervorgerufene Gewebereaktion wird dabei mit der Gewebereaktion auf einen Kontrollwerkstoff verglichen, dessen Biokompatibilität bereits bekannt ist (DIN EN ISO 10993-6:2009-08).

Für die Implantationsprüfungen werden kleine Versuchstiere wie Mäuse, Ratten, Meer-schweinchen oder Kaninchen gegenüber Großtiermodellen bevorzugt (DIN EN ISO 10993-6:2009-08). Die Auswahl des Tiermodells erfolgt gemäß DIN EN ISO 10993-6:2009-08 unter „Berücksichtigung der Größe der Implantatprüf-körper, der Anzahl der Implantate je Tier, der vorgesehenen Prüfdauer in Bezug zur Lebensdauer der Tiere und möglicher artspezifischer Unterschiede der biologischen Reaktion“. Neben diesen Kriterien müssen bei der Auswahl eines Tiermodells weitere Faktoren wie z. B. Haltung und Handhabung der Tiere sowie die Kosteneffizienz be-rücksichtigt werden (Tab. 3).

Tab. 3: Kriterien für die Auswahl eines Tiermodells modifiziert nach Schimandle und Boden (1994) sowie Davidson et al. (1987)

Kriterien für die Auswahl eines Tiermodells
Kosten für Anschaffung und Haltung der Versuchstiere
Verfügbarkeit der Tiere
Maß an gesellschaftlicher Akzeptanz
Toleranz gegenüber Gefangenschaft
einfache Haltung
einfache Handhabung
geringer Pflegeaufwand
Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten und Infektionen
Grad der Übertragbarkeit auf humane Verhältnisse
Verfügbarkeit von Spezies-spezifischen Datenbanken
Größe der Tiere
Toleranz gegenüber chirurgischen Eingriffen
Lebenserwartung der Spezies
Verfügbarkeit von Räumlichkeiten und Personal
Verallgemeinerbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
Maß an Standardisierung (genetische Einheitlichkeit der Tiere)

2.2.1 Tiermodell Ratte

Seit dem 19. Jahrhundert ist die Ratte ein etabliertes Tiermodell für die Erforschung der humanen Physiologie und Pathologie (Abbott, 2004; Lindblad-Toh, 2004). Heute ist sie nach der Maus die am häufigsten eingesetzte Tierart in der medizinischen Forschung. Im Jahr 2016 wurden in Deutschland 312 654 Ratten für Tierversuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet (BMEL, 2017). Die Ratte dient als ein wichtiges Tiermodell für Verhaltensstudien und toxikologische Studien sowie für die Erforschung von kardiovaskulären Erkrankungen und Stoffwechselerkrankungen (Abbott, 2004; Iannaccone und Jacob, 2009).

Die Verwendung der Ratte als Versuchstier bietet einige Vorteile gegenüber der Maus und anderen Tiermodellen (Iannaccone und Jacob, 2009). Die Größe des Tieres ermöglicht chirurgische Eingriffe, detaillierte physiologische Messungen und die Entnahme einer ausreichenden Menge an Probenmaterial (Abbott, 2004; Iannaccone und Jacob, 2009; van den Brandt et al., 2004). Im Vergleich zur Maus sind die Physiologie und das Genom der Ratte dem Menschen ähnlicher (Iannaccone und Jacob, 2009; Lindblad-Toh, 2004). Der tierexperimentelle Einsatz von Ratten und Mäusen ist gesellschaftlich eher akzeptiert als die Verwendung größerer Tiermodelle wie Schaf, Schwein, Katze oder Hund (Willbold et al., 2017). Die einfache Handhabung und Haltung von Ratten, die genetische Einheitlichkeit der Inzuchtstämme sowie die geringen Kosten für Erwerb und Unterbringung stellen weitere Vorzüge gegenüber der Verwendung von Großtiermodellen dar (Jäger et al., 2005).

Entsprechend den Empfehlungen der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 wird die Ratte häufig als Tiermodell für die Beurteilung der Biokompatibilität nach Implantation von Biomaterialien eingesetzt (Hunt et al., 1996; McNamara und Williams, 1981; Patino et al., 2003; van Wachem et al., 1994). Die Implantate werden in subkutane oder intramuskuläre Taschen vorwiegend im Bereich des Rückens der Tiere eingebracht (An et al., 2000). Es können bis zu sechs zylinderförmige Prüfkörper pro Tier implantiert werden. Der maximale an die Lebenserwartung der Ratte angepasste Implantationszeitraum beträgt 52 Wochen (DIN EN ISO 10993-6:2009-08).

Aufgrund ihrer Größe im Vergleich zur Maus ist die Ratte auch für Biokompatibilitätsprüfungen von Biomaterialien im Knochen geeignet (Castellani et al., 2011; Reifenrath et al., 2015; Thull et al., 1992). Gemäß der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 dürfen zylinder- oder schraubenförmige Werkstoffe in den Knochen der Tiere eingesetzt werden, wobei die maximale Anzahl der Prüfkörper sechs beträgt. Jedoch unterscheidet sich die Knochenstruktur der Ratte von der des Menschen, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist (Pearce et al., 2007; Wancket, 2015).

Zur Prüfung der Biokompatibilität von bioresorbierbaren Werkstoffen empfiehlt die Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 die Durchführung einer Pilotstudie an Nagetieren, um die zu erwartende Abbaurate festzustellen (Reifenrath et al., 2015; Walker et al., 2012).

2.2.2 Weitere Kleintiermodelle

Die Maus wird gemäß der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 ebenso wie die Ratte als Tiermodell für die Beurteilung der Biokompatibilität von Biomaterialien anhand der lokalen Effekte nach Implantation eingesetzt. Die Bewertung der biologischen Reak-

tion auf den implantierten Werkstoff erfolgt im subkutanen oder intramuskulären Gewebe (Avula et al., 2014; Brandt et al., 2011; Endres et al., 2004). Mäuse sind leicht zu handhaben und zu halten, jedoch neigen sie zu einer erhöhten Aggressivität im Vergleich zu Ratten (Abbott, 2004). Aufgrund ihrer geringen Körpergröße ist die Anzahl und die Größe von Implantaten im Weichteilgewebe beschränkt (Drynda et al., 2013; Higgins et al., 2009).

Das Kaninchen zeichnet sich aufgrund seiner einfachen Handhabung und Haltung, der relativ großen Körpergröße, des sanften Gemütes und der frühen skelettalen Reife ebenfalls als ein geeignetes Tiermodell für die Biomaterialforschung aus (Arora et al., 2011; Burkholder et al., 2012). Es wird häufig zur Beurteilung der Biokompatibilität von Biomaterialien und des Degradationsverhaltens von bioresorbierbaren Implantaten im Knochen verwendet, obwohl sich die Knochenstruktur von der des Menschen unterscheidet (Meyer-Lindenberg et al., 2010; Pihlajamaki et al., 2010; Waizy et al., 2014). Gemäß der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 können bis zu sechs Implantate je Kaninchen in Tibia und Femur eingesetzt werden.

2.2.3 Großtiermodelle

Die Nutzung von kleinen Wiederkäuern und Schweinen als Großtiermodell für die Biokompatibilitätsprüfung bietet zahlreiche Vorteile gegenüber den Nagetieren und Kaninchen. Ihre Größe ermöglicht die Implantation von größeren Implantaten bzw. einer höheren Anzahl an Prüfkörpern (DIN EN ISO 10993-6:2009-08). Großtiermodelle erlauben somit die Implantation von komplexen, dem Menschen in Form und Größe angepassten orthopädischen Implantaten wie beispielsweise Platten-, Schrauben- und Marknagel-Systeme (Willbold et al., 2017). Ferner können bestimmte Implantate wie z. B. künstlicher Gelenkersatz nicht verkleinert werden und sind auf den Einsatz von Großtiermodellen angewiesen (Muschler et al., 2010). Zudem verfügen Großtiere über einen langsameren Stoffwechsel im Vergleich zu Mäusen und Ratten, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum Menschen gegeben ist (Willbold et al., 2017). Weiterhin wird der Einsatz von Nutztieren als Großtiermodell gesellschaftlich weniger kritisch wahrgenommen als die Verwendung von Heimtieren wie Hund oder Katze (Pearce et al., 2007).

Die Nachteile von Großtiermodellen sind im Vergleich zu Kleintieren erhöhte Kosten, ein erhöhter personeller und räumlicher Aufwand und die eingeschränkte Verfügbarkeit von standardisierten Tieren (Willbold et al., 2017).

Das Schaf ist ein häufig eingesetztes Großtiermodell für die Bewertung der Biokompatibilität von neuen orthopädischen Implantaten, die in den Knochen implantiert werden sollen (Nuss et al., 2006; Rössig et al., 2015). Die Körpermasse, die Größe der Knochen, der Knochen- und Gelenkaufbau sowie die Knochenheilung des Schafes sind vergleichbar zum Menschen (Nuss et al., 2006; Pearce et al., 2007).

Gemäß der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 ist auch das Schwein als Tiermodell für die Untersuchung der lokalen Effekte nach Implantation von Biomaterialien geeignet. Im Tiermodell Schwein werden die präklinischen Studien zur Anwendung von kardiovaskulären Stents und künstlichen Herzklappen durchgeführt (Smerup et al., 2004; Waksman et al., 2006). Aufgrund des raschen Wachstums, der hohen finalen

Körpermasse, der verhältnismäßig kurzen Extremitäten und der schwierigen Handhabung im Vergleich zu anderen Tiermodellen sind Schweine für die orthopädische Forschung unerwünscht (Pearce et al., 2007; Wancket, 2015).

2.3 Allgemeine und spezifische Merkmale der Entzündungsreaktion

Eine Entzündungsreaktion ist die körpereigene Antwort auf einen exogenen oder endogenen Reiz, der zu einem Zell- oder Gewebeuntergang führt (Kumar et al., 2005). Ziel der Entzündungsreaktion ist die Zerstörung, Abschwächung oder Eindämmung des auslösenden Reizes und die Aktivierung des Heilungsprozesses im geschädigten Gewebe. Infolge des Heilungsprozesses kommt es zur Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebes (lat. *restitutio ad integrum*) oder zur Defektheilung mit Narbenbildung (lat. *reparatio*).

Der zeitliche Verlauf der Entzündungsreaktion kann in eine akute Phase, die einige Stunden bis Tage dauert, und eine chronische Phase, die Wochen bis Monate andauert, unterteilt werden (Kumar et al., 2005). In der Akutphase der Entzündungsreaktion führt eine Dilatation und Permeabilitätsänderung von lokalen Blutgefäßen zu einer Steigerung der Durchblutung sowie zur Exsudation von Flüssigkeit ins Gewebe (Ödem) (Freire und Van Dyke, 2013). Leukozyten migrieren zum Ort der Gewebeverletzung und werden durch Entzündungsmediatoren aktiviert. Als Folge treten die Kardinalsymptome der akuten Entzündungsreaktion auf: Rötung (lat. *rubor*), Überwärmung (lat. *calor*), Schwellung (lat. *tumor*), Schmerz (lat. *dolor*) und Schädigung einer anatomischen Struktur oder physiologischen Funktion (lat. *functio laesa*).

Kann der auslösende Reiz nicht eingedämmt werden, geht die akute in die chronische Entzündungsreaktion über (Kumar et al., 2005). Die chronische Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch Infiltration mononukleärer Zellen, Gewebezzerstörung und gleichzeitig durch den Versuch der Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebes mittels Angiogenese, Proliferation und Fibrose. Der zeitliche Ablauf der Entzündungsreaktion sowie deren Ende wird durch zahlreiche Mediatoren gesteuert (Freire und Van Dyke, 2013).

Diese beschriebenen allgemeinen Merkmale der Entzündungsreaktion treten bei verschiedenen Reizen gleichermaßen auf. Bestimmte Reize können jedoch spezifische lokale und systemische Merkmale hervorrufen (Kumar et al., 2005) (Tab. 4). Zusammenfassend ist die Entzündungsreaktion ein komplexer Vorgang, an dem mehrere Kompartimente des Organismus beteiligt sind (Tab. 5).

Tab. 4: Häufige lokale und systemische Merkmale der Entzündungsreaktion

Reiz	Lokale Merkmale	Systemische Merkmale
physikalische oder chemische Reize (z. B. Trauma, Verbrennungen, Strahlenexposition)	je nach Ausmaß: Heilung oder Narbenbildung	je nach Ausmaß: SIRS
Bakterien	abhängig von Spezies: Heilung, Abszedierung (neutrophile Granulozyten), Granulombildung (Tuberkulose)	SIRS, Leukozytose (Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Blut)
Viren	lymphozytäre Infiltrate	SIRS, Leukozytose (Anstieg der Lymphozyten im Blut)
Allergene	generalisierte Mastzelldegranulation, Infiltrate von eosinophilen Granulozyten	Anaphylaxie, Anstieg der eosinophilen Granulozyten im Blut
Fremdkörper	Fremdkörperantwort (fibröse Kapsel, Fremdkörperriesenzellen)	

SIRS = Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (Fieber, hämodynamische Effekte, Leukozytose, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Anstieg der Akute-Phase Proteine)

Tab. 5: An der Entzündungsreaktion beteiligte Kompartimente

Kompartiment	Bestandteile
Blut	
Plasma	Flüssigkeit und Plasmaproteine (Komplementsystem, Gerinnungssystem)
zelluläre Bestandteile	Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Thrombozyten
Bindegewebe	Fibroblasten, Mastzellen, Endothelzellen, Lymphozyten und ortsständige Makrophagen
extrazelluläre Matrix	strukturelle Proteine (z. B. Kollagen, Elastin), adhäsive Glykoproteine (z. B. Fibronectin, Laminin)

2.4 Fremdkörperantwort

Die Implantation von Biomaterialien in lebendes Gewebe löst eine unspezifische Immunantwort auf die Gewebeverletzung und den Fremdkörper aus. Diese Immunantwort wird Fremdkörperantwort genannt (engl. *foreign body response*, FBR). Im Rahmen der FBR kommt es zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit nachfolgender Wundheilung infolge des chirurgischen Eingriffes (Anderson et al., 2008). Durch die Anwesenheit des Fremdkörpers wird die natürliche Wundheilung in die sogenannte Fremdkörperreaktion umgewandelt, die mit dem Auftreten von Fremdkörperriesenzellen einhergeht (Kastellorizios et al., 2015; Major et al., 2015).

Die FBR kann in folgende Phasen eingeteilt werden (Anderson, 2001):

- Blut-Material-Interaktion mit vorläufiger Matrixbildung,
- akute Entzündungsreaktion,
- chronische Entzündungsreaktion,
- Fremdkörperreaktion und
- fibröse Einkapselung des Biomaterials.

Diese Phasen treten innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen nach der Implantation auf (Anderson, 2001) (Abb. 1). Die Intensität und die Dauer der FBR werden durch die Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit sowie physikalischen und chemischen Eigenschaften des Biomaterials bestimmt (Anderson, 1993; Luttkhuizen et al., 2006). Auch die Art des Gewebes am Implantationsort sowie das Ausmaß der Gewebeverletzung im Rahmen der Implantation spielen eine Rolle (Anderson, 2001).

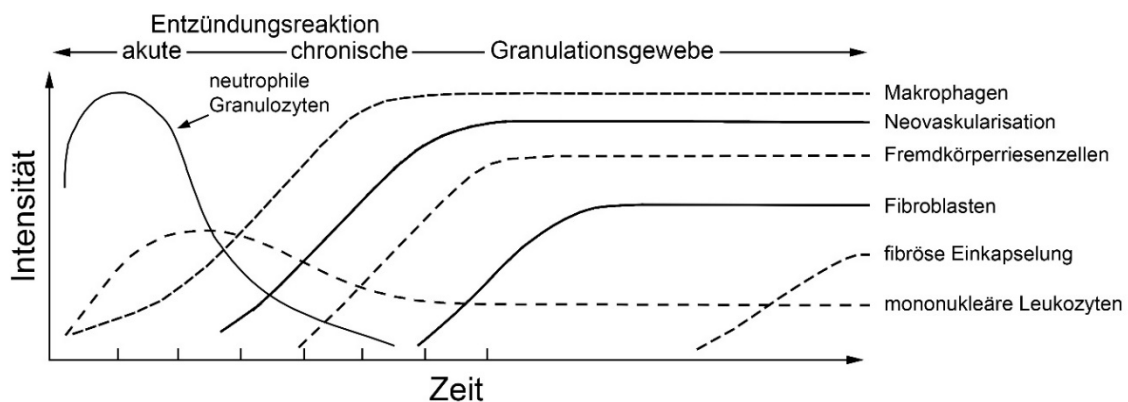


Abb. 1: Zellulärer Verlauf der Fremdkörperantwort modifiziert nach Anderson (1988)

Blut-Material-Interaktion mit vorläufiger Matrixbildung

Aus der chirurgischen Implantation des Biomaterials resultiert eine Verletzung des lokalen Gewebes und seiner Blutgefäßstrukturen mit nachfolgender Thrombusbildung (Anderson, 1988). Dabei kommt es direkt nach der Implantation zur spontanen Adsorption von Plasmaproteinen wie z. B. Albumin, Fibrinogen, Gamma-Immunglobuline und Komplementfaktoren sowie von Proteinen der extrazellulären Matrix wie z. B. Fibronectin und Vitronectin an die Implantatoberfläche (Jenney und Anderson, 2000; Wilson et al., 2005). Die Proteinadsorption unterliegt dem Vroman-Effekt, bei dem sich zunächst kleine Proteine an der Implantatoberfläche anlagern und im Verlauf durch Proteine mit höherer Affinität verdrängt werden (Brash und ten Hove, 1984; Vroman und Adams, 1969). Die Zusammensetzung der Proteinschicht hängt von den Eigenschaften des Materials ab (Slack et al., 1987).

Anderson (2001) bezeichnet die Anlagerung der Proteine an die Oberfläche des Biomaterials als vorläufige Matrixbildung. Die adhärennten Proteine wandeln das Implantat in ein biologisch erkennbares Material um (Horbett, 2013; Wilson et al., 2005). Das Netzwerk aus Fibrin, Adhäsionsproteinen, Zytokinen sowie aktivierten Thrombozyten auf der Implantatoberfläche dient als Grundlage für die Rekrutierung, Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten und Fibroblasten im Rahmen der FBR (Anderson et al., 2008; Tang und Eaton, 1993). Die vorläufige Matrix stellt somit die initiale Kontaktschicht zwischen der Oberfläche des Biomaterials und den rekrutierten Leukozyten

dar (Wilson et al., 2005). Im Verlauf der FBR unterliegt die vorläufige Matrix einem ständigen Umbau (Luttikhuisen et al., 2006).

Akute Entzündungsreaktion

Als Folge der Gewebe- und Gefäßschädigung sowie konsekutiver Freisetzung von Zytokinen kommt es zur akuten Entzündungsreaktion. Es tritt zudem eine Degranulation von implantatnahen Mastzellen mit der Ausschüttung von Histamin auf, welche zur lokalen Ödembildung mit Exsudation von Plasmaflüssigkeit führt (Tang et al., 1998). Weiterhin vermittelt die Ausschüttung von Histamin die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen an den Ort der Implantation durch eine erhöhte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Tang et al., 1998; Zdolsek et al., 2007). Die Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Diapedese der Phagozyten und Lymphozyten durch die endotheliale Barriere (Anderson, 1988; Tang et al., 1998). Die akute Entzündungsreaktion dauert wenige Stunden bis Tage, wobei vom Zelltyp die neutrophilen Granulozyten dominieren (Anderson, 1993).

Chronische Entzündungsreaktion

Die chronische Entzündung entsteht infolge persistierender entzündlicher Reize wie beispielsweise bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften des Biomaterials oder ein sich bewegendes Implantat (Anderson, 1993). Die Reaktion dauert wenige Tage und ist auf die Implantatumgebung beschränkt (Anderson et al., 2008).

Die rekrutierten Monozyten adhären an die Proteine der vorläufigen Matrix und differenzieren sich zu Makrophagen, die den dominierenden Zelltyp während der chronischen Entzündung darstellen (Anderson, 1988). Um die Oberfläche des Biomaterials zu erreichen und ihre spezifischen Funktionen ausüben zu können, müssen die rekrutierten Phagozyten durch die vorläufige Matrix migrieren (Luttikhuisen et al., 2006; Xia und Triffitt, 2006). Dies wird durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen ermöglicht.

Neben den Makrophagen kommen Monozyten, Lymphozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in der Umgebung des Implantates vor (Anderson, 1988; Vasilijic et al., 2005; Zheng et al., 2004).

Fremdkörperreaktion

Charakteristisch für die Fremdkörperreaktion ist die Bildung von Fremdkörperriesenzellen und Granulationsgewebe, bestehend aus Makrophagen, Fibroblasten und Blutkapillaren (Anderson, 2001). Um den Fremdkörper entstehen dabei zwei Schichten: eine dem Implantat zugewandte Schicht aus Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sowie eine darüberliegende Schicht aus Granulationsgewebe. Das Granulationsgewebe stellt den Vorläufer für die Ausbildung der fibrösen Kapsel dar (Anderson et al., 2008). Die Oberflächenstruktur und die Form des implantierten Biomaterials können die Ausprägung der Fremdkörperreaktion beeinflussen (Anderson, 1988).

Mehrkernige Fremdkörperriesenzellen entstehen durch Fusion von Makrophagen, die die vorläufige Matrix durchwandert haben und an die Oberfläche des Implantates adhären sind (Anderson, 2000). Makrophagen sind in der Lage adhärierte Partikel bis zu einer Größe von 10 μm zu phagozytieren (Xia und Triffitt, 2006). Auf Partikel mit einem Durchmesser größer als 10 μm reagieren Makrophagen mit einer Fusion zu Fremdkörperriesenzellen. Die Partikel werden nach Adhäsion entweder von den Fremdkörperriesenzellen umschlossen (Partikelgröße 10–100 μm) oder die Fremdkörperriesenzellen verbleiben bei größeren Implantaten (> 100 μm) auf der Oberfläche

des Materials (Xia und Triffitt, 2006). Somit entsteht eine Schicht aus Fremdkörperriesenzellen, die die gesamte Oberfläche des Implantates überzieht.

Bioresorbierbare Biomaterialien werden von Makrophagen bzw. Fremdkörperriesenzellen phagozytiert und verdaut (Xia und Triffitt, 2006). Bei größeren Implantaten aus bioresorbierbaren Biomaterialien findet eine extrazelluläre Degradation statt. Dabei werden von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen reaktionsfähige Sauerstoffverbindungen, degradierende Enzyme und Säuren aus den Lysosomen zwischen Zellmembran und Implantatoberfläche freigesetzt (Anderson et al., 2008). Dieser Prozess wird „frustrane Phagozytose“ genannt (Henson, 1971, 1980). In Folge der Degradation der Biomaterialien werden diese mit der Zeit vom Wirtsorganismus vollständig resorbiert und durch ortsspezifisches Gewebe oder Bindegewebe ersetzt (Londono und Badylak, 2015). Nach Resorption des Biomaterials erliegt der persistierende entzündliche Reiz und die Leukozyten verlassen den Ort der Implantation (Luttikhuisen et al., 2006). Die meisten Makrophagen wandern zu den umliegenden Lymphknoten (Bellingan et al., 1996). Bei den Fremdkörperriesenzellen kommt es hingegen zur Apoptose am ehemaligen Implantationsort (Honma und Hamasaki, 1996).

Kleine Partikel von nicht resorbierbaren Biomaterialien werden von Makrophagen bzw. Fremdkörperriesenzellen phagozytiert, jedoch können diese nicht verdaut werden (Xia und Triffitt, 2006). Bei größeren Implantaten aus nicht resorbierbaren Biomaterialien findet ebenfalls eine frustrane Phagozytose statt. Das Biomaterial wird hierbei nicht resorbiert, jedoch kann eine Materialermüdung auftreten (Anderson et al., 2008). Die Fremdkörperriesenzellen verbleiben über die gesamte Lebensdauer des Implantates an dessen Oberfläche (Xia und Triffitt, 2006).

Fibröse Einkapselung des Biomaterials

Die fibröse Einkapselung ist die letzte Phase der Immunantwort auf den Fremdkörper (Anderson, 2001). Die mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen sekretieren Zytokine, wodurch die Fibroblasten im Granulationsgewebe aktiviert und zur Synthese von Kollagen angeregt werden (Hernandez-Pando et al., 2000). Die Ablagerung von Kollagen führt zur Ausbildung einer fibrösen Fremdkörperkapsel um das Implantat. Durch die fibröse Einkapselung wird das Implantat mit der oberflächennahen Fremdkörperreaktion von dem umgebenden Gewebe isoliert (Anderson, 2001). Bei nicht resorbierbaren Biomaterialien persistiert die fibröse Kapsel über die gesamte Lebensdauer des Implantates.

Unterschiede zur Abstoßungsreaktion bei der Transplantation

Von der Implantation eines Biomaterials mit nachfolgender FBR ist die Transplantation abzugrenzen. Bei der Transplantation wird lebendes organisches Gewebe eines Spenders in einen Empfängerorganismus übertragen. Alle kernhaltigen Zellen tragen genetisch kodierte, hochpolymorphe Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klasse I auf ihrer Zelloberfläche (Cornell et al., 2008). Diese MHC-Klasse-I-Proteine auf der Zelloberfläche des Transplantates aktivieren das spezifische Immunsystem des Empfängers (Mitchell, 2013). In Folge der spezifischen Immunantwort wird eine Abstoßungsreaktion (Host-versus-Graft Reaktion) ausgelöst. Es werden drei verschiedene Formen der Abstoßungsreaktion auf Transplantate beschrieben: hyperakute, akute und chronische Abstoßung (Colvin und Smith, 2005).

Im Rahmen der hyperakuten Transplantatabstoßung binden bereits vorhandene Antikörper des Empfängerimmunsystems an MHC-Klasse-I-Proteine oder Blutgruppenantigene des Endothels im transplantierten Gewebe, wodurch das Komplementsystem und die Blutgerinnung aktiviert werden (Chen et al., 2013a; Williams et al., 1968). Während der akuten Abstoßungsreaktion werden die MHC-Klasse-I-Proteine auf den Zellen des Transplantates durch das spezifische Immunsystems des Empfängers als fremd erkannt (Mitchell, 2013). T-Lymphozyten erkennen fremde MHC-Klasse-I-Proteine des Spenders entweder direkt auf den Zellen des transplantierten Gewebes oder indirekt nach Antigenprozessierung auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen des Empfängers (Cornell et al., 2008). In Folge der Aktivierung des spezifischen Immunsystems kommt es nach der Transplantation auch zur Bildung von Antikörpern, die an MHC-Klasse-I-Proteine binden (Colvin und Smith, 2005). Die chronische Abstoßungsreaktion zeichnet sich durch eine Entzündungsreaktion an den Endothelzellen der Blutgefäße des transplantierten Gewebes aus. Nachfolgend kommt es zu einer fortschreitenden Verengung des Gefäßlumens, welche zudem häufig von einer Fibrosierung des Parenchyms begleitet wird (Kloc und Ghobrial, 2014).

Im Rahmen der Abstoßungsreaktion sind neben den Lymphozyten auch die Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten im transplantierten Gewebe nachweisbar (Beland et al., 2015). Eine Besonderheit stellt die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen dar. Bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen in einen durch Radiochemotherapie immunsupprimierten Empfänger kann es zur Graft-versus-Host Reaktion kommen (Shlomchik, 2007). Hierbei greifen reife T-Lymphozyten des Transplantates die Zellen des Empfängerorganismus an.

Im Gegensatz zu transplantiertem Gewebe werden implantierte Biomaterialien im immunologischen Sinne nicht abgestoßen. Mit Ausnahme der Hypersensitivität gegenüber Schwermetallen wirken Biomaterialien nicht immunogen und lösen keine spezifische Immunantwort aus (Franz et al., 2011). Der Organismus reagiert auf die Implantation von Biomaterialien mit der oben beschriebenen FBR.

2.5 Morphologie und Funktion der Leukozyten im Rahmen der Fremdkörperantwort

Leukozyten können durch die Expression ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle definiert und charakterisiert werden. Viele dieser Oberflächenantigene erfüllen wichtige Funktionen im Rahmen der Immunantwort. Monoklonale Antikörper, die dasselbe Oberflächenantigen von Leukozyten erkennen, können in Gruppen, die sogenannten Differenzierungscluster (CD), eingeteilt werden (Murphy et al., 2012).

Für die Ratte sind ausgewählte Oberflächenantigene der Leukozyten in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Ausgewählte Leukozyten-Oberflächenantigene der Ratte mit Funktion und bekannten Antikörper-Klonen

Zellpopulation	Antigen	Funktion	Antikörper-Klon	Referenz
Leukozyten	CD45	Signaltransduktion, Tyrosin-Phosphatase	OX-1	Sunderland et al. (1979); Sasaki et al. (2001)
T-Helferzellen	CD3	TCR Signaltransduktion	G4.18	Nicolls et al. (1993)
	CD4	TCR Korezeptor (MHC-Klasse II)	OX-35, W3/25	Jefferies et al. (1985); White et al. (1978)
zytotoxische T-Zellen	CD3	TCR Signaltransduktion	G4.18	Nicolls et al. (1993)
	CD8a	TCR Korezeptor (MHC-Klasse I)	OX-8	Green (1984); Brideau et al. (1980)
neutrophile Granulozyten	CD11b/c	C3bi-Rezeptor	OX-42	Robinson et al. (1986); Fecho und Lysle (2002)
	unbekannt		HIS48	Ysebaert et al. (2000); Fecho und Lysle (2002)
eosinophile Granulozyten	CD4	Chemokin-Rezeptor	OX-35	Wallgren et al. (1995); Rand et al. (1991)
	unbekannt		HIS48	Ysebaert et al. (2000)
	CD11b/c	C3bi-Rezeptor	OX-42	Robinson et al. (1986)
Monozyten/Makrophagen	CD4	Chemokin-Rezeptor	OX-35, W3/25	Barclay (1981); Jefferies et al. (1985); Rand et al. (1991)
	CD8a	Regulation Mediator Freisetzung	OX-8	Hirji et al. (1997); Hirji et al. (1999)
	CD11b/c	C3bi-Rezeptor	OX-42	Robinson et al. (1986)
	unbekannt		HIS48	Ysebaert et al. (2000); Fecho und Lysle (2002)
	ED2 ähnlich	unbekannt	HIS36	van Goor et al. (1988); Dörger et al. (2001)
natürliche Killerzellen	CD8a	unbekannt	OX-8	Cantrell et al. (1982)
	CD11b/c	C3bi-Rezeptor	OX-42	Dolen et al. (2015)
dendritische Zellen	CD11b/c	C3bi-Rezeptor	OX-42	Robinson et al. (1986)
Mastzellen	CD8a	Regulation Mediator Freisetzung	OX-8	Lin et al. (1998); Kim et al. (2004)

TCR = T-Zell-Rezeptor, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, C3bi = Spaltprodukt von Komplementfaktor C3b

2.5.1 Lymphozyten

T- und B-Lymphozyten sind Bestandteil der adaptiven, spezifischen Immunantwort. Morphologisch sind Lymphozyten durch einen großen, runden Zellkern und ein schmales Zytoplasma gekennzeichnet (Liebich et al., 2004). Die kleinen, runden Zellen besitzen einen Durchmesser von 5–10 µm. Eine Unterscheidung in T- und B-Lymphozyten ist anhand ihrer morphologischen Struktur nicht möglich. Zur Differenzierung ist die Identifikation der Oberflächenantigene erforderlich. Lymphozyten kommen im Blut, in lymphatischen Organen und unter mukosalen Oberflächen vor. Bei der Ratte beträgt der Anteil der Lymphozyten an den im Blut zirkulierenden Leukozyten 65–84 % (Baker et al., 2006).

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten stammen aus dem Knochenmark, reifen im Thymus und erwerben ihre Immunkompetenz in den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz (Liebich et al., 2004). Sie sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich und erkennen Antigene, die von anderen Zellen präsentiert werden.

Die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) ermöglicht die Unterscheidung von anderen Leukozyten. Der TCR besitzt eine Antigenbindungsstelle und einen assoziierten CD3-Komplex, der an der TCR-Signaltransduktion beteiligt ist (Nicolls et al., 1993). Reife T-Lymphozyten können anhand ihrer Oberflächenmoleküle in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterschieden werden (Liebich et al., 2004). T-Helferzellen erkennen Antigene auf MHC-Klasse-II-Proteinen von antigenpräsentierenden Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen Antigene auf MHC-Klasse-I-Proteinen. Die Glykoproteine CD4 und CD8 dienen dabei als Korezeptoren für den TCR. Bei der Ratte werden zudem periphere, doppelt positive T-Lymphozyten beschrieben, die auf ihrer Zelloberfläche die beiden Glykoproteine CD4 und CD8 gleichzeitig exprimieren (Kenny et al., 2000).

Nach Implantation eines Biomaterials sind T-Lymphozyten während der chronischen Entzündungsreaktion vorübergehend in der Implantatumgebung vorhanden (Anderson, 2001). Die genaue Funktion der T-Lymphozyten und die Interaktion mit anderen Zellen während der FBR sind jedoch weitgehend unbekannt. Yokoyama et al. (1986) und Chang et al. (2009) beobachteten *in vitro* die Adhäsion von T-Lymphozyten an die Oberfläche von verschiedenen Biomaterialien. In einem anderen Versuch führte *in vitro* die Anwesenheit von T-Lymphozyten zur signifikanten Steigerung der Adhäsion und Fusion von Monozyten/Makrophagen auf Materialoberflächen (Brodbeck et al., 2005). Eine direkte Zellinteraktion zwischen T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen war dafür nicht notwendig. T-Lymphozyten werden wahrscheinlich durch ausgeschüttete Zytokine von Monozyten/Makrophagen rekrutiert und aktiviert (Brodbeck et al., 2005; Chang et al., 2009). Rodriguez et al. (2009) zeigten, dass T-Lymphozyten nicht für die Induktion der FBR notwendig sind, da eine normale FBR auf ein Biomaterial auch in T-Zell-defizienten Mäusen ablaufen kann.

B-Lymphozyten

Nach der Entwicklung im Knochenmark findet die Reifung der B-Lymphozyten bei den Säugetieren in den Peyer-Plaques des Verdauungstraktes oder im Knochenmark statt (Tizard, 2013). Danach migrieren die Zellen in die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz. B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort ver-

antwortlich (Liebich et al., 2004). Auf ihrer Zelloberfläche tragen sie Antikörper als Rezeptoren für Antigene. Nach Antigenkontakt und unter dem Einfluss von aktivierten T-Helferzellen differenzieren sich B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper synthetisieren.

Über die humorale Immunantwort im Rahmen der FBR ist wenig bekannt (Anderson, 2001). Verschiedene Studien belegen eine nur geringe Infiltration bzw. fehlende Anwesenheit von B-Lymphozyten nach Implantation eines Biomaterials (Higgins et al., 2009; Hunt et al., 1996; Rodriguez et al., 2008; van Luyn et al., 2001). Van Luyn et al. (2001) konnten bei Ratten erst nach wiederholter Implantation des gleichen polymeren bzw. biomolekularen Biomaterials Plasmazellen in der Implantatumgebung nachweisen.

2.5.2 Granulozyten

Granulozyten gehören neben den Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen zu den Zellen der angeborenen, unspezifischen Immunantwort (Kumar und Sharma, 2010). Sie werden anhand der Färbeeigenschaften ihrer zytoplasmatischen Granula unterschieden (Liebich et al., 2004).

Neutrophile Granulozyten

Lichtmikroskopisch zeichnen sich neutrophile Granulozyten durch einen segmentierten Zellkern sowie zahlreiche zytoplasmatische Granula und sekretorische Vesikel aus (Kolaczowska und Kubes, 2013). Der Durchmesser der mobilen Zellen beträgt 10–14 µm (Liebich et al., 2004). Die Granula und sekretorischen Vesikel enthalten zahlreiche lytische Enzyme und antibakterielle Moleküle (Tizard, 2013).

Nach ihrer Bildung im Knochenmark zirkulieren neutrophile Granulozyten im peripheren Blut. Bei der Ratte beträgt der Anteil der Neutrophilen an den Leukozyten im Blut 9–34 % (Baker et al., 2006). Jedoch befindet sich unter physiologischen Bedingungen nur ein geringer Teil der Zellpopulation im peripheren Blutkreislauf, da der Großteil der neutrophilen Granulozyten in den Kapillaren von Leber, Milz und Lunge sowie im Knochenmark gespeichert ist (Tizard, 2013). Im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion werden die Zellen aus den Speicherorganen freigesetzt, wandern aus den Blutgefäßen ins interstitielle Bindegewebe und migrieren entlang chemotaktischer Faktoren zum Ort der Entzündung.

Unmittelbar nach Implantation eines Biomaterials werden neutrophile Granulozyten zum Fremdkörper rekrutiert. Ursache der Rekrutierung sind durch aktivierte Thrombozyten, Mastzellen, Endothelzellen und verletzte Gewebezellen freigesetzte Mediatoren sowie eine gesteigerte lokale Durchblutung und Gefäßpermeabilität (Franz et al., 2011; Luttkhuizen et al., 2006). Die neutrophilen Granulozyten werden durch Adhäsion an die adsorbierten Proteine auf der Implantatoberfläche aktiviert (Anderson, 2001). Daraufhin erfolgt eine Degranulation der Zellen sowie die Phagozytose von Zelltrümmern und körperfremdem Material (Anderson, 2001; Luttkhuizen et al., 2006). Große Implantate führen zur frustranen Phagozytose mit Ausschüttung lytischer Enzyme in den Extrazellularraum, wobei eine Degradation des Implantates und eine Schädigung des umgebenden Gewebes auftreten kann (Anderson, 1993; Franz et al., 2011; Henson, 1971; Smith, 1994). Aktivierte neutrophile Granulozyten synthetisieren zudem zahlreiche Zytokine, die als Rekrutierungs- und Aktivierungsfaktoren für Monozyten/Makrophagen, unreife dendritische Zellen, NK-Zellen, Lymphozyten sowie

weitere Granulozyten wirken (Scapini et al., 2000).

Die Apoptose der neutrophilen Granulozyten mit anschließender Phagozytose durch Makrophagen ist ein komplexer Vorgang, der zur Auflösung der akuten Entzündungsreaktion führt und von Martin et al. (2015) umfangreich beschrieben wurde. Nach Implantation eines Biomaterials verschwinden die neutrophilen Granulozyten typischerweise innerhalb der ersten zwei Tage aus der Implantatumgebung (Anderson, 2001). Wenn sie später während der FBR auftreten, sind sie ein Zeichen für eine bakterielle Infektion (Nuss und von Rechenberg, 2008).

Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten der Ratte sind 12–14 µm groß und besitzen einen bandförmigen Zellkern, der oft einen vollständigen Ring bildet (Liebich et al., 2004; Schermer, 1958). Das Zytoplasma schließt in großer Zahl azidophile Granula ein. Die Granula enthalten Enzyme, Lipidmediatoren, Zytokine und basische Proteine (Tizard, 2013). Die Zellen sind zur amöboiden Eigenbewegung, Phagozytose und Degranulation befähigt. Die Entwicklung und Differenzierung der eosinophilen Granulozyten erfolgt im Knochenmark, danach migrieren sie aus dem Blut in das Zielgewebe (Rothenberg und Hogan, 2006). Bei der Ratte beträgt der Anteil der eosinophilen Granulozyten an den im Blut zirkulierenden Leukozyten 0–6 % (Baker et al., 2006).

Nach Implantation von Biomaterialien werden lokale Infiltrate von Granulozyten beobachtet, die zu weniger als 10 % aus eosinophilen Granulozyten bestehen (Anderson und McNally, 2011). Die Rekrutierung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten erfolgt analog zu den neutrophilen Granulozyten. Der genaue Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf den Verlauf der FBR ist weitgehend unbekannt (Anderson und McNally, 2011).

Im Rahmen der physiologischen Wundheilung tragen eosinophile Granulozyten zur Regulation biologischer Reaktionen bei, wobei sie hauptsächlich am Kollagenstoffwechsel beteiligt sind (Todd et al., 1991; Wong et al., 1993). Einerseits werden von eosinophilen Granulozyten Kollagenasen synthetisiert, die zur Degradation von Kollagenfasern führen (Bassett et al., 1976; Shlopov und Hasty, 1998). Andererseits fördert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Bildung von Granulationsgewebe mit Angiogenese, Migration und Proliferation von Fibroblasten sowie die Synthese von neuen Kollagenfasern (Pakyari et al., 2013; Schultz et al., 1991; Wang et al., 2006).

2.5.3 Monozyten, Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen

Morphologisch kennzeichnet Monozyten ein runder bis bohnenförmig eingezogener Zellkern und ein breites Zytoplasma mit zahlreichen azurophilen Granula (Liebich et al., 2004). Der Durchmesser der mobilen Zellen beträgt 12–20 µm. Die Granula beinhalten verschiedene proteolytische Enzyme. Nach ihrer Entwicklung und Differenzierung aus Vorläuferzellen im Knochenmark zirkulieren Monozyten kurzzeitig im Blut, verlassen aktiv mittels Diapedese die Blutbahn und wandeln sich im interstitiellen Bindegewebe in Makrophagen um (Liebich et al., 2004). Bei der Ratte beträgt der Anteil der Monozyten an den im Blut zirkulierenden Leukozyten 0–5 % (Baker et al., 2006).

Anhand der Oberflächenantigene, Morphologie und Funktion können zwei Subpopulationen von Blutmonozyten bei Ratte und Maus unterschieden werden: ortsständige und inflammatorische Monozyten (Geissmann et al., 2003; Grau et al., 2000; Yrliid et

al., 2006). Ortsständige Monozyten stellen die dominierende Population der Blutmonozyten dar. Sie sind morphologisch kleiner und weniger granulär als die inflammatorische Subpopulation (Ahuja et al., 1995; Geissmann et al., 2003). Ortsständige Monozyten migrieren in nicht entzündetes Gewebe, wo sie sich zu gewebeständigen Makrophagen differenzieren (Geissmann et al., 2003). Inflammatorische, aktivierte Monozyten werden schnell aus dem Knochenmark rekrutiert, treten im Blut nur kurz in Erscheinung und differenzieren sich im entzündeten Gewebe zu Makrophagen (Geissmann et al., 2003; Yrlid et al., 2006). Aus der kurzlebigen, inflammatorischen Subpopulation können ortständige Monozyten hervorgehen (Yrlid et al., 2006). Beide Subpopulationen haben das Potential sich zu dendritischen Zellen zu entwickeln (Geissmann et al., 2003).

Makrophagen weisen gegenüber den Monozyten im Blut eine deutliche Pleomorphie auf (Mischke, 2005). Kurz nach dem Übertritt ins Gewebe ähneln Makrophagen in ihrer Gestalt weitgehend den Blutmonozyten. Mit zunehmender Differenzierung nehmen die Zellen die typische Morphologie von Makrophagen an. Der Zellkern ist rund bis oval und liegt meist exzentrisch. Die Zellen nehmen an Größe zu, das Zytoplasma ist deutlich vakuolisiert und kann phagozytiertes Material enthalten.

Die Gesamtpopulation der Makrophagen kann nach Mosser und Edwards (2008) anhand ihrer Funktion in drei Subpopulationen eingeteilt werden: klassisch aktivierte Makrophagen, Makrophagen der Wundheilung und regulatorische Makrophagen. Diese Einteilung stellt eine Erweiterung der zuvor üblichen Klassifikation von Makrophagen in M1 (klassisch aktivierte Makrophagen) und M2 (alternativ aktivierte Makrophagen) dar (Gordon, 2003; Mills et al., 2000). Klassisch aktivierte Makrophagen (M1) dienen der Abwehr von Antigenen durch Phagozytose sowie Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffverbindungen (Franz et al., 2011; Mosser und Edwards, 2008). Makrophagen der Wundheilung (M2) fördern die Regeneration des Gewebes durch zytokinvermittelte Angiogenese sowie Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten. Die Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen durch regulatorische Makrophagen (M2) führt zur Begrenzung der Entzündungsreaktion.

Nach Implantation eines Biomaterials stellen Monozyten, Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen neben den Granulozyten die bedeutendsten Zellpopulationen im Verlauf der FBR in der Implantatumgebung dar (Xia und Triffitt, 2006). Während der akuten Entzündungsreaktion werden Monozyten durch proinflammatorische Zytokine rekrutiert und aktiviert, die von neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Mastzellen, Endothelzellen und verletzten Gewebezellen ausgeschüttet werden (Anderson et al., 2008). Im entzündeten Gewebe differenzieren sich Monozyten zügig zu Makrophagen und adhären an die Oberfläche von Biomaterialien. Die adhärenen Makrophagen weisen die typischen Eigenschaften von klassisch aktivierten Makrophagen auf (Franz et al., 2011). Sie sekretieren proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffverbindungen, Proteasen und phagozytieren Zelltrümmer, apoptotische Zellen sowie kleine Partikel des Implantatmaterials (Franz et al., 2011; Xia und Triffitt, 2006).

Große, nicht phagozytierbare Partikel, die Zytokine Interleukin 4 und Interleukin 13 sowie das Protein Vitronektin können die Fusion von Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen induzieren (DeFife et al., 1997; McNally und Anderson, 1995; McNally et al., 2008; Xia und Triffitt, 2006). Fremdkörperriesenzellen haben eine unregelmäßige Form, ihr Zytoplasma ist vakuolisiert und enthält meist mehr als 20 Zellkerne, die zufällig im Zytoplasma verteilt sind (Anderson, 2000). Die mehrkernigen Zellen zeigen

eine reduzierte Phagozytoseaktivität bei gleichzeitig verstärkter extrazellulärer Degradation (Xia und Triffitt, 2006). Zudem sekretieren die Fremdkörperriesenzellen verstärkt antiinflammatorische Zytokine (Jones et al., 2007). Die Fusion der Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen ist typischerweise mit der Änderung des Phänotyps von klassisch aktivierten Makrophagen zu Makrophagen der Wundheilung verbunden (Franz et al., 2011).

Während der FBR beteiligen sich Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren an der Bildung von Granulationsgewebe, aus dem sich durch Ablagerung von Kollagen eine bindegewebige Kapsel um den Fremdkörper und die adhärennten Zellen bildet (Anderson, 2001; Franz et al., 2011).

2.5.4 Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen

Natürliche Killerzellen

Lichtmikroskopisch zeichnen sich NK-Zellen durch einen großen Zellkern und ein weites Zytoplasma aus, welches mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula angefüllt ist (Murphy et al., 2012). Der Durchmesser der mobilen Zellen beträgt 12–15 µm. Die Granula enthalten lytische Enzyme wie Perforin und Granzyme.

NK-Zellen gehören neben den T- und B-Lymphozyten zu den Lymphozyten, jedoch exprimieren sie weder T- noch B-Zell-Antigene (Murphy et al., 2012). Nach ihrer Bildung im Knochenmark zirkulieren NK-Zellen im peripheren Blut und kommen im lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe vor (Tizard, 2013).

Nach Implantation eines Biomaterials infiltrieren neben Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten auch NK-Zellen in einem geringen Ausmaß während der chronischen Entzündungsreaktion die Implantatumgebung (Zheng et al., 2004). Die genaue Funktion der NK-Zellen und die Reaktionen auf die implantierten Biomaterialoberflächen während der FBR sind jedoch unbekannt (Anderson und McNally, 2011). Es wird vermutet, dass NK-Zellen durch die Synthese von Zytokinen die Fusion von Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen induzieren können.

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind mononukleäre Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Zellfortsätzen, die sich sternenförmig vom Zellkörper aus in verschiedene Richtungen erstrecken (Steinman und Cohn, 1973). Dendritische Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark und migrieren als unreife dendritische Zellen in periphere lymphatische und interstitielle Gewebe des Körpers (Tizard, 2013). Die unreife Form ist für die Antigenerkennung, -aufnahme und -prozessierung verantwortlich. Für die Antigenpräsentation migrieren die unreifen Zellen in lymphatische Organe, wo sie als reife Zellen naive Lymphozyten aktivieren und Zytokine sekretieren (Banchereau und Steinman, 1998). Dendritische Zellen stellen somit eine Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar. Anhand ihrer Herkunft, Morphologie, Oberflächenantigene und Funktion werden verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen unterschieden: plasmazytoide, myeloide und folliculäre dendritische Zellen sowie Langerhans-Zellen (Tizard, 2013).

Nach Implantation eines Biomaterials werden dendritische Zellen in der Implantatumgebung beobachtet (Vasilijic et al., 2005). Es wird vermutet, dass sie zur Entwicklung und Auflösung der FBR beitragen, jedoch ist der genaue Einfluss der dendritischen Zellen auf den Verlauf der FBR weitgehend unbekannt (Keselowsky und Lewis, 2017).

Randolph et al. (1999) beobachteten nach intrakutaner Injektion von Mikropartikeln bei der Maus, dass sich etwa 25 % der eingewanderten Monozyten zu dendritischen Zellen differenzieren. Park und Babensee (2012) zeigten in einem *In-vitro*-Versuch, dass Reifung und Funktion der dendritischen Zellen von den Eigenschaften des Biomaterials beeinflusst werden.

2.5.5 Mastzellen

Bei Nagetieren werden zwei Arten von Mastzellen unterschieden: dermale und peritoneale Bindegewebemastzellen sowie intestinale und pulmonale Mukosamastzellen (Metcalf et al., 1997). Die Mukosamastzellen werden hier nicht weiter betrachtet.

Lichtmikroskopisch zeichnen sich Bindegewebemastzellen durch zahlreiche zytoplasmatische, basophile, metachromatische Granula und einen ovalen bis bohnenförmigen Zellkern aus (Tizard, 2013). Der Durchmesser der mobilen Zellen beträgt 15–20 µm. Die Granula enthalten Histamin, Proteoglykane wie Heparin sowie Proteasen (Metcalf et al., 1997). Zusätzlich synthetisieren und sezernieren Bindegewebemastzellen Lipidmediatoren, Zytokine und den plättchenaktivierenden Faktor. Sie werden im Knochenmark gebildet und sind im lockeren Bindegewebe des Körpers entlang von kleinen Blutgefäßen zu finden, wo sie Weite und Permeabilität der Gefäße beeinflussen können (Liebich et al., 2004).

Die Gewebeschädigung nach Implantation eines Biomaterials verursacht die Degranulation von implantatnahen Bindegewebemastzellen (Amini et al., 2011). Infolge der Ausschüttung von Histamin und weiteren proinflammatorischen Mediatoren kommt es zur Vasodilatation mit Hyperämie, erhöhter Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen sowie nachfolgender Extravasation von Phagozyten durch die endotheliale Barriere (Tang et al., 1998; Zdolsek et al., 2007). Entlang der freigesetzten Chemokine migrieren die rekrutierten Phagozyten zum Ort der Implantation. Im Verlauf der FBR unterstützen Mastzellen zudem die Rekrutierung von Fibrozyten und die damit verbundene Bildung einer fibrösen Kapsel um das implantierte Biomaterial (Thevenot et al., 2011).

2.6 Verfahren zur Untersuchung der Fremdkörperantwort

2.6.1 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung des Gewebes um ein implantiertes Biomaterial ist gemäß der DIN EN ISO 10993-6:2009-08 der Goldstandard für die Beurteilung der lokalen biologischen Effekte nach Implantation eines Prüfkörpers. Die Aufbereitung der exzidierten Gewebeproben für die histopathologische Beurteilung umfasst folgende Schritte: Fixierung des Gewebes, Einbettung des Gewebes, Anfertigung von Gewebeschnitten und Färbung der Gewebeschnitte (DIN EN ISO 10993-6:2009-08; Yousif und Qasem, 2016). Neben der klassischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellen histochemische Färbungen, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie weitere Möglichkeiten zur Anfärbung von Gewebeschnitten dar (Yousif und Qasem, 2016). Die

Herstellung der histopathologischen Präparate dauert einige Tage bis Wochen bis alle Schritte durchlaufen sind (Bratlie et al., 2010).

Für die mikroskopische Beurteilung der histopathologischen Präparate wird ein quantitatives oder halbquantitatives Punktbewertungssystem verwendet (Ikarashi et al., 2002; Pizzoferrato et al., 1988). Dabei werden unter anderem folgende histopathologische Merkmale erfasst und beurteilt: Ausmaß der Fremdkörperkapsel und der Entzündung, Veränderungen in der Gewebemorphologie, Anzahl und Verteilung der Leukozyten, Auftreten und Ausmaß einer Nekrose sowie Parameter des Prüfkörpers (DIN EN ISO 10993-6:2009-08). Somit ermöglicht die histopathologische Untersuchung eine gleichzeitige Bewertung der zellulären Immunantwort und der histopathologischen Veränderungen des Gewebes in der Implantatumgebung (Anderson, 2001; Bratlie et al., 2010).

2.6.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder biologischer Partikel in einer Suspension (Shapiro, 2003). Die Funktionsweise der Durchflusszytometrie ist im Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Seit ihrer Entwicklung in den späten 1960er Jahren ist die Durchflusszytometrie zu einem wichtigen analytischen Werkzeug in fast allen biologischen Forschungsbereichen geworden (Boeck, 2001). Sie findet Anwendung in der Zellbiologie, Immunologie und Genetik sowie in der klinischen Forschung und bei hämatologischen Laboruntersuchungen.

Nach Catelas et al. (1998) bietet die Durchflusszytometrie gegenüber mikroskopischen Verfahren mehrere Vorteile:

- die Analyse der Zellen erfolgt auf Einzelzelebene,
- eine große Anzahl von Zellen wird schnell analysiert,
- alle Messungen sind quantitativ und objektiv,
- mehrere Zellparameter können gleichzeitig ausgewertet werden.

Im Allgemeinen sollte die Planung und Durchführung eines durchflusszytometrischen Experiments nach Kantor und Roederer (1996) folgende Schritte beinhalten:

1. Festlegung des Probenmaterials und Aufarbeitung zu einer vitalen Einzelzellsuspension,
2. Definition der gesuchten Zellpopulationen und Auswahl der Antikörperklone anhand der Antigene,
3. Festlegung der optimalen Antikörper-Fluorochrom-Kombination,
4. Bestimmung der optimalen Antikörperverdünnung mittels Titration,
5. Kompensation und Festlegung von Kontrollproben,
6. Probenfärbung und Analyse.

Nach Implantation eines Biomaterials kann das entstehende Exsudat zur Beurteilung der Biokompatibilität durchflusszytometrisch analysiert werden (Fabre et al., 1998; Petillo et al., 1994). Das Exsudat kann mithilfe des Käfig-Implantat-Systems oder nach direkter subkutaner Implantation eines röhrenförmigen Biomaterials gewonnen werden (Marchant et al., 1983; Rhodes et al., 1994). Die wiederholte durchflusszytometrische Analyse des Exsudates erlaubt die Charakterisierung der auftretenden Leukozyten-

populationen in der Nähe des implantierten Biomaterials im zeitlichen Verlauf der FBR (Petillo et al., 1994; Rodriguez et al., 2008).

Beim Käfig-Implantat-System wird ein zylinderförmiger Gitterkäfig aus rostfreiem Stahl oder Titan mit dem eingeschlossenen Biomaterial in subkutanes Gewebe implantiert (Marchant et al., 1983; Marchant, 1989). Der Käfig verhindert den direkten Kontakt zwischen Implantat und umgebenden Gewebe und erlaubt die Bildung eines Exsudats, in dem sich das Biomaterial befindet. Das gebildete Exsudat kann in zeitlichen Abständen wiederholt aus dem Käfig mithilfe einer Kanüle gewonnen werden ohne das Versuchstier opfern zu müssen. Käfige, die kein Biomaterial enthalten, dienen als Kontrollen. Nach subkutaner Implantation eines röhrenförmigen Biomaterials mit einer verschlossenen Seite bildet sich ein Exsudat innerhalb des Lumens, welches ebenfalls in zeitlichen Abständen wiederholt mithilfe einer Kanüle entnommen werden kann (Fabre et al., 1998).

3. Eigene Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit stellt eine Pilotstudie zur Etablierung der durchflusszytometrischen Untersuchung der Fremdkörperkapsel nach Implantation von reinem Magnesium, PEEK und PS im Rattenmodell dar. Die nachfolgende Hauptstudie, die von Susann Krummsdorf (Doktorandin der Arbeitsgruppe, approbierte Tierärztin) durchgeführt wird, soll die etablierte Methodik für die Beurteilung der Biokompatibilität von Implantaten aus verschiedenen Magnesiumlegierungen anwenden.

3.1 Implantatmaterialien

Die in der Pilotstudie verwendeten Implantate aus PEEK und PS wurden vom Unternehmen ARTHUR KRÜGER GmbH (Barsbüttel, Deutschland) bzw. den Zentralen Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover (Hannover, Deutschland) hergestellt.

Die Implantate aus reinem Magnesium (Mg) wurden vom Helmholtz-Zentrum Geesthacht – Zentrum für Material- und Küstenforschung GmbH (Geesthacht, Deutschland) bezogen. Die Fertigung der Implantate erfolgte mittels Strangguss und indirekter Extrusion. Zur Erzeugung einer einheitlichen glatten Oberfläche wurden die Mg-Implantate im Rahmen der Herstellung poliert und geätzt. Die Implantate wurden zudem auf ihre Reinheit von 99,98 % überprüft (Verunreinigungen: Eisen 42 ppm, Kupfer 21 ppm und Nickel 6 ppm, Korngröße: 28 μm).

Alle Implantate wiesen eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 2 mm auf (Abb. 2). Vor der Implantation wurden die Implantate gewogen, einzeln verpackt und mit Gammastrahlung sterilisiert (BBF Sterilisationservice GmbH, Kernen-Rommelshausen, Deutschland).



Abb. 2: Implantatmaterialien

A: Polyetheretherketon, B: Polystyrol, C: reines Magnesium

3.2 Tiermodell

Alle Tierversuche fanden in den Räumlichkeiten der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin) unter Aufsicht der

Tierschutzbeauftragten Frau PD Dr. med. vet. Juliane Unger statt und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes am 9. Januar 2014 genehmigt (LAGeSo-Nr.: G/0310/13).

Als Versuchstiere dienten 108 weibliche Lewis Ratten (LEW/Han®Hsd und LEW/SsNHsd) im Alter von 12 Wochen mit einem Gewicht von 170–220 g. Die Tiere wurden von Harlan-Winkelmann (Envigo RMS GmbH) bezogen. Aufgrund von Liefer-schwierigkeiten des Züchters kam es innerhalb der Pilotstudie zu einem Wechsel des Inzuchtstammes von LEW/Han®Hsd (Niederlande) zu LEW/SsNHsd (Großbritan-nien).

Im Laufe der Pilotstudie wurden zum genehmigten Tierversuchsantrag (LAGeSo-Nr.: G/0310/13) zwei Änderungsanzeigen bezüglich der Versuchstierzahl wegen Wechsel des Inzuchtstammes und zusätzlicher Erhebung der absoluten Leukozytenzahl pro Fremdkörperkapsel genehmigt. Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden daher die Ver-suche an 26 von 108 Tieren wiederholt (Tab. 7).

Den Tieren wurde nach Anlieferung eine einwöchige Eingewöhnungsphase vor Beginn der Versuche ermöglicht. So konnten sich die Tiere an einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden sowie an eine artgerechte Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit gewöhnen. Die Gruppen für die Haltung der Tiere wurden durch die Tierpfleger der FEM nach dem Zufallsprinzip zusammengestellt. Die Ratten wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren in regelkonformen Käfigen im Tierstall der FEM gehalten und uneingeschränkt mit Futterpellets und Trinkwasser versorgt. Die Käfige waren mit Ein-streu, Zellstoffblättern und kleinen Beißhölzern als Beschäftigungsmaterialien ausge-stattet. Für die Versuche wurden die schwersten Tiere zuerst ausgewählt.

Die Haltungseinrichtungen wurden regelmäßig von den Tierpflegern gereinigt und des-infiziert. Zudem wurde gemäß Tierschutz-Versuchstierverordnung das ausreichende Vorhandensein von Futterpellets und Wasser sowie das Wohlbefinden der Tiere täg-lich kontrolliert. Bei Auftreten der folgenden Symptome während der gesamten Hal-tungsdauer in der Versuchseinrichtung war ein Abbruch des Versuchs durch sofortige Euthanasie festgelegt: deutlich reduzierter Allgemeinzustand (Somnolenz), eingesun-kene Augen, Dyspnoe, Seitenlage, offene Wunden, Gewichtsverlust größer 20 % so-wie Muskelatrophie.

Tab. 7: Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen und Kennzeichnung der Wiederholungstiere

Implantat	Untersuchungszeitpunkt						Anzahl der Tiere
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Polyetheretherketon	n = 6 ^a	n = 6 ^b	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 36
Polystyrol	n = 6 ^c	n = 6 ^b	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 36
reines Magnesium	n = 6 ^a	n = 6 ^a	n = 6 ^d	n = 6	n = 6	n = 6	n = 36
							n = 108

Anzahl der Wiederholungstiere innerhalb der Versuchsgruppe: ^a n = 6, ^b n = 1, ^c n = 4, ^d n = 2

3.3 Versuchsaufbau

Für die vergleichende durchflusszytometrische Untersuchung der FBR auf Mg und die beiden permanenten Polymere PEEK und PS wurde eine Implantationsstudie im Rattenmodell konzipiert. Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden die Versuchstiere in drei verschiedene Materialgruppen eingeteilt, die jeweils sechs Untergruppen entsprechend dem Untersuchungszeitpunkt mit $n = 6$ Tieren aufwiesen (Tab. 7).

Unter Allgemeinanästhesie wurde bei allen Tieren eine präoperative Blutprobe gewonnen. Anschließend wurden vier Implantate eines Materials in jeweils ein Versuchstier chirurgisch implantiert, wobei jedem Tier zwei Implantate in subkutanes und zwei Implantate in intramuskuläres Gewebe eingesetzt wurden (Abb. 3).

Am 1., 3., 7., 14., 21. oder 28. postoperativen Tag erfolgte unter erneuter Allgemeinanästhesie eine kardiale Blutentnahme (final) mit anschließender Euthanasie der Tiere. Danach wurden die Milz sowie die Implantate mit der umgebenden Fremdkörperkapsel entnommen. Zusätzlich wurden Gewebeproben aus der unmittelbaren Umgebung der Fremdkörperkapseln asserviert.

Die durchflusszytometrische Analyse der Blut- und Milzproben ermöglichte die Untersuchung der systemischen Immunantwort auf die Implantatmaterialien. Aus den präoperativ gewonnenen Blutproben wurde ein studieninterner Referenzbereich (siehe Kapitel 3.5.1.1) gebildet. Dieser diente der Detektion einer möglichen systemischen Immunantwort bei den finalen Blutproben. Die Fremdkörperkapseln einer Körperhälfte der Tiere wurden nach Aufarbeitung durchflusszytometrisch analysiert und für die Beurteilung der lokalen Immunantwort bzw. der FBR verwendet. Die Implantate und Fremdkörperkapseln der anderen Körperhälfte wurden histopathologisch von Marcel Geiling (Doktorand der Arbeitsgruppe, approbierter Arzt) untersucht. Die Zuordnung der Seite für die Durchflusszytometrie bzw. Histologie erfolgte für jedes Tier zufällig. Zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination während der Implantation wurden die asservierten Gewebeproben mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) auf bakterielle Ribonukleinsäure (RNA) untersucht. Für den Nachweis der Bioresorbierbarkeit wurde bei den Mg-Implantaten die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit bestimmt.

Die im Rahmen dieser Pilotstudie verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, hergestellten Puffer, Geräte und Computerprogramme sind im Anhang in tabellarischer Form aufgeführt (Tab. A1, Tab. A2, Tab. A3, Tab. A4, Tab. A5 und Tab. A6).

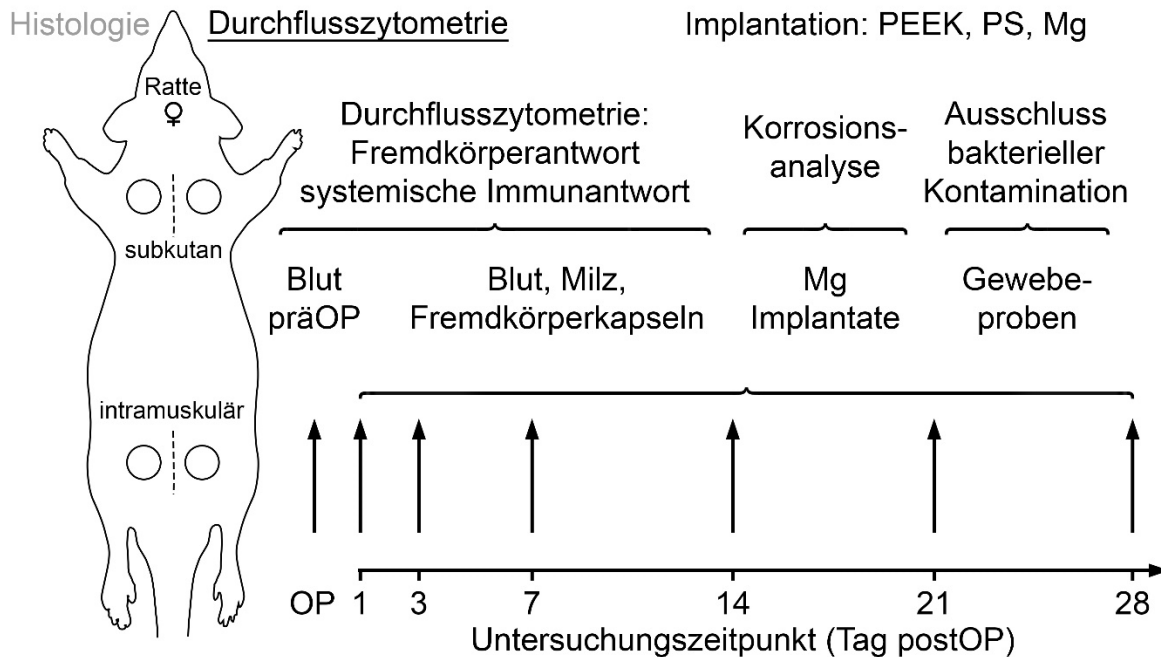


Abb. 3: Versuchsaufbau

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, OP = Zeitpunkt der Implantation, postOP = postoperativ, präOP = präoperativ

3.3.1 Operative Implantation

Zur intraoperativen Analgesie wurde den Ratten eine Stunde präoperativ subkutan Buprenorphin (0,04 mg/kg Körpermasse, Temgesic® Injektionslösung 0,3 mg/ml, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH) appliziert. Die Einleitung der Narkose erfolgte für fünf Minuten bei 5 l/min Sauerstoff und 3,5 bis 5,0 % Isofluran (Forene® 100 %, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG) in einer Narkosebox. Während des operativen Eingriffs wurde die Narkose über eine Inhalationsmaske mit 1,0 l/min eines 1,5 bis 1,8 %igen Isofluran-Sauerstoff-Gemisches aufrechterhalten. Für den Eingriff wurde die anästhesierte Ratte in Bauchlage auf einer Wärmematte gelagert und am Schwanz farblich markiert. Zum Schutz der Augen wurde eine dexpanthenolhaltige Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) appliziert. Anschließend wurden aus der *Vena saphena* ca. 250 µl Blut in ein heparinisierendes Blutröhrchen entnommen sowie das Operationsfeld geschoren und mit einer alkoholischen Iodlösung (Braunoderm®, B. Braun Melsungen AG) gereinigt und desinfiziert. Zur Infektionsprophylaxe erhielt das Tier eine einmalige subkutane Antibiose mit Clindamycin (60 mg/kg Körpermasse, Clindamycin-ratiopharm® 300 mg/2 ml Injektionslösung, ratiopharm GmbH). Vor Beginn des eigentlichen operativen Eingriffes wurde die Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft.

Für die Implantation der subkutanen Implantate erfolgte ein medianer Hautschnitt (Länge ca. 1,5 cm) im Bereich der Schulterblätter. Anschließend wurde im Unterhautfettgewebe an den Schnittkanten durch stumpfes Präparieren mittels einer Präparierschere jeweils eine Tasche gebildet (Abb. 4 A). Dabei wurde auf einen ausreichenden Abstand zum Hautschnitt geachtet. Das Implantat wurde in die entstandene subkutane Tasche eingebracht (Abb. 4 B). Im Anschluss wurde die Unterhauttasche mit einem einzelnen U-Heft (Vicryl 5-0) geschlossen (Abb. 4 C). Nach dem Einbringen beider

subkutanen Implantate wurde die Haut mit Einzelknopfnähten (Vicryl 5-0) verschlossen.

Für die Implantation der intramuskulären Implantate erfolgte ein medianer Hautschnitt (Länge ca. 1,5 cm) im Bereich der lumbosakralen Wirbelsäule. Durch vorsichtige Präparation mit der Präparierschere an den Schnittkanten wurde jeweils der *Musculus gluteus* freigelegt und die Muskelfaszie eröffnet. Kaudal eines sich abzeichnenden Gefäß-Nervenbündels wurde mit einer Präparierschere zwischen den Muskelfasern unter Beachtung der Faserausrichtung stumpf eine Tasche in den Muskel präpariert (Abb. 4 D) und das Implantat eingebracht (Abb. 4 E). Anschließend wurde mit einem einzelnen U-Heft (Vicryl 5-0) der Muskelbauch mit umgebender Muskelfaszie verschlossen (Abb. 4 F). Nach dem Verschluss der Muskelfaszie wurde die Haut mit einer intrakutanen Naht (Vicryl 5-0) genäht.

Zum Ende des Eingriffs wurden die Operationswunden mit iodhaltiger alkoholfreier Desinfektionslösung (Braunol®, B. Braun Melsungen AG) desinfiziert. Die Anästhetikazufuhr wurde beendet und die Ratten wurden in Bauchlage einzeln in Käfige verbracht. Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Tiere unter Rotlicht platziert und standen unter Beobachtung.

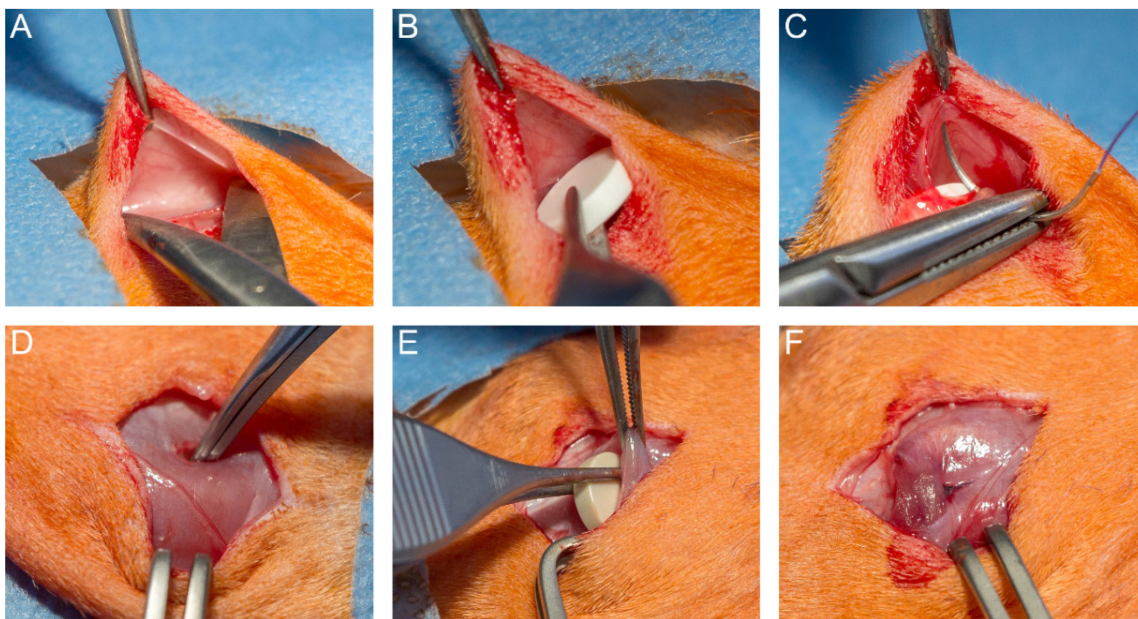


Abb. 4: Operative Implantation subkutan und intramuskulär
A–C: subkutane Implantation, D–F: intramuskuläre Implantation

3.3.2 Postoperatives Management

Perioperativ wurden die Empfehlungen der GV-SOLAS (2010) zur Schmerztherapie bei Versuchstieren berücksichtigt. Zur Analgesie wurde dem operierten Tier postoperativ für drei Tage Tramadol (Tramal® Tropfen, 100 mg/ml, Grünenthal GmbH) dem Trinkwasser mit einer Dosierung von 2,5 mg Tramadol in 100 ml Trinkwasser zugesetzt. Die Tiere wurden in den ersten 24 Stunden nach der Operation einzeln gehalten, wobei eine uneingeschränkte Bewegung möglich war. Ab dem zweiten postoperativen

Tag wurden die Tiere in Zweiergruppen und ab dem siebten postoperativen Tag in Vierergruppen gehalten.

Zusätzlich zur täglichen Inaugenscheinnahme durch das Tierpflegepersonal wurde das klinische Allgemeinbefinden der Tiere anhand eines Überwachungsbogens einmal täglich in den ersten drei postoperativen Tagen und im Anschluss einmal wöchentlich bis zum Ende der Studie durch die Doktoranden der Arbeitsgruppe beurteilt (postoperative Überwachungsbögen siehe Anhang 10.2). Zudem wurde für die ersten drei Tage täglich die Trinkmenge dokumentiert. Ab dem zweiten postoperativen Tag wurde die Trinkmenge wegen Haltung in Zweiergruppen nur näherungsweise bestimmt. Die Körpermasse der Tiere wurde vor der Implantatentnahme und postoperativ einmal pro Woche protokolliert. Besonderheiten bei der Wundheilung wurden ebenfalls dokumentiert.

3.3.3 Entnahme der Implantate

Für alle Untersuchungszeitpunkte erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere mit anschließender Implantatentnahme zur gleichen Tageszeit wie die operative Implantation.

Durch die intraperitoneale Injektion von Ketamin (60 mg/kg Körpermasse, Ketamin 10 %, CP-Pharma GmbH) und Medetomidin (0,3 mg/kg Körpermasse, Cepetor® KH, CP-Pharma GmbH) wurden die Tiere in Narkose versetzt. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehenreflex der Tiere beurteilt. Im Anschluss wurde den Ratten mittels kardialer Punktion ca. 2 ml Blut in ein heparinisiertes Blutröhrchen entnommen und sofort danach 10 ml Kaliumchloridlösung (Kaliumchlorid 7,45 %, B. Braun Melsungen AG) für die Euthanasie injiziert. Der Eintritt des Todes wurde anhand von ausbleibender Herz- und Atemtätigkeit sowie Trübung der zuvor roten Augen festgestellt.

Bei allen Tieren wurde die Milz entnommen, die bis zur Aufarbeitung in Phosphatpuffer auf Eis gelagert wurde. Für die Entnahme der subkutanen Implantate wurden die Nähte bzw. Operationsnarben im Schulterbereich eröffnet. Die sichtbaren Implantate wurden zusammen mit dem umgebenden Kapselgewebe mit einer Präparierschere freipräpariert und entnommen (Abb. 5 A–C). Für die Entnahme der intramuskulären Implantate wurden die Nähte bzw. Operationsnarben im Lumbosakralbereich eröffnet. Als Orientierung zum Auffinden der Implantate dienten die während der Implantation eingesetzten Vicryl-Fäden (Abb. 5 D). Mithilfe einer Präparierschere wurde die Muskelfaszie und das Muskelgewebe im Bereich der Implantate entfernt, so dass die Fremdkörperkapsel sichtbar wurde (Abb. 5 E). Anschließend wurden die Implantate zusammen mit dem umgebenden Kapselgewebe mit einer Präparierschere freipräpariert und entnommen (Abb. 5 F). Das entnommene Kapselmaterial wurde vom Implantat getrennt und einzeln in 500 µl Kollagenase-Puffer auf Eis bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination während der Implantation wurden Gewebeproben aus der unmittelbaren Umgebung der Fremdkörperkapseln steril entnommen, kryofixiert und für die spätere RTQ-PCR bei -80 °C gelagert. Für die quantitative Korrosionsbestimmung wurden die Mg-Implantate unter Argon-Atmosphäre in einer Glovebox entnommen, getrocknet und luftdicht in Folie eingeschweißt, um eine weitere Korrosion durch die Umgebungsluft zu verhindern. Nach der Entnahme wurde der Grad der Korrosion makroskopisch beurteilt. Die Aufarbeitung des Blutes und der entnommenen Gewebe erfolgte am Tag der Entnahme.

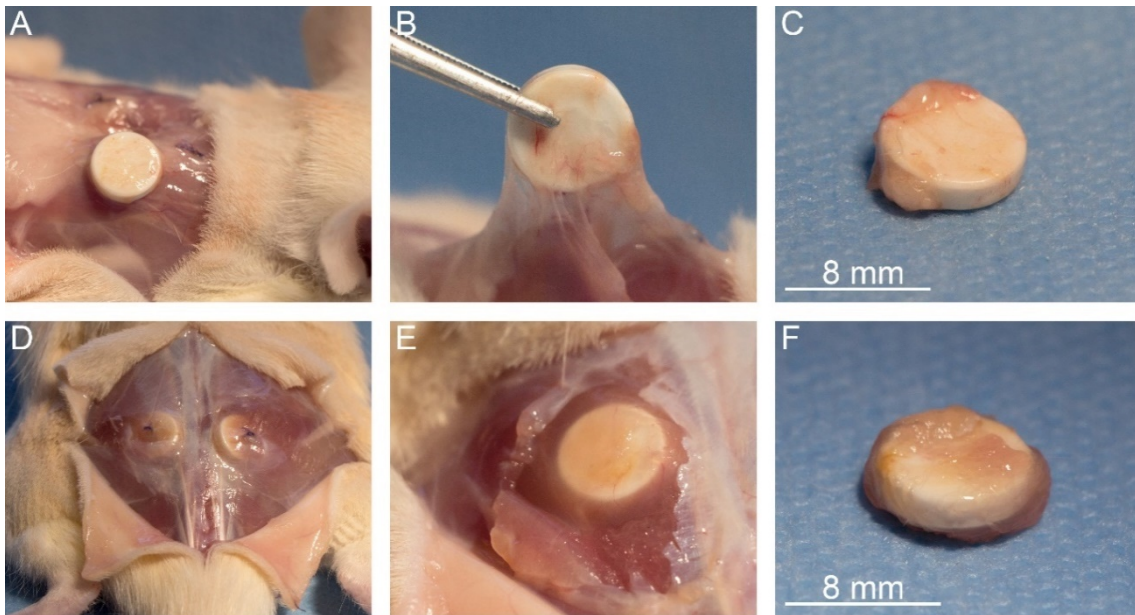


Abb. 5: Entnahme der Implantate subkutan und intramuskulär
A–C: subkutane Entnahme, D–F: intramuskuläre Entnahme

3.4 Methoden

3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um Zellpopulationen von Leukozyten im Blut und im Gewebe während der FBR auf die eingesetzten Implantatmaterialien charakterisieren zu können.

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellen auf der Ebene der Einzelzelle identifiziert und analysiert werden. Dafür werden die Zellen mit Antikörpern, die gegen spezifische Zelloberflächenmoleküle gerichtet sind, markiert. Bei diesen Molekülen handelt es sich zum Beispiel um Proteine der CD-Klassifizierung. Die eingesetzten Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Tandem aus zwei Fluorochromen direkt gekoppelt. Im Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension, bestehend aus unterschiedlich markierten Zellen, zu einem laminaren Probenstrom aus einzelnen Zellen fokussiert. Anschließend passieren die Zellen einen Laserstrahl, wodurch das Laserlicht gestreut wird und die Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Die Absorption von Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge eines Fluorochroms führt zur Emission von Licht einer charakteristischen, höheren Wellenlänge. Das Streulicht und die emittierten Fluoreszenzen werden von Detektoren des Durchflusszytometers registriert, anschließend von einem Computersystem in elektrische Signale umgewandelt und analysiert. Das gestreute Laserlicht enthält Informationen über die relative Zellgröße und die Granularität der gemessenen Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) entsteht in Verlängerung des Laserstrahls und ist proportional zur Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird im rechten Winkel vom Laserstrahl gemessen und ist ein Maß für die Zellgranularität bzw. Zellkomplexität. Die emittierten Fluoreszenzen geben Auskunft über die Bindung der eingesetzten Antikörper an ihre Zielmoleküle, wobei die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der

exprimierten zellulären Antigene ist. Beim Einsatz von Tandem-Konjugaten wird durch das Laserlicht zuerst ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, wodurch der zweite Farbstoff zur Fluoreszenzemission angeregt wird.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht somit die gleichzeitige Messung und Analyse von mehreren Parametern jeder einzelnen markierten Zelle. Eine Kombination der beiden Charakteristika Streulicht und Fluoreszenzintensität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gestattet im Rahmen der durchflusszytometrischen Auswertung die Identifizierung und Charakterisierung der markierten Zellen.

3.4.2 Etablierung der durchflusszytometrischen Methoden

Diese Pilotstudie umfasste neben dem eigentlichen Versuchsvorhaben Vorversuche zur Etablierung von Protokollen für die Isolierung und Antikörperfärbung von Leukozyten aus Blut, Milz und kollagenreichem Bindegewebe der Ratte. Als Material dienten hierfür asservierte Blut- und Gewebeproben von Ratten aus genehmigten Tierversuchen anderer Arbeitsgruppen. Das kollagenreiche Bindegewebe stellte ein Ersatzmaterial für die spätere Fremdkörperkapsel dar. Die etablierten Protokolle wurden im genehmigten Tierversuchsvorhaben für die durchflusszytometrische Analyse von Blut, Milz und Fremdkörperkapsel nach Implantation von Mg, PEEK und PS angewendet und validiert.

Die Vorversuche umfassten zudem die Konzentrationsbestimmung der eingesetzten Antikörper und die Kompensation der Fluoreszenzen am Durchflusszytometer. Die Kompensation wurde anhand von gefärbten Leukozyten aus der Milz erstellt. Die Milz ist ein geeignetes Referenzmaterial für die Markierung von Zellen aus dem Blutsystem und aus dem Gewebe. Diese Kompensation enthielt Einstellungen für die Lage der Zellen im FSC/SSC-Diagramm und korrigierte die spektralen Überlappungen der eingesetzten Fluorochrome. Für die durchflusszytometrische Analyse ist eine gute Trennung von negativen und positiv gefärbten Zellpopulationen notwendig. Dies wird durch ein optimales Antikörper-Antigen-Verhältnis erreicht. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurden die einzelnen Antikörper in verschiedenen Konzentrationen auf Blut-, Milz- und Hautzellen ausgetitriert. Die Konzentration mit der besten Signaltrennung zwischen ungefärbter Probe (Autofluoreszenz der Zellen) und gefärbter Probe (gekoppeltes Fluorochrom) wurde für die durchflusszytometrische Färbung eingesetzt.

Für die Immunphänotypisierung der Leukozyten in den verschiedenen Geweben wurden zwei Antikörper-Panel für die Ratte etabliert. Ein Panel ist eine festgelegte Zusammenstellung von verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die die gesuchten Zielzellen markieren und eine Detektion der Oberflächenantigene der Zellen im Durchflusszytometer ermöglichen. Das Blut- bzw. Milz-Panel diente zur Analyse der systemischen Immunantwort auf die eingesetzten Implantate. Das Kapsel-Panel ermöglichte die Markierung und Analyse von Leukozyten, die im Rahmen der frühen lokalen FBR in der Fremdkörperkapsel auftreten.

Als Kontrollen wurden im Laufe der Studie wiederholt ungefärbte Proben, einfach gefärbte Proben, Isotyp-Kontrollen der Antikörper und FMO-Kontrollen (engl. *fluorescence minus one*) gemessen. Eine unspezifische Färbung der Zellen konnte mithilfe des Einsatzes von Isotyp-Kontrollen ausgeschlossen werden. Hierbei wurden nicht spezifisch bindende Antikörper gleichen Isotyps und mit dem gleichen Fluorochrom gekoppelt wie der markierende Antikörper eingesetzt. Die ungefärbten

Proben und die FMO-Kontrollen dienten zur Orientierung für das Setzen der Gates um die Zellpopulationen. Für die FMO-Kontrollen wurden die Zellen mit dem Antikörper-Panel gefärbt, wobei jeweils ein Antikörper des Panels weggelassen wurde und die zugehörige Fluoreszenz im Panel fehlt. Einfach gefärbte Zellen dienten im Versuch als Kontrollen für die Kompensation.

Nach der Etablierung der durchflusszytometrischen Methoden wurden diese für die Messung und Analyse der Leukozyten in Blut, Milz und Kapselgewebe im Rahmen der Pilotstudie angewandt.

3.4.2.1 Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut

Jedem Tier wurde im Rahmen der Implantation (präoperativ) und bei der Entnahme der Implantate (final) ca. 250 µl bzw. 2 ml heparinisiertes Blut für die durchflusszytometrische Analyse entnommen. Die Aufarbeitung der präoperativen und finalen Blutproben erfolgte nach dem folgenden Schema:

Für die Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut der Ratte wurden im ersten Schritt die Erythrozyten lysiert. Dafür wurde je Blutprobe 200 µl heparinisiertes Vollblut mit 4 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer durch leichtes Schwenken vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500g und 4 °C, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 400g und 4 °C sowie eine Resuspension des Zellpellets in 1 ml Phosphatpuffer. Zur Vorbereitung auf die Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 400g und 4 °C in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 400g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet für die Antikörperfärbung genutzt.

3.4.2.2 Isolierung von Leukozyten aus der Milz

Die entnommenen Milzen wurden mit einem Skalpell in einer großen Petrischale zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde durch ein Zellsieb (100 µm) gedrückt und mit Phosphatpuffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (40 µm) unter Zugabe von Phosphatpuffer filtriert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Probe wurde nun für 8 min bei 400g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde mit 4 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Probe für 5 min bei 500g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 3 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 400g und 4 °C sowie eine Resuspension des Zellpellets in 1 ml Phosphatpuffer. Zur Vorbereitung auf die Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 400g und 4 °C in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die relative Zellzahl in der Einzelzellsuspension wurde unter einem Lichtmikroskop mithilfe einer Zählkammer bestimmt. Aus der Einzelzellsuspension wurden $1-2 \cdot 10^6$ vitale Zellen entnommen und für die Antikörperfärbung verwandt.

3.4.2.3 Isolierung von Leukozyten aus der Fremdkörperkapsel

Für den Verdau des fibrösen Gewebes der Fremdkörperkapseln wurde ein Kollagenase-Puffer hergestellt. Dieser bestand aus den im Anhang aufgeführten Substanzen (Tab. A3). Von den Reagenzien Deoxyribonuclease, HEPES, Hyaluronidase und Natriumpyruvat wurden Aliquots (Tab. A7) hergestellt und bei -20 °C gelagert. Im Rahmen der Pilotstudie erfolgte die Herstellung des Kollagenase-Puffers unmittelbar vor

der Entnahme der Fremdkörperkapseln. Für die Verdauung von vier Fremdkörperkapseln wurde der Puffer nach dem folgenden Schema angefertigt:

Zuerst wurden 5,7 mg Collagenase P (13 Units) auf einer Präzisionswaage abgewogen und mit 1 ml Phosphatpuffer vermischt. Anschließend wurden die aufgetauten Aliquots in den folgenden Mengen zugegeben: je 20 µl von HEPES (4,8 mg), Hyaluronidase (0,05 mg), Natriumpyruvat (0,23 mg) und 200 µl Deoxyribonuclease (0,4 mg bzw. ≥ 800 KU). Die entstandene Lösung wurde mit Phosphatpuffer auf 2,0 ml aufgefüllt.

Für die weitere Aufarbeitung wurde die Fremdkörperkapsel mit dem Kollagenase-Puffer in eine kleine Petrischale überführt (Abb. 6 A) und mit einem Skalpell zerkleinert (Abb. 6 B). Im Anschluss wurde das Material für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert (Abb. 6 C). Nach der Inkubation wurde das Kapselgewebe in der Petrischale mithilfe eines Spritzenkolbens zerdrückt (Abb. 6 D). Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (100 µm) unter Zugabe von Phosphatpuffer filtriert. Die Probe wurde anschließend für 8 min bei 400g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 5 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 8 min bei 400g und 4 °C sowie eine Resuspension des Zellpellets in 5 ml Phosphatpuffer. Zur Vorbereitung auf die Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 400g und 4 °C in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 400g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet für die Antikörperfärbung genutzt. Insgesamt wurde immer eine Fremdkörperkapsel zu einem Zellpellet für die durchflusszytometrische Messung aufgearbeitet.

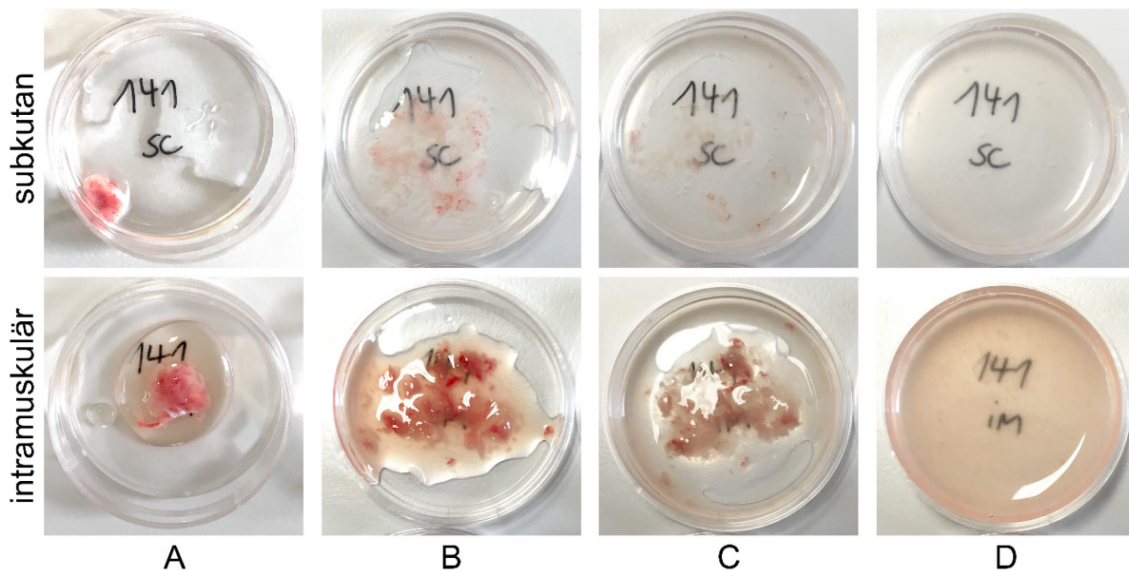


Abb. 6: Kollagenase-Verdau der Fremdkörperkapsel
 A: Fremdkörperkapsel in Kollagenase-Puffer, B: zerkleinerte Fremdkörperkapsel, C: nach Inkubation, D: Zellsuspension

3.4.2.4 Bestimmung der relativen Zellzahl der Milzsuspension

Zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der tote Zellen blau anfärbt. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in eine Zählkammer pipettiert.

Es wurde die Anzahl vitaler Zellen in den vier großen Eckquadraten bei 100facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop bestimmt und der Mittelwert errechnet. Die relative Zellzahl wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$c_{Zellen} = \bar{n}_{Eckquadrat} \cdot \frac{10^4}{ml} \cdot 2$$

c_{Zellen} relative Zellzahl (Maßeinheit $\frac{1}{ml}$)
 $\bar{n}_{Eckquadrat}$ durchschnittliche vitale Zellzahl pro Eckquadrat

3.4.2.5 Färbung der Leukozyten für die durchflusszytometrischen Messungen

Für die Färbung der Leukozyten wurden monoklonale Antikörper eingesetzt. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper dienten zur direkten Markierung der Oberflächenantigene der untersuchten Zellpopulationen. Bei der Auswahl der Fluorochrome wurden die Intensitäten der verschiedenen Fluorochrome im Verhältnis zur erwarteten Populationsgröße berücksichtigt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Blut- und Milzproben wurden Antikörper zur Phänotypisierung typischer Blutleukozyten ausgewählt (Tab. 8). Für die Untersuchung der Kapselproben wurden zusätzlich Antikörper gegen gewebeständige Makrophagen und Mastzellen eingesetzt (Tab. 9). Eine Übersicht über die Zielzellen der verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper ist in Tab. 10 aufgeführt. Entsprechend der aufgeführten Panel wurden die Antikörper in den angegebenen Verdünnungen zur Färbung eingesetzt. Zur Messung der Isotyp-Kontrollen wurden die Antikörper aus Tab. A8 verwendet.

Die isolierten Zellen wurden mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss in einem Volumen von 100 µl in FACS-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Probe anschließend für 4 min bei 400g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation für 4 min bei 400g und 4 °C. Zur Messung im Durchflusszytometer wurde die Probe in FACS-Puffer aufgenommen und durch ein Zellsieb (35 µm) filtriert. Der gefärbten Einzelzellsuspension wurde unmittelbar vor der Messung der fluoreszierende Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zugesetzt, um tote Zellen zu markieren.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden zur Vereinfachung Zellen, die mit dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper Anti-Rat Granulocyte Marker FITC (HIS48) oder Anti-Rat Macrophage Marker PE (HIS36) positive Färbeergebnisse erzielten, als HIS48- bzw. HIS36-exprimierend bezeichnet, obwohl für die Antikörper-Klone die Antigene unbekannt sind.

3. Eigene Untersuchungen

Tab. 8: Antikörper-Panel für Blut und Milz

Bezeichnung	Antikörper-Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rat CD45 eFluor 450	OX-1	Mouse IgG1, kappa	1:50	eBioscience
Anti-Rat CD3 APC	eBioG4.18	Mouse IgG3, kappa	1:200	eBioscience
Anti-Rat CD4 PerCP-eFluor 710	OX-35	Mouse IgG2a, kappa	1:400	eBioscience
Anti-Rat CD8a PE-Cy7	OX-8	Mouse IgG1, kappa	1:400	eBioscience
Anti-Rat CD11b/c PE	OX-42	Mouse IgG2a, kappa	1:200	eBioscience
Anti-Rat Granulocyte Marker FITC	HIS48	Mouse IgM	1:200	eBioscience

Tab. 9: Antikörper-Panel für die Fremdkörperkapsel

Bezeichnung	Antikörper-Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rat CD45 eFluor 450	OX-1	Mouse IgG1, kappa	1:50	eBioscience
Anti-Rat CD3 APC	eBioG4.18	Mouse IgG3, kappa	1:200	eBioscience
Anti-Rat CD4 PerCP-eFluor 710	OX-35	Mouse IgG2a, kappa	1:400	eBioscience
Anti-Rat CD8a PE-Cy7	OX-8	Mouse IgG1, kappa	1:400	eBioscience
Anti-Rat Granulocyte Marker FITC	HIS48	Mouse IgM	1:200	eBioscience
Anti-Rat Macrophage Marker PE	HIS36	Mouse IgG2a, kappa	1:10	eBioscience
Anti-Mouse CD117 (c-Kit) APC-eFluor 780	ACK2	Rat IgG2b, kappa	1:50	eBioscience

Tab. 10: Übersicht über die Zielzellen der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper bei der Ratte

Antikörper	Markierte Zellpopulation
Anti-Rat CD45 eFluor 450	Leukozyten
Anti-Rat CD3 APC	T-Lymphozyten
Anti-Rat CD4 PerCP-eFluor 710	T-Helferzellen, Monozyten/Makrophagen
Anti-Rat CD8a PE-Cy7	zytotoxische T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen
Anti-Rat CD11b/c PE	Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen
Anti-Rat Granulocyte Marker FITC (HIS48)	Granulozyten, Monozyten/Makrophagen
Anti-Rat Macrophage Marker PE (HIS36)	gewebeständige Makrophagen
Anti-Mouse CD117 (c-Kit) APC-eFluor 780	Mastzellen

3.4.2.6 Messung der durchflusszytometrischen Proben

Die gefärbten Einzelzellsuspensionen wurden an einem Durchflusszytometer gemessen. Das genutzte Durchflusszytometer (MACSQuant Analyzer 10) verfügte über drei Laser (405 nm, 488 nm, 635 nm), zwei Scatter-Kanäle (FSC und SSC) und acht Fluoreszenz-Kanäle. Zudem konnte der MACSQuant Analyzer unter Nutzung der MACSQuantify Software die Gesamtzahl der gemessenen Ereignisse und die volumetrisch ermittelten Ereignisse/ μl für jede gemessene Probe ausgeben. Die maximale Anzahl der gemessenen Ereignisse war mit der verwendeten Softwareversion des Durchflusszytometers bei den gewählten Einstellungen je Messung auf $2,7 \cdot 10^6$ Ereignisse begrenzt.

Vor Beginn der Messungen wurde nach Herstellervorgaben eine Kalibrierung des Durchflusszytometers durchgeführt. So konnte gewährleistet werden, dass die Intensität der Laser und der gemessenen Werte der Fluoreszenz über den gesamten Messzeitraum untereinander vergleichbar waren.

Die Proben wurden am Durchflusszytometer mit der angefertigten Kompensation am Tag der Entnahme und unmittelbar nach der Aufarbeitung gemessen.

3.4.2.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo. Für die differenzierte Auswertung der gemessenen Zellpopulationen wurden in einer hierarchischen Abfolge sogenannte Gates festgelegt.

Ein Gate ist ein definiertes Feld, welches eine bestimmte Zellpopulation umschließt. Das Festlegen von Gates nennt man Gating. Bei jedem Gating-Schritt wird die untersuchte Zellpopulation entsprechend ihrer Merkmale weiter eingegrenzt und untersucht. Die Gates können innerhalb von FSC-, SSC- und Fluoreszenz-Diagrammen definiert werden. Im FSC/SSC-Diagramm werden die Zellen nach ihrer Morphologie eingegrenzt und lassen sich im nachfolgenden Gating-Schritt entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität darstellen. Bei der Verwendung von Fluoreszenz-Diagrammen können Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität und damit verbundener Antigenexpression mit einem Gate umschlossen werden. Nachfolgend können die umgrenzten Zellpopulationen in einem FSC/SSC-Diagramm aufgetragen werden, um die morphologischen Eigenschaften der Zellen zu beurteilen.

Alle Gates wurden subjektiv gesetzt, zudem dienten die Kontrollproben (ungefärbte Probe und FMOs) als Orientierungshilfe. Das Gating für die durchflusszytometrische Analyse der Blut-, Milz- und Kapselproben wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert (Abb. 7 und Abb. 8). In FlowJo wurden die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten pro Probe und die jeweiligen prozentualen Anteile der Subpopulationen an den lebenden Leukozyten ermittelt.

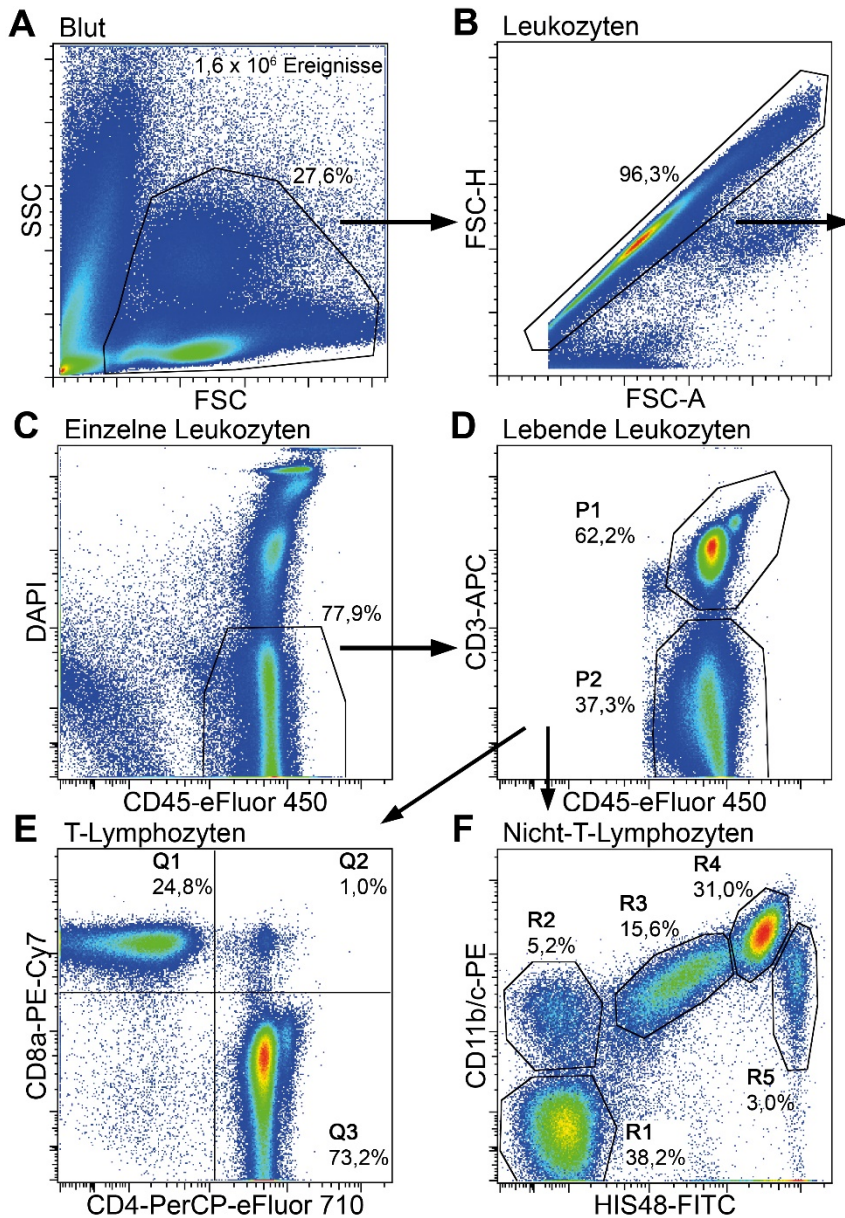


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten im Blut der Ratte
 Die Abbildung zeigt beispielhaft die Abfolge der Gates für die durchflusszytometrische Analyse der Leukozytenpopulationen im Blut der Ratte. Die grafische Analyse der Milz entspricht der des Blutes. Zuerst wurden in einem FSC/SSC-Diagramm die Leukozyten anhand ihrer relativen Größe und Granularität eingegrenzt (A). Um die Analyse von einzelnen Zellen gewährleisten zu können, wurden verklumpte Zellen (Doubletten) ausgeschlossen (B). Der Einsatz von DAPI ermöglichte die Differenzierung von lebenden und toten Leukozyten (C). Nachfolgend wurden die lebenden Leukozyten in CD3+ T-Lymphozyten (P1) und CD3- Nicht-T-Lymphozyten (P2) unterschieden (D). Die T-Lymphozyten wurden entsprechend ihrer Antigenexpression von CD4 und CD8a in drei Populationen aufgeteilt: CD4-CD8a+ (zytotoxische T-Zellen, Q1), CD4+CD8a+ (doppelt positive T-Lymphozyten, Q2) und CD4+CD8a- (T-Helferzellen, Q3) (E). Die kombinierte Analyse der Expression von CD11b/c und HIS48 ermöglichte die Identifizierung von fünf verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der CD3- Nicht-T-Lymphozyten: CD11b/c-HIS48- (vermutlich B-Lymphozyten, R1), CD11b/c+HIS48- (vermutlich NK-Zellen, R2), CD11b/c+HIS48low (Monozyten, R3), CD11b/c+HIS48med (Granulozyten, R4) und CD11b/c+HIS48high (Monozyten und Granulozyten, R5) (F). Die aufgeführten Prozentangaben entsprechen dem Prozentanteil der Zellen an den dargestellten Ereignissen in dem jeweiligen Diagramm.

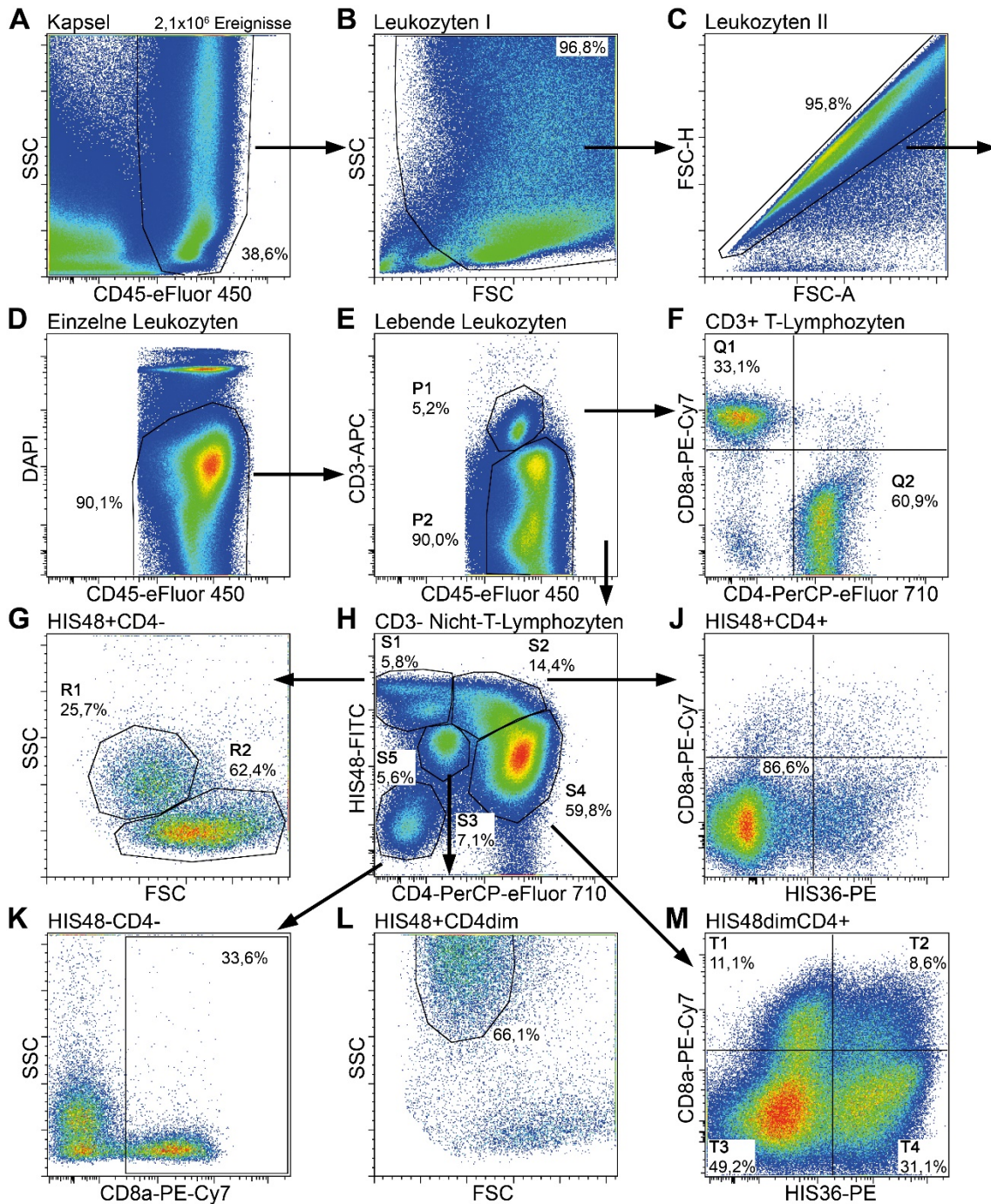


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten in der Fremdkörperkapsel der Ratte. Die Abbildung zeigt die Abfolge der Gates für die durchflusszytometrische Analyse der Leukozytenpopulationen im Gewebe der subkutanen Fremdkörperkapsel der Ratte an Tag 7 nach der Implantation von reinem Magnesium. Zuerst wurden die Leukozyten in der Einzelzellsuspension definiert (A). Nachfolgend wurden in einem FSC/SSC-Diagramm die Leukozyten anhand ihrer relativen Größe und Granularität eingegrenzt (B). Um die Analyse von einzelnen Zellen gewährleisten zu können, wurden verklebte Zellen (Doubletten) ausgeschlossen (C). Der Einsatz von DAPI ermöglichte die Differenzierung von lebenden und toten Leukozyten (D). Nachfolgend wurden die lebenden Leukozyten in CD3+ T-Lymphozyten (P1) und CD3- Nicht-T-Lymphozyten (P2) unterschieden (E). Die T-Lymphozyten wurden entsprechend ihrer Antigenexpression von CD4 und CD8a in zwei Populationen aufgeteilt: CD4-CD8a+ (zytotoxische T-Zellen, Q1) und CD4+CD8a- (T-Helferzellen, Q2) (F). Die kombinierte Analyse der Expression von HIS48 und CD4 ermöglichte die Identifizierung von fünf verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der CD3- Nicht-T-Lymphozyten: HIS48+CD4- (S1), HIS48+CD4+ (S2), HIS48+CD4dim (S3), HIS48dimCD4+ (S4) und HIS48-CD4- (S5) (H). Die HIS48+CD4- Zellen konnten

im FSC/SSC-Diagramm in Granulozyten (R1) und Monozyten/Makrophagen (R2) unterschieden werden (G). Die kombinierte Analyse der Expression von CD8a und HIS36 ermöglichte die Identifizierung von zwei verschiedenen Monozyten/Makrophagen-Populationen innerhalb der HIS48+CD4+ Zellen (J) und der HIS48dimCD4+ Zellen (M): Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+) und gewebeständige Makrophagen (HIS36+). Innerhalb der HIS48-CD4- Zellen wurden CD8a-positive Mastzellen und NK-Zellen eingegrenzt (K). Ein Teil der HIS48+CD4dim Zellen zeigte eine hohe Granularität, vermutlich eosinophile Granulozyten (L). Die aufgeführten Prozentangaben entsprechen dem Prozentanteil der Zellen an den dargestellten Ereignissen in dem jeweiligen Diagramm.

3.4.2.8 Berechnung von Werten

Die absolute Anzahl der lebenden Leukozyten in Blut, Milz und Fremdkörperkapsel wurde wie folgt berechnet:

- Anzahl der lebenden Leukozyten/ μ l Vollblut

$$LLB = LL \cdot \frac{PV_{gesamt}}{PV_{gemessen} \cdot BV}$$

- Anzahl der lebenden Leukozyten/Milz

$$LLM = LL \cdot \frac{PV_{gesamt}}{PV_{gemessen}} \cdot \frac{MV_{gesamt}}{MV_{gemessen}}$$

- Anzahl der lebenden Leukozyten/Fremdkörperkapsel

$$LLK = LL \cdot \frac{PV_{gesamt}}{PV_{gemessen}} \cdot V$$

LLB	Anzahl der lebenden Leukozyten/ μ l Vollblut
LLM	Anzahl der lebenden Leukozyten/Milz
LLK	Anzahl der lebenden Leukozyten/Fremdkörperkapsel
LL	Leukozytenzahl der Probe
PV_{gesamt}	Gesamtprobenvolumen
$PV_{gemessen}$	gemessenes Probenvolumen
BV	aufgearbeitetes Blutvolumen
MV_{gesamt}	Gesamtvolumen Milzsuspension
$MV_{gemessen}$	Volumen gemessene Milzsuspension
V	Verdünnungsfaktor

Bei dem Gesamtprobenvolumen handelt es sich um das Volumen, in welches das Zellpellet nach der Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Messung aufgenommen wurde. Das tatsächlich gemessene Probenvolumen wurde am Durchflusszytometer eingestellt und notiert. Um eine Luftaspiration am Gerät beim Ansaugen der Probe zu verhindern, wurde ein Rückstand in den Probenröhrchen belassen. Das tatsächlich gemessene Probenvolumen war zudem durch die maximale Zahl an messbaren Ereignissen des Durchflusszytometers begrenzt.

3.4.3 Zellsortierung, Zytozentrifugation und histologische Färbung

Für die morphologische Charakterisierung der Zellpopulationen, die im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse gefunden wurden, erfolgte eine Zellsortierung mit nachfolgender Zytozentrifugation sowie eine histologische Färbung mit mikroskopischer Beurteilung. Zusätzlich wurden Fotografien der Zellen angefertigt.

Die Zellsortierung wurde genutzt, um spezifische Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellsuspension zu isolieren. Bei der Zellsortierung werden nach der durchflusszytometrischen Messung Tropfen mit einzelnen Zellen vom Zellsortiergerät produziert. Tropfen, die eine gesuchte Zelle enthalten, werden elektrisch geladen, anschließend in einem Spannungsfeld voneinander getrennt und in unterschiedlichen Reagenzröhrchen aufgefangen.

Die Zellsortierung wurde an einem Zellsortiergerät (BD FACSAria-II SORP) von Mitarbeitern der FACS-Core-Unit des BCRT durchgeführt. Für die Zellsortierung wurden heparinisiertes Vollblut und Gewebe von Fremdkörperkapseln nach den etablierten Protokollen aufgearbeitet und gefärbt. Es wurden Fremdkörperkapseln von Tag 3, 7 und 14 nach Implantation verwendet. Das Zellsortiergerät konnte eine Probe entsprechend des etablierten Gatings für Blut und Fremdkörperkapsel in vier reine Zellpopulationen sortieren. Für die morphologische Charakterisierung von Blutleukozyten wurden folgende Populationen sortiert: CD11b/c+HIS48low, CD11b/c+HIS48med, CD11b/c+HIS48high, CD11bc-HIS48-, CD11bc+/HIS48- und CD3+ (Abb. 9 A–C). Die Sortierung der Leukozyten der Fremdkörperkapsel umfasste die folgenden Populationen: HIS48+CD4-, HIS48+CD4+, HIS48dimCD4+ und HIS48-CD4- (Abb. 9 D). Die Gates HIS48+CD4- und HIS48+CD4dim, die bei der durchflusszytometrischen Analyse getrennt voneinander betrachtet wurden, wurden für die Zellsortierung im Gate HIS48+CD4- zusammengefasst. Im Rahmen der Zellsortierung wurde die Zellzahl für die sortierten Proben vom Gerät erfasst und ausgegeben.

Die Zytozentrifugation diente zur Anreicherung von Zellen auf einem Objektträger für die nachfolgende Färbung und Differenzierung der Zellpopulationen. Dabei wurden die Zellen auf einen klar definierten Bereich des Objektträgers als Einzelzellschicht sedimentiert.

Für die Zytozentrifugation wurde die Anzahl der sortierten Zellen einer Probe auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml Phosphatpuffer eingestellt. Anschließend wurden 200 μ l der Zellsuspension einer Zellpopulation in die Probenkammer der Zytozentrifuge überführt und bei 500 min^{-1} für 5 min auf einen Objektträger zentrifugiert. Vor der histologischen Färbung wurden die Präparate luftgetrocknet.

Die Präparate wurden mittels HAEMA Schnellfärbung (Diff-Quick) nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Die morphologische Charakterisierung und Differenzierung der Zellen erfolgte bei 1000facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop mit Kamera. Die Fotografien der Zellen wurden mithilfe der Mikroskopie-Software AxioVision unter Angabe des Maßstabes angefertigt.

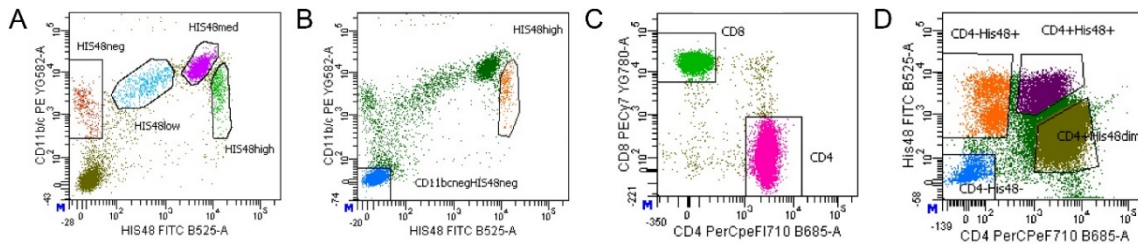


Abb. 9: Gates bei der Zellsortierung von Blut und Fremdkörperkapsel
A–C: Blut, D: Fremdkörperkapsel

3.4.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Um eine bakterielle Kontamination der Fremdkörperkapseln während der Implantation ausschließen zu können, wurde eine RTQ-PCR von Proben aus der Kapselumgebung durchgeführt. Es wurden subkutane und intramuskuläre Gewebeprobe von zwei Tieren je Zeitpunkt und Material untersucht (n = 72). Die Analyse der Daten der RTQ-PCR erfolgte mittels der relativen Quantifizierung.

Für die Untersuchung wurde das Gewebe homogenisiert und die im Gewebe vorhandene RNA isoliert. Darauf folgte eine unspezifische reverse Transkription der instabilen RNA in stabile, sogenannte kopierte Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Die anschließende RTQ-PCR mit einem bakterienspezifischen Primer und einem Primer für ein Referenzgen ermöglichte einen quantitativen Nachweis einer bakteriellen Kontamination. Als Positivkontrolle dienten Proben, die vor der Homogenisierung mit *Escherichia coli* kontaminiert wurden.

Homogenisierung und Isolierung der RNA

Zur Vorbereitung auf die Homogenisierung wurden die Gewebeprobe (50–100 mg) auf Trockeneis gelagert. Der Homogenisator, bestehend aus einem metallenen Töpfchen und einem passenden Stößel, wurde in einer Isolierwanne mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurden die Proben einzeln in das Töpfchen gegeben und mit dem Stößel zu einem Pulver zerstoßen. Für die Auflösung der Zellen und die Freisetzung der Nukleinsäuren wurde das Pulver in 1 ml TRIzol® Reagenz überführt. Nach kurzem Mischen der Proben wurde das Lysat für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben auf einem Vortex-Schüttler bis zur Ausbildung einer milchig homogenen Lösung gemischt. Es folgte eine erneute Inkubation der Proben für 10 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 15 min bei 11600 min⁻¹ und 4 °C. Die Zugabe von Chloroform und die nachfolgende Zentrifugation führte zur Auftrennung der Proben in drei Schichten: eine obere, farblose wässrige Phase (Nukleinsäuren), eine weiße Interphase und eine untere, rote Phenolphase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Erhöhung der RNA-Präzipitationsrate wurden die Proben mit 30 µg Glykogen versetzt. Nach dreimaligem Invertieren der Reaktionsgefäße wurden 500 µl Isopropanol zur Präzipitation der Nukleinsäuren hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben sechsmal invertiert. Die Isolierung der RNA erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA Plus Kit und wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden am NanoPhotometer® P360 bestimmt.

Reverse Transkription

Für die Umschreibung von RNA in einsträngige cDNA wurden 100 ng isolierte RNA je Probe eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, dabei wurde entsprechend den Protokollen des Herstellers vorgegangen.

Quantitative Echtzeit-PCR

Die extrahierte cDNA der Proben und der Positivkontrollen wurde als PCR-Matrize genutzt. Für die RTQ-PCR wurden zwei Primer von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) verwendet (Tab. 11). Der eingesetzte Bakterien-Primer basierte auf einer konservierten Nukleotidsequenz des Gens für die ribosomale RNA (rRNA) der 16S-Untereinheit von Prokaryonten (Maeda et al., 2003). Dieses Gen wird im Folgenden als Zielgen bezeichnet. Als Basis des zweiten Primers diente die Nukleotidsequenz des Gens für die rRNA der 18S-Untereinheit von Eukaryonten. Dieses ist nicht reguliert, wird also homogen exprimiert und wurde daher als Referenzgen bei der RTQ-PCR genutzt.

Für einen PCR-Ansatz wurden 20 µl Reaktionsvolumen auf eine 96-well Platte pipettiert. Ein Reaktionsansatz für die PCR bestand jeweils aus 2 µl cDNA-Lösung, 1 µl Vorwärts-Primer (3 pmol), 1 µl Rückwärts-Primer (3 pmol), 6 µl nukleasefreies Wasser und 10 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Der LightCycler® 480 SYBR Green I Master beinhaltet das Enzym FastStart Taq-DNA-Polymerase und den Farbstoff SYBR Green I. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet spezifisch an doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz steigt proportional zur Menge der DNA-Amplifikate an.

Für jede Probe wurden drei PCR-Ansätze hergestellt, wobei die Amplifikation des Zielgens und des Referenzgens in unterschiedlichen Wells erfolgte. Vor der Inkubation im Thermocycler (LightCycler® 480 II) wurde die Probenplatte für 2 min bei 3000 min⁻¹ zentrifugiert.

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm über insgesamt 90 min im Thermocycler durchgeführt: Die initiale DNA-Denaturierung und die Aktivierung der thermostabilen DNA-Polymerase fand bei 95 °C für 10 min statt. Es folgte ein Temperaturzyklus aus Primerhybridisierung bei 60 °C für 20 s, Elongation bei 72 °C für 30 s und DNA-Denaturierung bei 95 °C für 10 s. Dieser Zyklus wurde 40 mal wiederholt. Eine Fluoreszenzmessung erfolgte jeweils zum Ende der Elongation. Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve bei 65–97 °C mit einem Temperaturanstieg von 0,1 °C pro Sekunde und einer kontinuierlichen Fluoreszenzmessung erstellt. Am Ende der Reaktion wurde die Platte auf 40 °C abgekühlt.

Nach der RTQ-PCR erfolgte mithilfe der LightCycler® 480 Software eine Schmelzkurvenanalyse und eine Erfassung der *Ct*-Werte (engl. *cycle threshold*).

Die Analyse der Schmelzkurven diente zur Bestimmung der Spezifität der Amplifikate und ermöglichte einen Ausschluss von unspezifischen PCR-Produkten. Als *Ct*-Wert bezeichnet man den PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die unspezifische Hintergrundfluoreszenz der Probe übersteigt. Mithilfe des *Ct*-Wertes kann die im Ausgangsmaterial vorhandene cDNA-Menge von Ziel- und Referenzgenen in den verschiedenen Proben verglichen werden. Bei niedrigen *Ct*-Werten ist die Menge der cDNA in der Probe größer als bei höheren *Ct*-Werten. Es wurden folgende *Ct*-Werte erhoben: *Ct*(Zielgen, Probe), *Ct*(Referenzgen, Probe), *Ct*(Zielgen, Positivkontrolle) und *Ct*(Referenzgen, Positivkontrolle).

Tab. 11: Primernukleotidsequenzen

Primer	Sequenz
16S-rRNA (Zielgen)	Vorwärts 5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3'
	Rückwärts 5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3'
18S-rRNA (Referenzgen)	Vorwärts 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'
	Rückwärts 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

16S-rRNA = Gen für ribosomale Ribonukleinsäure der 16S-Untereinheit aller Prokaryonten

18S-rRNA = Gen für ribosomale Ribonukleinsäure der 18S-Untereinheit aller Eukaryonten

Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR

Zur Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes des Zielgens zwischen der Probe und der Positivkontrolle wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode angewendet (Livak und Schmittgen, 2001). Der relative Expressionsunterschied ist normalisiert auf das Referenzgen und relativiert zur Positivkontrolle. Relative Expressionsunterschiede größer 0,05 wurden als bakterielle Kontamination gewertet.

3.4.5 Bestimmung der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium

Die Bestimmung der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der Mg-Implantate diente zum Nachweis der Bioresorbierbarkeit des Materials und wurde für alle Implantate durchgeführt (n = 6 je Zeitpunkt und Implantatlokalisierung). Im Rahmen der Herstellung der Mg-Implantate wurde das Gewicht vor Implantation bestimmt und für jedes einzelne Implantat notiert.

Nach Abschluss der Tierversuche wurden die Korrosionsprodukte von der Oberfläche der Mg-Implantate durch eine Behandlung mit Chrom(VI)-oxid-Lösung nach dem folgenden Verfahren entfernt:

Zuerst wurden die Implantate einzeln in eine Küvette mit 5 ml Chrom(VI)-oxid-Lösung bei Raumtemperatur gegeben. Nach 10 min wurden die Implantate in der Küvette umgedreht und für weitere 10 min in Chrom(VI)-oxid-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Mg-Implantate unter leichtem Schwenken in einer Küvette mit destilliertem Wasser für 30 s gewaschen. Ein weiterer Waschschrift folgte in reinem Ethanol für 20 s unter leichtem Schwenken der Implantate. Nachfolgend wurden die Mg-Implantate unter einem Luftabzug für 24 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Implantate mithilfe einer Präzisionswaage gewogen.

Der Masseverlust der Implantate zwischen Implantation und Entnahme und die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit wurden mithilfe der folgenden Formeln berechnet:

- Masseverlust

$$\Delta m = \text{Masse (Implantation)} - \text{Masse (Entnahme)}$$

- *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit

$$CR = \frac{\Delta m}{A \cdot t \cdot \rho}$$

CR Korrosionsgeschwindigkeit (Maßeinheit $\frac{mm}{Jahr}$)

Δm Masseverlust

A Oberfläche des Implantates bei Implantation

t Expositionszeit

ρ Dichte von Magnesium ($1,74 \frac{g}{cm^3}$)

3.5 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mittels Microsoft® Excel. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 22.0 durchgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete statistische Modell wurde in Bezug auf seine Eignung durch das Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin geprüft.

3.5.1 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Für die Daten jeder Gruppe ($n = 6$) wurden Mittelwert, Median und Standardabweichung ermittelt. Alle Daten wurden zu Beginn auf Plausibilität geprüft. Wo klare Plausibilitätskriterien (siehe Anhang 10.3) nicht erfüllt waren, wurden Datenpunkte aus der Auswertung genommen. Die Darstellung der eingeschlossenen Daten erfolgte in Boxplots gruppiert nach den Materialien zu den verschiedenen Zeitpunkten. In den Boxplots wurden Ausreißer (o) und extreme Ausreißer (*) markiert. Bei der Fremdkörperkapsel wurden die beiden Implantationsorte der Materialien getrennt voneinander betrachtet.

Der Auswahl des statistischen Modells lagen folgende Tatsachen zugrunde: Die jeweilige Zellpopulation ist eine metrisch skalierte, abhängige Variable. Die beiden Faktoren Material und Zeitpunkt sind unabhängige, kategoriale Größen. Der Faktor Material besitzt drei Ausprägungen, bei dem Faktor Zeitpunkt werden sechs Faktorstufen unterschieden. Die durch die Faktoren gebildeten Gruppen sind unabhängig voneinander.

Das angewandte statistische Modell umfasste Analysen auf drei Ebenen: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), Post-hoc-Verfahren für paarweise Vergleiche und Bonferroni-Holm-Prozedur.

Für die zweifaktorielle ANOVA wurden die beiden Annahmen: Normalverteilung der Residuen über alle Messwerte und die Varianzgleichheit zwischen den Gruppen überprüft. Bei fehlender Normalverteilung wurde eine Transformation der Daten mittels Logarithmieren durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen für die beiden Faktoren Material und Zeitpunkt wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA bestimmt. Zudem wurde das Vorhandensein von signifikanten Interaktionen der beiden Faktoren untersucht.

Bei gegebener Signifikanz auf der Faktorebene wurden im Post-hoc-Verfahren paarweise Vergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den manuellen Paarvergleichen wurden signifikante Unterschiede zwischen zwei Materialien zu einem Zeitpunkt bzw. zwischen zwei ausgewählten Zeitpunkten innerhalb eines Materials untersucht. Die Auswahl der Zeitpunktvergleiche erfolgte in Anlehnung an die Phasen der FBR.

Zur Anpassung des Signifikanzniveaus aufgrund des multiplen Testens wurde anschließend getrennt für die Material- und Zeitpunktvergleiche eine Bonferroni-Holm-Prozedur durchgeführt.

Für die untersuchten Gewebe Blut, Milz und Fremdkörperkapsel wurde jeweils das gleiche statistische Modell zur Auswertung der Daten verwendet. Ein p -Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.5.1.1 Studieninterner Referenzbereich für Blut

Aus den präoperativen Blutproben aller Tiere wurde für die jeweilige Zellpopulation ein studieninterner Referenzbereich gebildet. Als Grenzen des studieninternen Referenzbereiches dienten das 2,5 %-Perzentil und das 97,5 %-Perzentil der Verteilung der jeweiligen Zellpopulation. Somit lagen die zentralen 95 % der präoperativ gemessenen Werte innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

3.5.1.2 Post-hoc-Verfahren für Blut und Milz

Im Post-hoc-Verfahren wurden die folgenden Zeitpunkte paarweise miteinander verglichen: Tag 1 und 3, Tag 1 und 7 sowie Tag 1 und 28. Zu allen Zeitpunkten wurden Materialgruppenvergleiche durchgeführt.

Bei der Bonferroni-Holm-Prozedur wurden für die Vergleiche der Zeitpunkte drei Gruppen berücksichtigt, bei den Materialvergleichen waren es ebenfalls drei Gruppen.

3.5.1.3 Post-hoc-Verfahren für die Fremdkörperkapsel

Im Post-hoc-Verfahren wurden die folgenden Zeitpunkte paarweise miteinander verglichen: Tag 1 und 3, Tag 1 und 7, Tag 1 und 14, Tag 1 und 28, Tag 3 und 7 sowie Tag 7 und 28. Zu allen Zeitpunkten wurden Materialgruppenvergleiche durchgeführt.

Bei der Bonferroni-Holm-Prozedur wurden für die Vergleiche der Zeitpunkte sechs Gruppen berücksichtigt, bei den Materialvergleichen waren es drei Gruppen.

3.5.1.4 In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben

Präoperative Blutproben

Aufgrund von Problemen bei der Probengewinnung (Tab. A9) mussten die Daten von 8 der 108 präoperativen Blutproben für die statistische Auswertung eliminiert werden.

Für die Bildung des studieninternen Referenzbereiches wurden somit n = 100 Blutproben eingeschlossen.

Finale Blutproben

Aufgrund von Problemen bei der Probengewinnung (Tab. A9) mussten die Daten von fünf finalen Blutproben für die statistische Auswertung eliminiert werden (Tab. 12).

Tab. 12: In die statistische Auswertung eingeschlossene finale Blutproben nach Anlegen der Plausibilitätskriterien

Implantat	Untersuchungszeitpunkt						Anzahl der Tiere
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Polyetheretherketon	n = 6	n = 4	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 34
Polystyrol	n = 6	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 6	n = 35
reines Magnesium	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 34
							n = 103

Milzproben

Aufgrund von Problemen bei der Probenaufarbeitung (Tab. A9) musste der Datensatz einer Milzprobe für die statistische Auswertung eliminiert werden (Tab. 13).

Tab. 13: In die statistische Auswertung eingeschlossene Milzproben nach Anlegen der Plausibilitätskriterien

Implantat	Untersuchungszeitpunkt						Anzahl der Tiere
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Polyetheretherketon	n = 6	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 6	n = 35
Polystyrol	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 36
reines Magnesium	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 36
							n = 107

Proben der subkutanen Fremdkörperkapsel

Aufgrund einer Kontamination mit lymphatischem Gewebe (Tab. A9) mussten die Daten von neun subkutanen Fremdkörperkapseln für die statistische Auswertung eliminiert werden (Tab. 14). Ein weiterer Datensatz stellte einen statistischen Ausreißer dar und wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab. 14: In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben der subkutanen Fremdkörperkapsel nach Anlegen der Plausibilitätskriterien

Implantat	Untersuchungszeitpunkt						Anzahl der Tiere
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Polyetheretherketon	n = 5	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 34
Polystyrol	n = 5	n = 6	n = 4	n = 6	n = 6	n = 5	n = 32
reines Magnesium	n = 5	n = 4	n = 6	n = 6	n = 5	n = 6	n = 32
							n = 98

Proben der intramuskulären Fremdkörperkapsel

Aufgrund von Problemen bei der Probengewinnung und -aufarbeitung (Tab. A9) mussten die Daten von zwei intramuskulären Fremdkörperkapseln für die statistische Auswertung eliminiert werden (Tab. 15). Ein weiterer Datensatz stellte einen statistischen Ausreißer dar und wurde von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab. 15: In die statistische Auswertung eingeschlossene Proben der intramuskulären Fremdkörperkapsel nach Anlegen der Plausibilitätskriterien

Implantat	Untersuchungszeitpunkt						Anzahl der Tiere
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Polyetheretherketon	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 35
Polystyrol	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 35
reines Magnesium	n = 6	n = 5	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 35
							n = 105

3.5.2 Statistische Auswertung der Korrosionsdaten

Für die Daten jeder Gruppe (n = 6) wurden Mittelwert, Median und Standardabweichung ermittelt. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden paarweise Vergleiche zwischen den folgenden Zeitpunkten für einen Implantationsort durchgeführt: Tag 1 und 3, Tag 1 und 7, Tag 1 und 14, Tag 1 und 21 sowie Tag 1 und 28. Für Vergleiche zwischen den beiden Lokalisationen zu jedem Zeitpunkt wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Zur Anpassung des Signifikanzniveaus aufgrund des multiplen Testens wurde anschließend für die Zeitpunktvergleiche eine Bonferroni-Holm-Prozedur durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Befunde

Der chirurgische Eingriff wurde von den Ratten unter der angewendeten Allgemeinanästhesie gut toleriert. Alle Implantationen wurden in komplikationsloser Allgemeinanästhesie durchgeführt, von der sich die Tiere rasch erholten. Das klinische Allgemeinbefinden der Tiere konnte in den ersten drei postoperativen Tagen entsprechend dem angewendeten Scoring mit einer Punktzahl von 0 bis 1 Punkten bewertet werden. Die nachfolgenden wöchentlichen Scorings ergaben jeweils eine Punktzahl von 0. Zu keinem Zeitpunkt war eine zusätzliche medikamentöse Therapie oder ein Abbruch des Versuches notwendig.

Das Verhalten der Ratten war nach der Implantation unauffällig. Die Futter- und Wasseraufnahme war ungestört. Die Tiere bewegten sich frei im Käfig und zeigten nur vereinzelt ein gestäubtes Haarkleid. Die Wundheilung verlief komplikationslos. Postoperativ wiesen die Tiere eine konstante oder eine gestiegene Körpermasse auf. Der Allgemeinzustand der Ratten war zu allen untersuchten Zeitpunkten gut.

4.2 Makroskopische Befunde

Nach Implantation von Mg konnten keine von außen sichtbaren Gasansammlungen im Bereich der Skapula und der lumbosakralen Wirbelsäule beobachtet werden.

Bei den subkutanen Implantaten aller drei Materialien fiel mehrheitlich eine Abweichung der Lage im Vergleich zum ursprünglichen Implantationsort auf. Die Implantate waren hauptsächlich nach kranial oder lateral gewandert und befanden sich weiterhin im Subkutangewebe. Gelegentlich wurden die Implantate axillär oder zervikal aufgefunden. Die Präparation und Entnahme der Fremdkörperkapseln an Tag 1 und 3 nach Implantation von PEEK, PS und Mg gestaltete sich vor allem zu Beginn der Pilotstudie schwierig, da nur eine dünne Fremdkörperkapsel vorhanden war und diese sich nur schwer vom Umgebungsgewebe abgrenzen ließ.

Während der Entnahme der Mg-Implantate waren in der Implantatumgebung kleine Gasbläschen bis zu einem Durchmesser von 2 mm sichtbar (Abb. 10 A). Die Fremdkörperkapsel lag dem Implantat direkt an. Die Ausbildung der Gasbläschen nahm von Tag 1 zu 28 ab.

Die folgenden makroskopischen Befunde traten bei den drei Implantatmaterialien PEEK, PS und Mg gleichermaßen auf: Die Ausprägung der Fremdkörperkapseln wies keine makroskopisch sichtbaren Unterschiede im Materialvergleich zu den jeweiligen Zeitpunkten auf. Das Umgebungsgewebe war an den Tagen 1 und 3 ödematös verändert. Mit zunehmender Implantationsdauer wurde eine Abnahme der Ödematisierung und eine Zunahme der Kapselstabilität beobachtet. Zudem waren an den Tagen 1 und 3 im Bereich der Implantationsinzisionen unterschiedlich starke Blutansammlungen sichtbar (Abb. 10 B). Ab dem dritten Tag nach Implantation wurde eine Vaskularisierung der Fremdkörperkapseln festgestellt (Abb. 10 C).

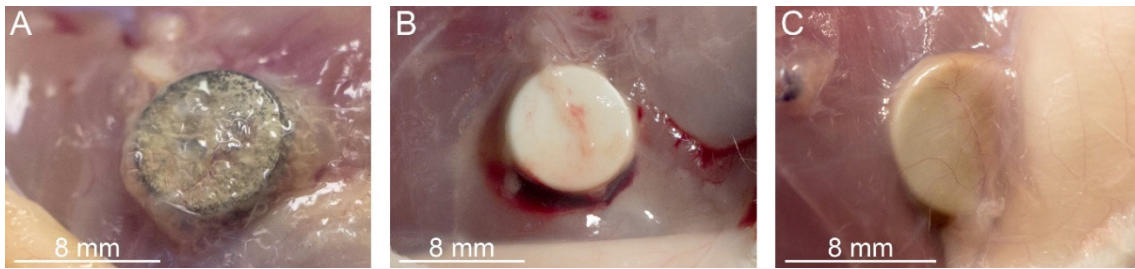


Abb. 10: Makroskopische Befunde an der subkutanen Fremdkörperkapsel
 A: Gasansammlung bei reinem Magnesium am 3. postoperativen Tag, B: Blutansammlung bei Polystyrol am 1. postoperativen Tag, C: Vaskularisierung der Fremdkörperkapsel bei Polyetheretherketon am 14. postoperativen Tag

4.3 Morphologische Charakterisierung der Leukozyten im Blut

Die Morphologie der aufgefundenen Leukozytenpopulationen im Blut wurde anhand der Lage der Zellpopulationen im FSC/SSC-Diagramm sowie anhand der mikroskopischen Untersuchung der sortierten und gefärbten Zellen beurteilt (Abb. 11).

Die CD3-CD11b/c+HIS48low Zellen (Abb. 11 A) wiesen eine geringere Granularität bei vergleichbarer Zellgröße zu den in Abb. 11 B dargestellten Zellen auf. In der Diff-Quick-Färbung besaßen die Zellen einen großen, violetten, bohnenförmigen Kern und ein blaugraues Zytoplasma. Morphologisch konnten die Zellen als Monozyten charakterisiert werden.

Die CD3-CD11b/c+HIS48med Zellen (Abb. 11 B) zeigten die höchste Granularität im FSC/SSC-Diagramm. Die Diff-Quick-gefärbten Zellen wiesen einen blauvioletten Zellkern und ein schwach rosa gefärbtes Zytoplasma auf. Die rundlichen Zellen zeichneten sich durch einen segmentierten Zellkern und feine, zytoplasmatische Granula aus. Mithilfe der Streulicht-Parameter und der mikroskopischen Untersuchung konnten die Zellen als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.

Innerhalb der CD3-CD11b/c+HIS48high Population konnten zwei Zelltypen identifiziert werden (Abb. 11 C). Der dominierende Zelltyp zeichnete sich durch einen großen, bohnenförmigen Zellkern und eine unregelmäßig geformte Zellmembran aus. Diese Zellen wiesen die gleichen Färbekarakteristika wie die CD3-CD11b/c+HIS48low Zellen auf, jedoch waren sie im FSC/SSC-Diagramm größer und granulärer im Vergleich zu den HIS48low Zellen. Bei diesen Zellen handelte es sich um aktivierte Monozyten. Einzelne neutrophile Granulozyten stellten den zweiten Zelltyp innerhalb der HIS48high Population dar.

Die CD3-CD11b/c-HIS48- Zellen (Abb. 11 D) zeigten die geringste Granularität und Zellgröße im FSC/SSC-Diagramm. In der Diff-Quick-Färbung waren die kleinen Zellen durch einen runden, blauvioletten Zellkern und einen schmalen, hellblauen Zytoplasmasaum gekennzeichnet. Unter Beachtung der Antigenexpression und der morphologischen Parameter konnte die Zellpopulation als B-Lymphozyten charakterisiert werden.

Die CD3-CD11b/c+HIS48- Zellen (Abb. 11 E) wiesen die gleichen Streulicht-Charakteristika wie die CD3-CD11b/c+HIS48low Zellen auf. Die gefärbten Zellen zeichneten sich durch einen blauvioletten, großen Zellkern und ein blaugraues, weites Zytoplasma

aus, welches mit zahlreichen, rotviolettten Granula angefüllt war. Mithilfe der Streulicht-Parameter und der mikroskopischen Untersuchung konnten die Zellen als NK-Zellen identifiziert werden.

Die CD3+ Zellen (Abb. 11 F) beinhalteten zwei sortierte Zellpopulationen: CD3+CD4+ und CD3+CD8a+. Beide Zellpopulationen konnten mikroskopisch nicht voneinander unterschieden werden. Die Zellen wiesen die gleichen Färbecharakteristika und die gleichen Streulicht-Eigenschaften wie die CD3-CD11b/c-HIS48- Zellen auf. Bei diesen Zellen handelte es sich um T-Lymphozyten.

Das mikroskopische Bild der sortierten Zellpopulationen stimmt mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse überein.

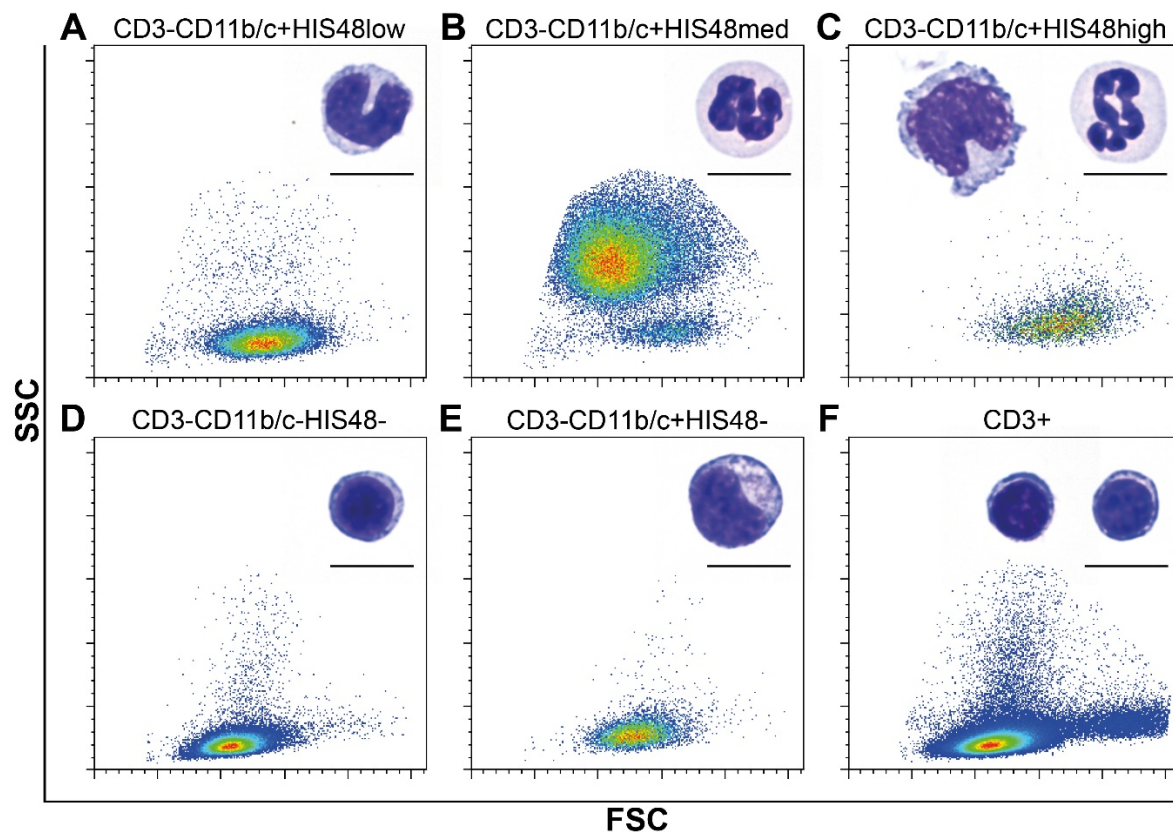


Abb. 11: Morphologische Charakterisierung der Blutleukozyten mittels Durchflusszytometrie sowie Zellsortierung und histologischer Färbung

A: Monozyten, B: neutrophile Granulozyten, C: aktivierte Monozyten und einzelne neutrophile Granulozyten, D: B-Lymphozyten, E: natürliche Killerzellen, F: T-Lymphozyten, die Länge des Maßstab-balkens entspricht jeweils 10 μm

4.4 Morphologische Charakterisierung der Leukozyten in der Fremdkörperkapsel

Die Morphologie der aufgefundenen Populationen innerhalb der CD3-negativen Nicht-T-Lymphozyten in der Fremdkörperkapsel wurde anhand der mikroskopischen Untersuchung der sortierten und gefärbten Zellen beurteilt (Abb. 12 A).

Innerhalb des Gates HIS48+CD4⁻ konnten drei verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden (Abb. 12 B). Eine Zellpopulation wies einen blauvioletten, gelappten Zellkern und ein schwach rosa gefärbtes Zytoplasma mit feinen Granula auf. Diese morphologischen Eigenschaften sind charakteristisch für neutrophile Granulozyten. Neben den Neutrophilen konnten eosinophile Granulozyten identifiziert werden. Die Eosinophilen zeichneten sich durch einen segmentierten bis bandförmigen, blauvioletten Zellkern und ein blaues Zytoplasma aus, welches mit zahlreichen, roten Granula angefüllt war. Die Zellen der dritten Population besaßen einen violetten, bohnenförmigen bis vielgestaltigen Kern und ein blaugraues Zytoplasma. Diese Zellen konnten als Monozyten/Makrophagen charakterisiert werden.

Im Gate HIS48+CD4⁺ wurden Zellen verschiedener Morphologie aufgefunden (Abb. 12 C). Die Zellen besaßen eine unterschiedliche Größe, der Zellkern war bohnenförmig bis oval. Mit zunehmender Zellgröße wiesen die Zellen einen höheren Anteil an Zytoplasma auf, zeigten eine Mehrkernigkeit und eine unregelmäßige Oberfläche. Das Zytoplasma war fein granuliert oder vakuolisiert. Die Zellen wiesen die gleichen Farbecharakteristika wie die Monozyten im Gate HIS48+CD4⁻ auf. Die eingegrenzte Zellpopulation bestand aus Monozyten sowie ein- und mehrkernigen Makrophagen.

Die Zellen des Gates HIS48-CD4⁻ präsentierten sich bei der mikroskopischen Untersuchung vielgestaltig (Abb. 12 D). Innerhalb der HIS48-CD4⁻ Zellen konnten vier Zellpopulationen unterschieden werden. Eine Zellpopulation zeichnete sich durch einen blauvioletten, runden bis ovalen Zellkern und ein blaugraues, weites Zytoplasma aus, welches mit zahlreichen, violetten Granula angefüllt war. Morphologisch konnten die Zellen als Mastzellen charakterisiert werden.

Zudem wurden einzelne Zellen aufgefunden, die lange, zytoplasmatische Zellfortsätze und einen blauvioletten, bohnenförmigen Zellkern besaßen. Diese Zellausläufer sind charakteristisch für dendritische Zellen.

Kleine Zellen mit einem runden, blauvioletten Zellkern und einen schmalen, hellblauen Zytoplasmasaum stellten die dritte Zellpopulation innerhalb der HIS48-CD4⁻ Zellen dar. Unter Beachtung der Antigenexpression und der morphologischen Parameter handelte es sich um B-Lymphozyten.

Die Zellen der vierten Zellpopulation waren durch einen blauvioletten, bohnenförmigen Zellkern und ein blaugraues Zytoplasma mit rotvioletten Granula gekennzeichnet. Diese Zellen waren NK-Zellen.

Die Zellen im Gate HIS48dimCD4⁺ besaßen einen oder bis zu 13 blauviolette, ovale Zellkerne mit blaugrauem, vakuolisiertem Zytoplasma und einer unregelmäßigen Zelloberfläche (Abb. 12 E). Die Größe der gefärbten und sortierten Zellen betrug bis zu 40 µm. Unter Beachtung der morphologischen Parameter konnten die Zellen als ein- und mehrkernige Makrophagen identifiziert werden.

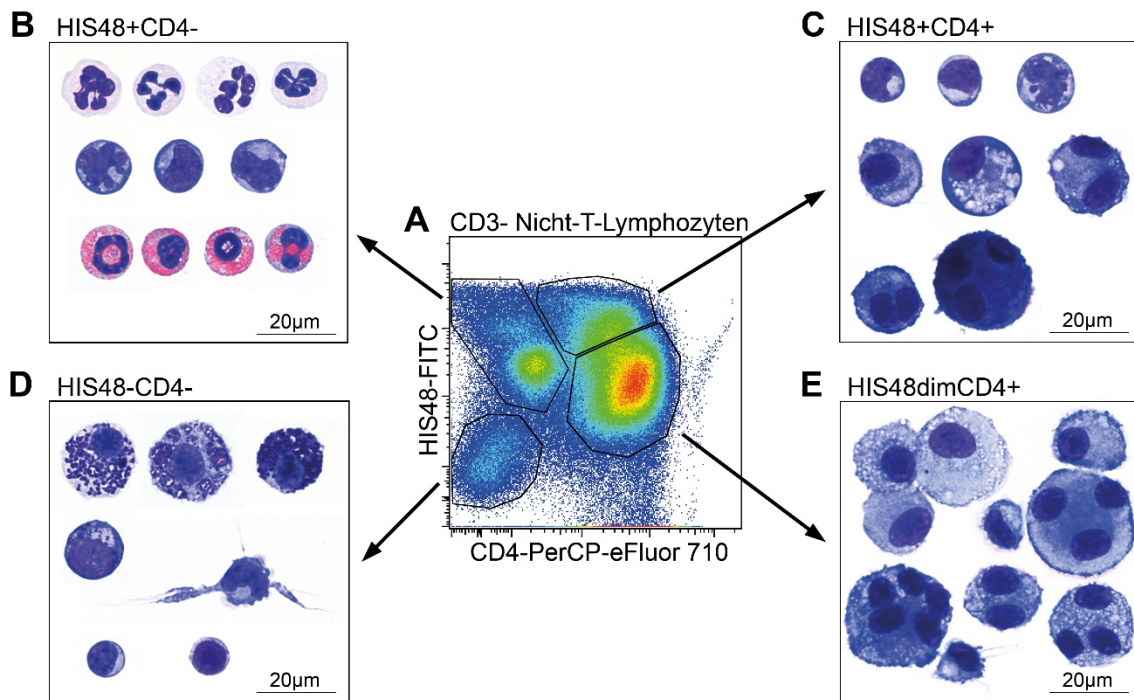


Abb. 12: Morphologische Charakterisierung der Nicht-T-Lymphozyten in der Fremdkörperkapsel mittels Durchflusszytometrie sowie Zellsortierung und histologischer Färbung
 A: durchflusszytometrischer Plot der Nicht-T-Lymphozyten und Gating entsprechend der Zellsortierung, B: neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, eosinophile Granulozyten, C: Monozyten, ein- und mehrkernige Makrophagen, D: Mastzellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten, E: ein- und mehrkernige Makrophagen

4.5 Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression

Als Ergebnis der morphologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen ließen sich anhand der Streulichtparameter, der lichtmikroskopischen Untersuchung sowie der Antigenexpression der Zellen verschiedene Zellpopulationen im Blut bzw. in der Milz (Tab. 16) und im Gewebe der Fremdkörperkapsel (Tab. 17) definieren.

Der verwendete Antikörper Anti-Mouse CD117 (c-Kit) APC-eFluor 780 erzielte bei der durchflusszytometrischen Analyse keine spezifischen Färbeergebnisse und wurde im Rahmen der Auswertung nicht betrachtet.

Tab. 16: Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression in Blut und Milz

Oberflächenmarker	Zellpopulation
CD3+CD4+	T-Helferzellen ^{1,2}
CD3+CD8a+	zytotoxische T-Zellen ^{1,2}
CD3-CD11b/c+HIS48low	Monozyten ^{1,2} /Makrophagen ²
CD3-CD11b/c+HIS48med	neutrophile Granulozyten ^{1,2}
CD3-CD11b/c+HIS48high	aktivierte Monozyten ^{1,2} /Makrophagen ² und einzelne neutrophile Granulozyten ^{1,2}
CD3-CD11b/c-HIS48-	B-Lymphozyten ^{1,2}
CD3-CD11b/c+HIS48-	natürliche Killerzellen ^{1,2} und dendritische Zellen ²

¹ im Blut, ² in der Milz

Tab. 17: Zellpopulationen nach Morphologie und Antigenexpression in der Fremdkörperkapsel

Oberflächenmarker	Zellpopulation (Subpopulation)
CD3+CD4+	T-Helferzellen
CD3+CD8a+	zytotoxische T-Zellen
CD3-HIS48+CD4-SSChigh	neutrophile Granulozyten
CD3-HIS48+CD4-SSClow	CD4-negative Monozyten/Makrophagen
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh	eosinophile Granulozyten
CD3-HIS48+CD4+	frühe Monozyten/Makrophagen
CD8a+	(zytotoxischer Phänotyp)
HIS36+	(gewebeständige Makrophagen)
CD3-HIS48dimCD4+	späte ein- und mehrkernige Makrophagen
CD8a+	(zytotoxischer Phänotyp)
HIS36+	(gewebeständige Makrophagen)
CD3-HIS48-CD4-CD8a+	Mastzellen, natürliche Killerzellen
CD3-HIS48-CD4-CD8a-	nicht spezifisch gefärbte Leukozyten (B-Lymphozyten, dendritische Zellen)

4.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen im Blut

Zusammenfassend konnten die typischen Zellpopulationen der peripheren Blutleukozyten im untersuchten Zeitraum identifiziert und quantifiziert werden. Im zeitlichen Verlauf traten bei allen Zellpopulationen – mit Ausnahme der absoluten Zellzahl der lebenden Leukozyten sowie der prozentualen Anteile der zytotoxischen T-Zellen und der NK-Zellen an den lebenden Leukozyten – signifikante Unterschiede auf. Zwischen den Materialien PEEK, PS und Mg konnten zu den untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede aufgefunden werden. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse für die

lebenden Leukozyten im Blut und deren Subpopulationen bei Implantatentnahme befanden sich mehrheitlich innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

Aus den entnommenen präoperativen und finalen Blutproben konnte eine vitale Einzelzellsuspension gewonnen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht werden. Anhand der präoperativen Blutproben wurde für jede untersuchte Zellpopulation ein studieninterner Referenzbereich gebildet (n = 100, siehe Kapitel 3.5.1.1).

Im statistischen Modell waren die Residuen annähernd normalverteilt. Es wurden gleiche Varianzen beobachtet. Auf der Ebene der zweifaktoriellen ANOVA gab es signifikante Unterschiede über die Zeit bei allen untersuchten Zellpopulationen außer den zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (Tab. 18). Das Material hatte auf den Anteil der zytotoxischen T-Zellen und auf den Anteil der Monozyten an den lebenden Leukozyten einen signifikanten Einfluss. Eine Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren Material und Zeitpunkt konnte nur für den prozentualen Anteil der zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden.

Tab. 18: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellpopulationen im Blut

Zellpopulation (jeweils n = 103)	Zweifaktorielle ANOVA		
	p-Wert für Material	p-Wert für Zeitpunkt	p-Wert für Interaktion Material / Zeitpunkt
lebende Leukozyten/ μ l Vollblut	n. s.	<0,001	n. s.
CD3+CD4 ⁺	n. s.	0,001	n. s.
CD3+CD8a ⁺	0,022	n. s.	0,015
CD3-CD11b/c+HIS48low ¹	0,002	0,021	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48med ¹	n. s.	0,007	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48high ¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-CD11b/c-HIS48 ⁻¹	n. s.	<0,001	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Im Folgenden werden bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene die Ergebnisse der Post-hoc-Tests mit anschließender Bonferroni-Holm-Prozedur betrachtet. Aus Gründen der Übersicht sind die signifikanten p-Werte der Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche im Anhang aufgeführt (Tab. A10 und Tab. A11).

4.6.1 Lebende Leukozyten

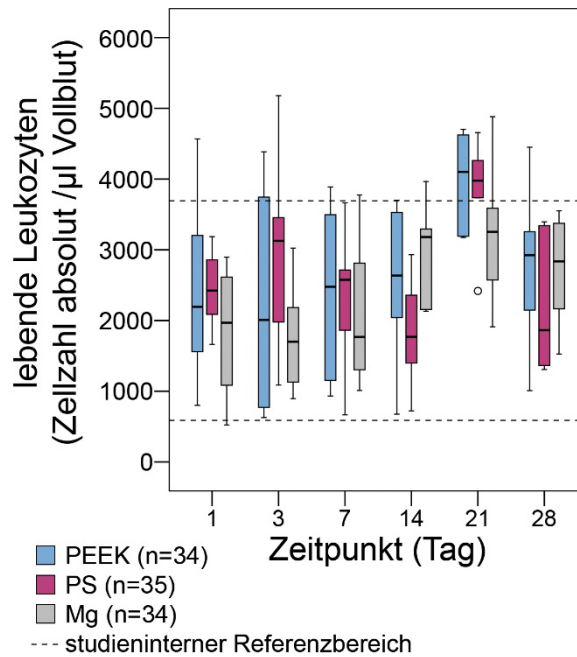


Abb. 13: Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten im Blut
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 12, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A10 und Tab. A11

Nach Implantation der Materialien PEEK, PS und Mg wurden für die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten im Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen den ausgewählten Zeitpunkten aufgefunden (Abb. 13).

Die Zellzahl der lebenden Leukozyten aller Materialien befand sich zu den untersuchten Zeitpunkten außer an Tag 21 für die Materialien PEEK und PS innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

4.6.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

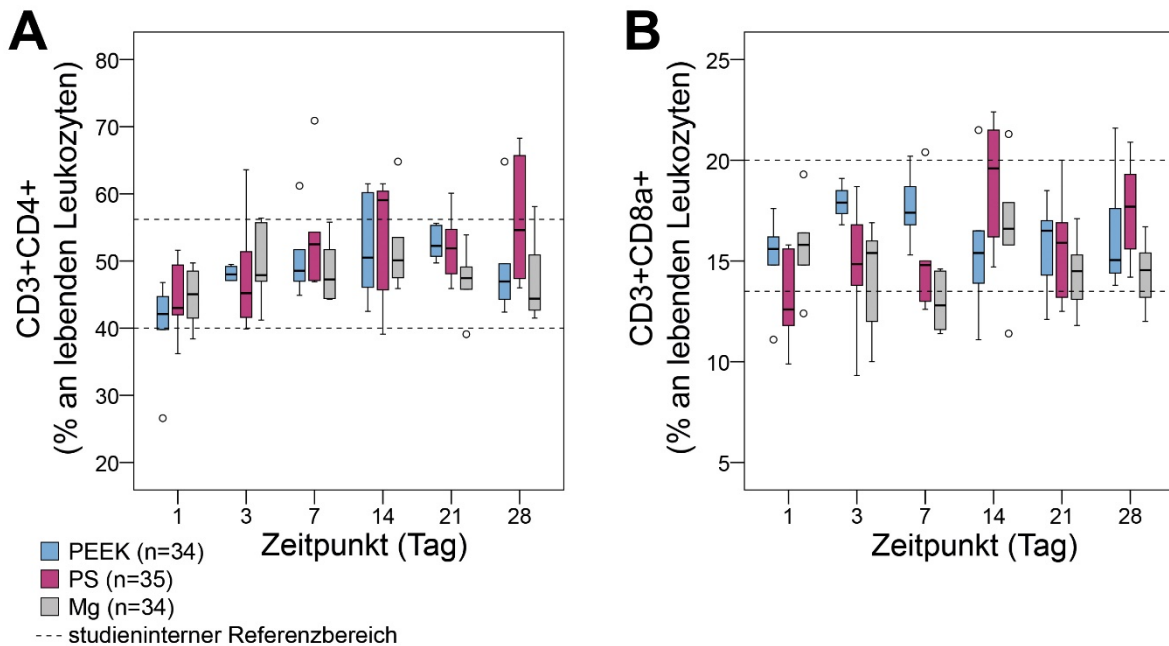


Abb. 14: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+, A) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+, B) an den lebenden Leukozyten im Blut
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 12, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A10 und Tab. A11

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an den lebenden Leukozyten im Blut stieg nach der Implantation von PEEK zwischen den Tagen 1 und 3 sowie 1 und 7 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 14 A). Bei den Materialien PS und Mg konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten beobachtet werden.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 7 ergab für PEEK einen signifikant höheren prozentualen Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten im Blut als für Mg ($p = 0,002$) (Abb. 14 B).

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen an den lebenden Leukozyten aller Materialien befand sich zu den untersuchten Zeitpunkten mehrheitlich innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

4.6.3 Monozyten und neutrophile Granulozyten

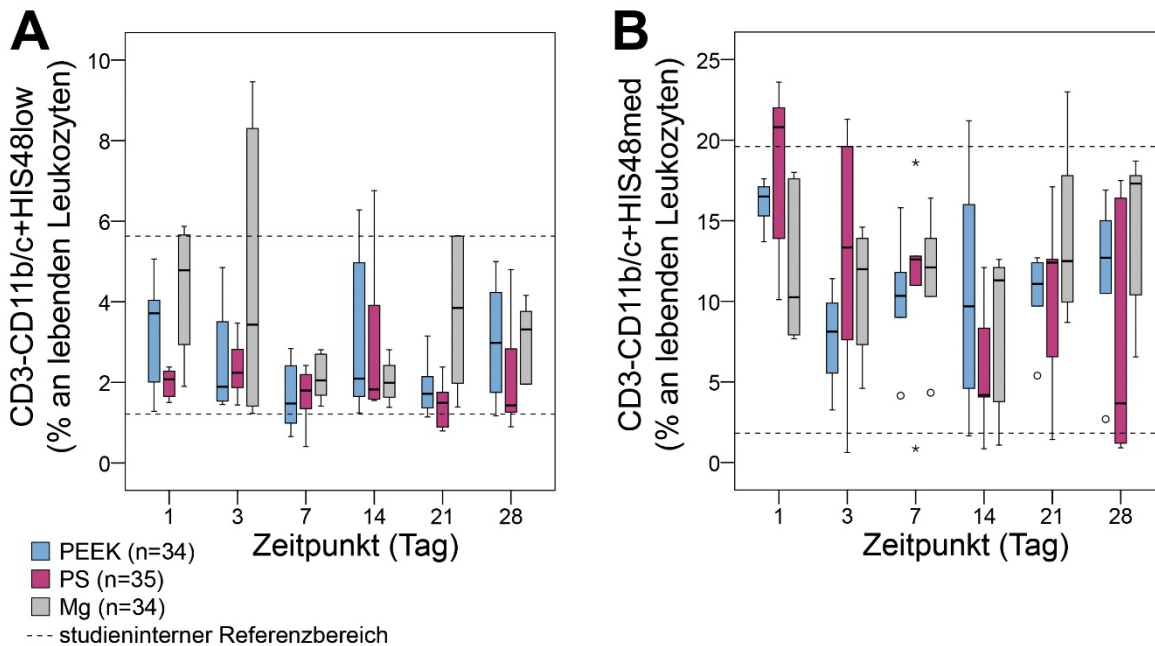


Abb. 15: Prozentualer Anteil der Monozyten (CD3-CD11b/c+HIS48low, A) und der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med, B) an den lebenden Leukozyten im Blut
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 12, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A10 und Tab. A11

Der prozentuale Anteil der Monozyten (CD3-CD11b/c+HIS48low) an den lebenden Leukozyten im Blut verringerte sich für das Material Mg zwischen Tag 1 und 7 signifikant ($p = 0,015$) (Abb. 15 A). Die Zeitpunktvergleiche für PEEK und PS ergaben keine signifikanten Unterschiede.

An Tag 1 nach der Implantation induzierte Mg einen signifikant höheren Anteil der Monozyten an den lebenden Leukozyten als PS ($p = 0,015$).

Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med) an den lebenden Leukozyten im Blut nahm für das Material PEEK zwischen den Tagen 1 und 3, 1 und 7 sowie 1 und 28 signifikant ab ($p \leq 0,05$) (Abb. 15 B). Bei den Materialien PS und Mg wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten beobachtet.

Nach Implantation der Materialien PEEK, PS und Mg befand sich der prozentuale Anteil der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten zu den untersuchten Zeitpunkten mehrheitlich innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

4.6.4 Aktivierte Monozyten

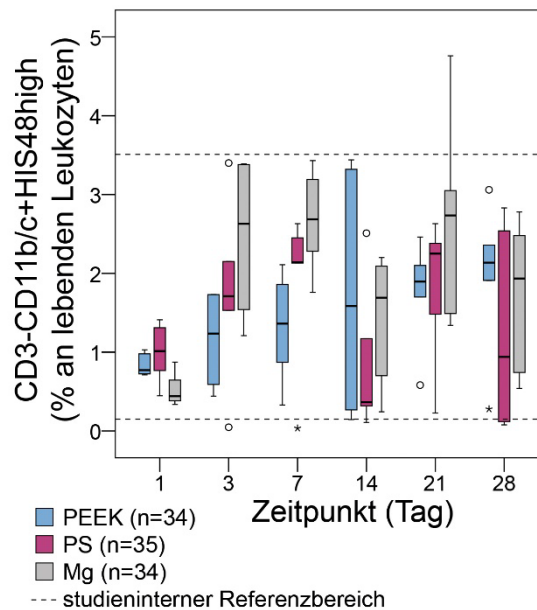


Abb. 16: Prozentualer Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten im Blut PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 12, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A10 und Tab. A11

Der prozentuale Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten im Blut stieg für das Material Mg zwischen den Tagen 1 und 3 sowie 1 und 7 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 16). Die Zeitpunktvergleiche für PEEK und PS ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Nach Implantation der Materialien PEEK, PS und Mg befand sich der prozentuale Anteil der Zellpopulation zu den untersuchten Zeitpunkten mehrheitlich innerhalb des studieninternen Referenzbereiches.

4.6.5 B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen

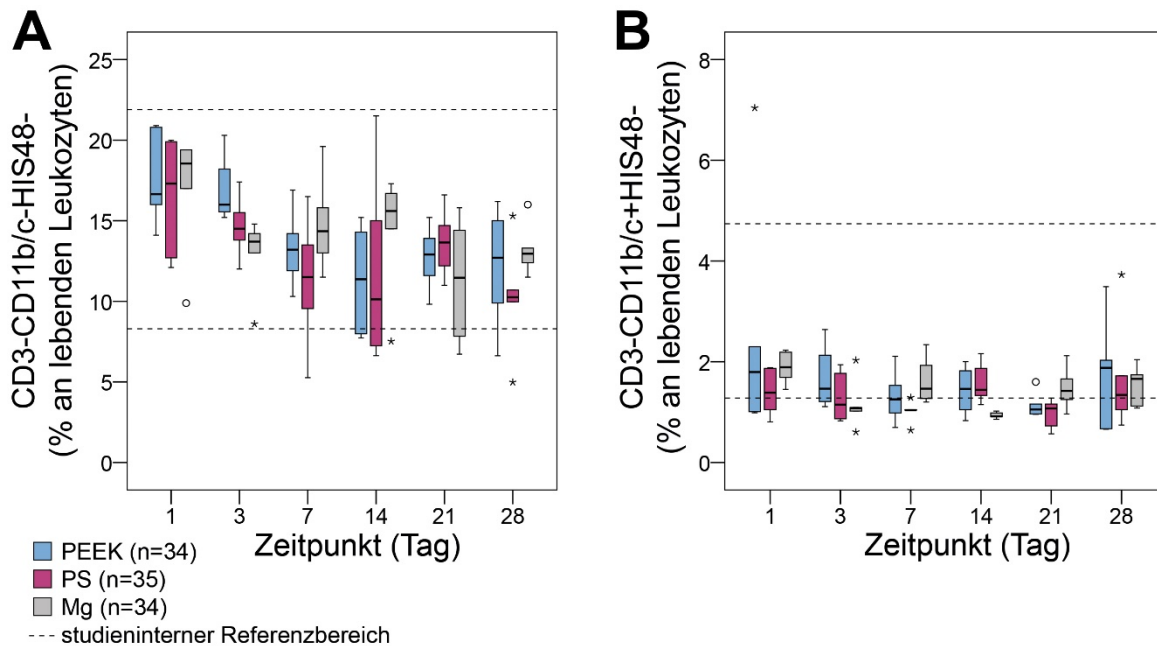


Abb. 17: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-, A) und der natürlichen Killerzellen (CD3-CD11b/c+HIS48-, B) an den lebenden Leukozyten im Blut
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 12, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A10 und Tab. A11

Die Zeitpunktvergleiche für den prozentualen Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-) an den lebenden Leukozyten im Blut ergaben für alle Materialien eine Abnahme über die Zeit (Abb. 17 A). Zwischen Tag 1 und 28 verringerte sich der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten bei PS signifikant ($p = 0,009$). Nach Implantation von PEEK und Mg konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden.

Der prozentuale Anteil der NK-Zellen (CD3-CD11b/c+HIS48-) an den lebenden Leukozyten im Blut zeigte für alle Materialien einen stabilen Verlauf über die Zeit (Abb. 17 B).

Nach Implantation der Materialien PEEK, PS und Mg befand sich der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten zu den untersuchten Zeitpunkten mehrheitlich innerhalb des studieninternen Referenzbereiches. Der prozentuale Anteil der NK-Zellen aller Materialien lag zu den gewählten Zeitpunkten an der unteren Grenze des studieninternen Referenzbereiches.

4.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen in der Milz

Zusammenfassend konnten die typischen Zellpopulationen der Leukozyten in der Milz im zeitlichen Verlauf identifiziert und quantifiziert werden. Nach der Implantation von PEEK, PS und Mg zeigte sich während der akuten Entzündungsreaktion eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils der aktivierten Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten in der Milz. Im Trend gab es zwischen den Materialgruppen zu den untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede.

Aus den entnommenen Milzen ($n = 108$) konnte eine vitale Einzelzellsuspension gewonnen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht werden.

Im statistischen Modell waren die Residuen annähernd normalverteilt. Es wurden relativ ungleiche Varianzen beobachtet. Auf der Ebene der zweifaktoriellen ANOVA gab es signifikante Unterschiede über die Zeit bei allen untersuchten Zellpopulationen außer den neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med) (Tab. 19). Das Material hatte nur auf den prozentualen Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der Milz einen signifikanten Einfluss. Es wurden keine Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren Material und Zeitpunkt beobachtet.

Tab. 19: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellpopulationen in der Milz

Zellpopulation (jeweils $n = 107$)	Zweifaktorielle ANOVA		
	p-Wert für Material	p-Wert für Zeitpunkt	p-Wert für Interaktion Material / Zeitpunkt
lebende Leukozyten/ Milz	n. s.	<0,001	n. s.
CD3+CD4 ⁺¹	0,028	<0,001	n. s.
CD3+CD8a ⁺¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48low ¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48med ¹	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48high ¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-CD11b/c+HIS48 ⁻¹	n. s.	0,011	n. s.
CD3-CD11b/c-HIS48 ⁻¹	n. s.	<0,001	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Im Folgenden werden bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene die Ergebnisse der Post-hoc-Tests mit anschließender Bonferroni-Holm-Prozedur betrachtet. Aus Gründen der Übersicht sind die signifikanten p-Werte der Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche im Anhang aufgeführt (Tab. A12 und Tab. A13).

4.7.1 Lebende Leukozyten

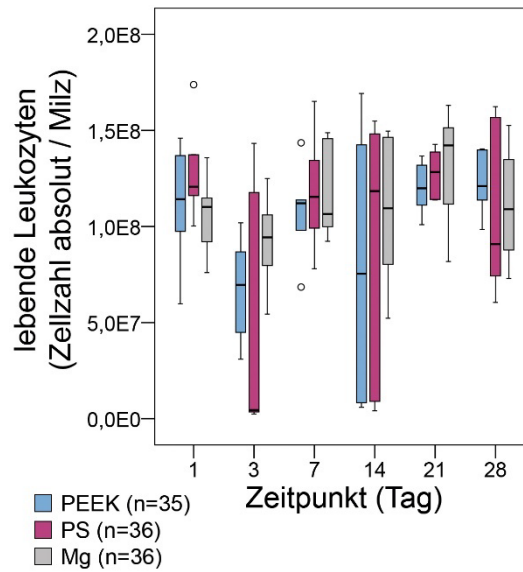


Abb. 18: Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der Milz
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 13, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A12 und Tab. A13

Die Zeitpunktvorgleiche für die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der Milz ergaben für alle Materialien keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitpunkten (Abb. 18).

4.7.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

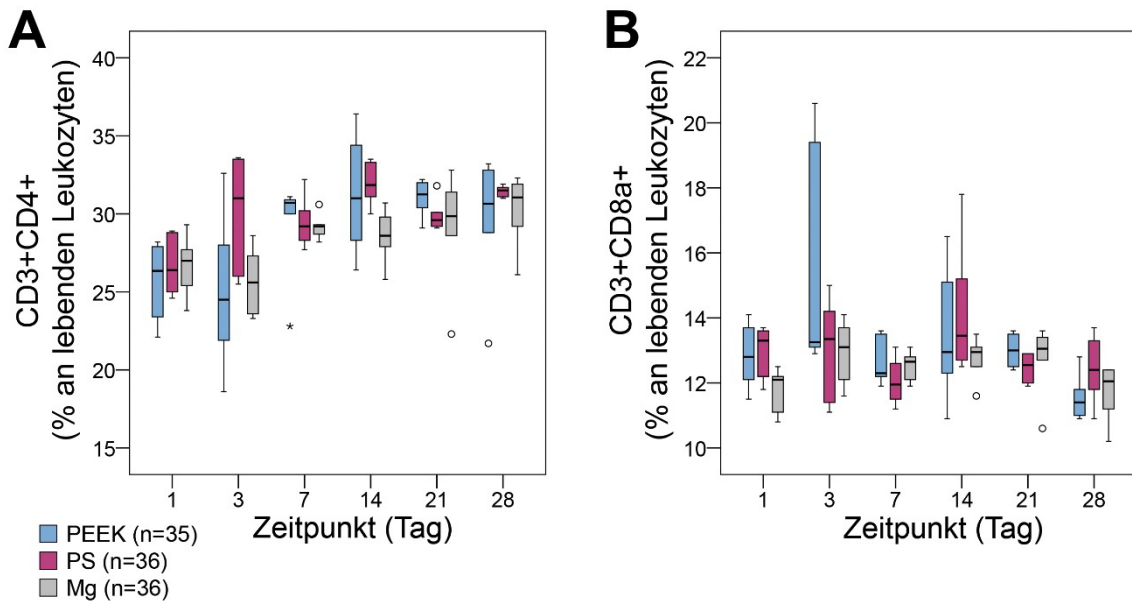


Abb. 19: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+, A) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+, B) an den lebenden Leukozyten in der Milz
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 13, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A12 und Tab. A13

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der Milz zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit (Abb. 19 A). Zwischen Tag 1 und 28 nahm der Anteil der T-Helferzellen bei PS signifikant zu ($p = 0,002$). Nach Implantation von PEEK und Mg konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten beobachtet werden.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 14 ergab für Mg einen signifikant geringeren Anteil der T-Helferzellen als für PS ($p = 0,004$).

Für den prozentualen Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der Milz wurden bei allen Materialien keine signifikanten Unterschiede zwischen den ausgewählten Zeitpunkten aufgefunden (Abb. 19 B).

4.7.3 Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten

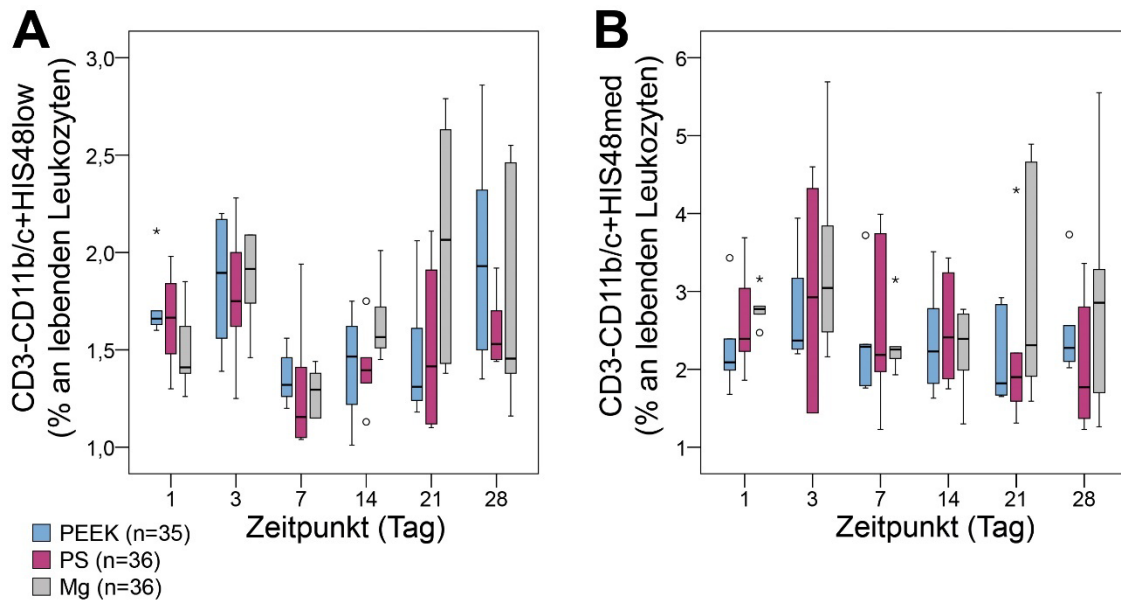


Abb. 20: Prozentualer Anteil der Monozyten/Makrophagen (CD3-CD11b/c+HIS48low, A) und der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med, B) an den lebenden Leukozyten in der Milz PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 13, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A12 und Tab. A13

Der prozentuale Anteil der Monozyten/Makrophagen (CD3-CD11b/c+HIS48low) an den lebenden Leukozyten in der Milz stieg für das Material Mg zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p = 0,015$) (Abb. 20 A). Nach Implantation von PEEK wurde eine signifikante Abnahme des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 1 und 7 beobachtet ($p = 0,004$). Die Zeitpunktvorgleiche für PS ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48med) an den lebenden Leukozyten in der Milz zeigte für alle Materialien einen stabilen Verlauf über die Zeit (Abb. 20 B).

4.7.4 Aktivierte Monozyten/Makrophagen

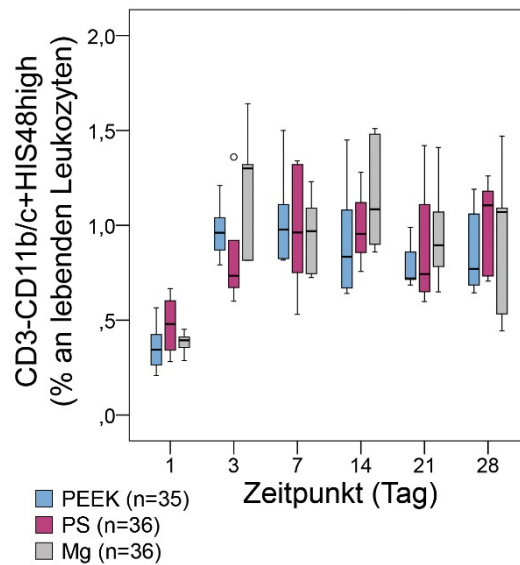


Abb. 21: Prozentualer Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten/Makrophagen und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten in der Milz

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 13, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A12 und Tab. A13

Der prozentuale Anteil der gemischten Population aus aktivierten Monozyten/Makrophagen und einzelnen neutrophilen Granulozyten (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten in der Milz stieg für alle Materialien zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 21). Anschließend wies der Anteil der Zellpopulation für die drei Materialien einen stabilen Verlauf über die Zeit auf.

4.7.5 B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen

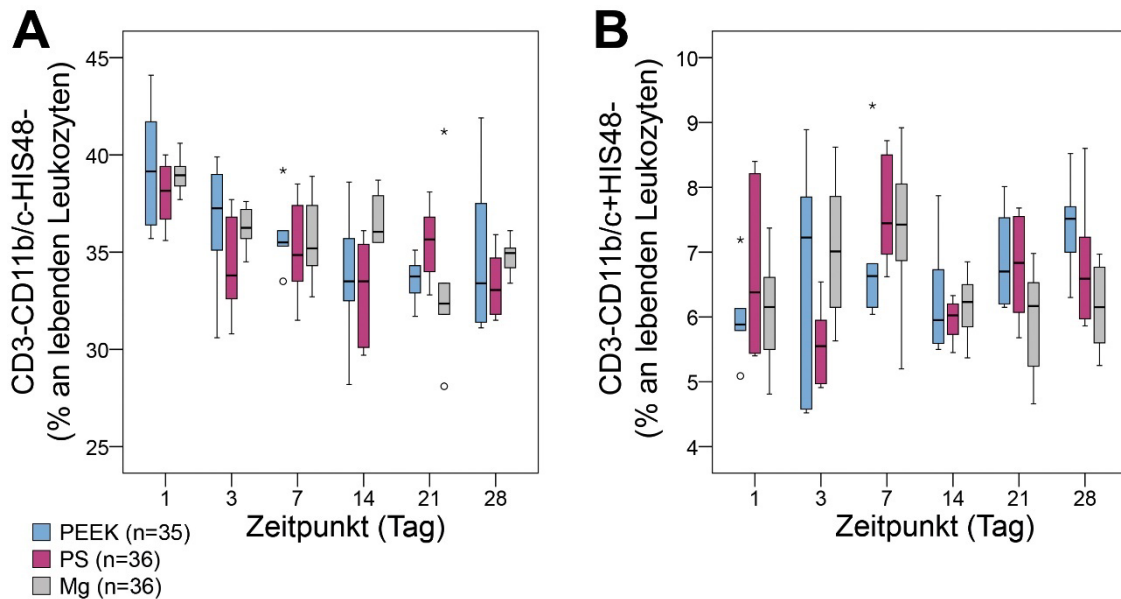


Abb. 22: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-, A) und der natürlichen Killerzellen/dendritischen Zellen (CD3-CD11b/c+HIS48-, B) an den lebenden Leukozyten in der Milz PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 13, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A12 und Tab. A13

Der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten (CD3-CD11b/c-HIS48-) an den lebenden Leukozyten in der Milz zeigte für alle Materialien eine Abnahme über die Zeit (Abb. 22 A). Zwischen Tag 1 und 28 verringerte sich der Anteil der B-Lymphozyten bei PS und Mg signifikant ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von PEEK konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden.

Die Zeitpunktvergleiche für den prozentualen Anteil der NK-Zellen und der dendritischen Zellen (CD3-CD11b/c+HIS48-) an den lebenden Leukozyten in der Milz ergaben für das Material PEEK einen signifikanten Anstieg zwischen Tag 1 und 28 ($p = 0,009$) (Abb. 22 B). Für die Materialien PS und Mg wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten beobachtet.

4.8 Durchflusszytometrische Untersuchungen in der subkutanen Fremdkörperkapsel

Zusammenfassend konnten die typischen Zellpopulationen der akuten und chronischen Entzündungsreaktion sowie der Fremdkörperreaktion im zeitlichen Verlauf in der subkutanen Fremdkörperkapsel identifiziert und quantifiziert werden. Bei allen Zellpopulationen wurde ein signifikanter Einfluss der Zeit beobachtet. Zwischen den Materialien PEEK, PS und Mg konnten zu bestimmten Zeitpunkten bei den folgenden Zellpopulationen signifikante Unterschiede aufgefunden werden: Das Material Mg induzierte gegenüber den permanenten Implantatmaterialien in der frühen Phase der

FBR einen erhöhten Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen. Zudem war der Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen nach Implantation von Mg im Vergleich zu PEEK und PS in der späteren Phase der FBR erniedrigt, wohingegen der Anteil der Mastzellen/NK-Zellen nach Implantation von Mg erhöht war.

Aus den entnommenen subkutanen Fremdkörperkapseln (n = 108) konnte eine vitale Einzelzellsuspension gewonnen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht werden. Im statistischen Modell waren die Residuen annähernd normalverteilt. Es wurden relativ ungleiche Varianzen beobachtet. Auf der Ebene der zweifaktoriellen ANOVA gab es signifikante Unterschiede über die Zeit bei allen untersuchten Zellpopulationen ($p \leq 0,05$) (Tab. 20). Das Material hatte auf bestimmte Zellpopulationen einen signifikanten Einfluss. Zudem konnten Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren Material und Zeitpunkt beobachtet werden.

Tab. 20: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA bei der subkutanen Fremdkörperkapsel

Zellpopulation (jeweils n = 98)	Zweifaktorielle ANOVA		
	p-Wert für Material	p-Wert für Zeitpunkt	p-Wert für Interaktion Material / Zeitpunkt
lebende Leukozyten/ Kapsel	n. s.	<0,001	0,001
CD3+CD4 ⁺¹	0,003	<0,001	0,008
CD3+CD8a ⁺¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	<0,001	<0,001
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	<0,001	<0,001	<0,001
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	0,005	<0,001	0,006
CD3-HIS48+CD4 ⁺¹	0,004	<0,001	n. s.
CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ⁺²	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹	<0,001	<0,001	<0,001
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺³	<0,001	<0,001	n. s.
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺³	0,002	<0,001	0,047
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺¹	<0,001	<0,001	0,006
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	0,012	<0,001	0,018

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+,
n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Im Folgenden werden bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene die Ergebnisse der Post-hoc-Tests mit anschließender Bonferroni-Holm-Prozedur betrachtet. Aus Gründen der Übersicht sind die signifikanten p-Werte der Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche im Anhang aufgeführt (Tab. A14 und Tab. A15).

4.8.1 Lebende Leukozyten

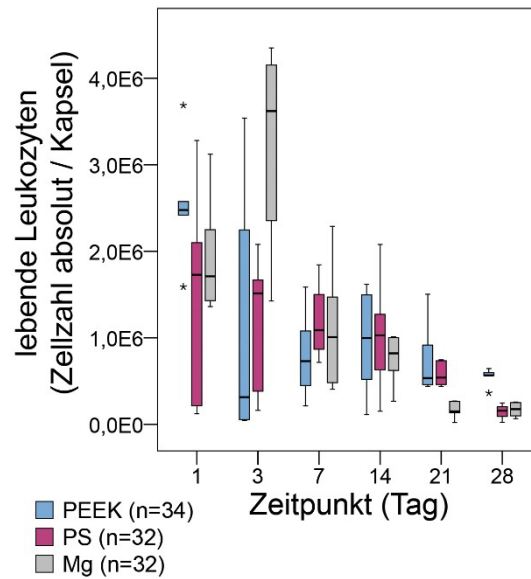


Abb. 23: Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für
 Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe
 Tab. A14 und Tab. A15

Die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel wies an Tag 1 für PEEK und PS sowie an Tag 3 für Mg den maximalen Wert auf (Abb. 23). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Abnahme der Zellzahl bei PEEK nachgewiesen werden, welche für die Tage 7, 14 und 28 signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von Mg verringerte sich die Zellzahl der lebenden Leukozyten zwischen Tag 7 und 28 signifikant ($p = 0,002$). Die Zeitpunktvergleiche für PS ergaben keine signifikanten Unterschiede.

4.8.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

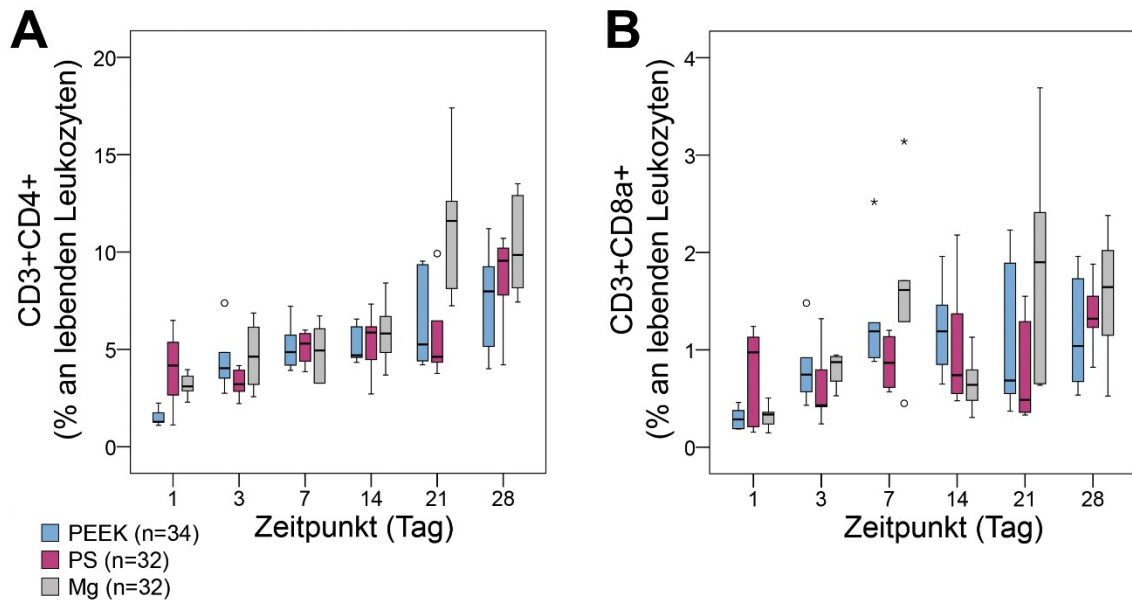


Abb. 24: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+, A) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+, B) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit (Abb. 24 A). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der T-Helferzellen nachgewiesen werden, welche für die Tage 14 und 28 bei PEEK und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von Mg wurde zudem ein signifikanter Anstieg des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 7 und 28 beobachtet ($p = 0,002$). Bei dem Material PS konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten aufgefunden werden. Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 nach der Implantation ergab für Mg einen signifikant höheren Anteil der T-Helferzellen als für PEEK ($p = 0,008$).

Der prozentuale Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) an den lebenden Leukozyten wies ebenfalls für die drei Materialien einen tendenziellen Anstieg über die Zeit auf (Abb. 24 B). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der zytotoxischen T-Zellen festgestellt werden, welche für die Tage 7 und 28 bei PEEK und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Die Implantation von PS führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den untersuchten Zeitpunkten.

4.8.3 Neutrophile Granulozyten und CD4-negative Monozyten/Makrophagen

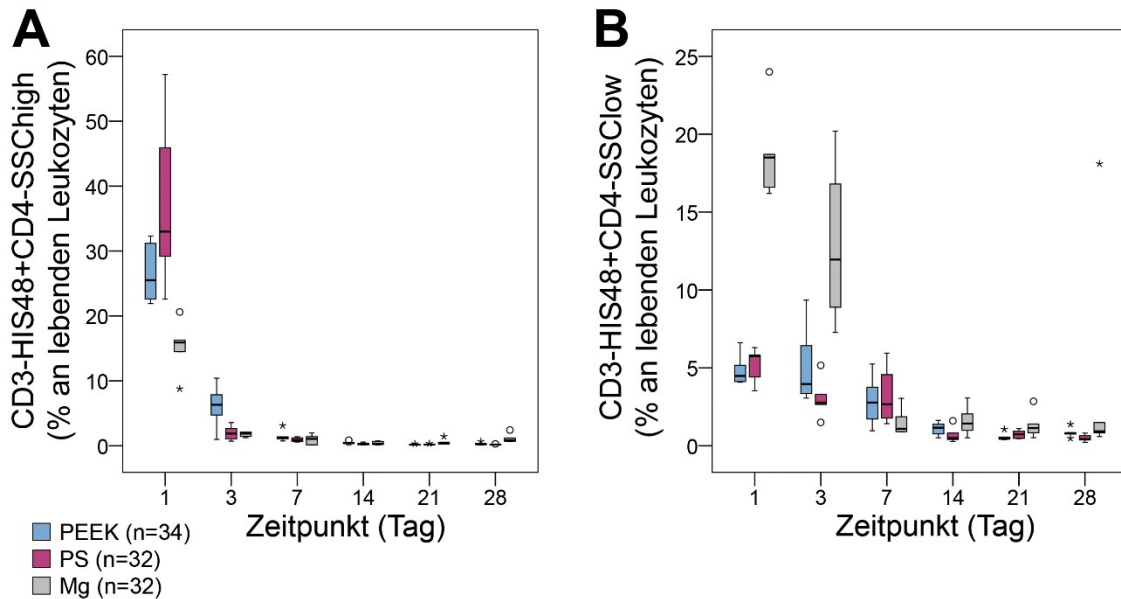


Abb. 25: Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh, A) und der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow, B) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel erreichte bei den drei Materialien an Tag 1 nach der Implantation den höchsten Wert (Abb. 25 A). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Abnahme des Anteils der Zellpopulation nachgewiesen werden, welche für die Tage 3, 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Tag 7 betrug der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den lebenden Leukozyten für alle Materialien im Mittel unter 1 %.

Der prozentuale Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow) an den lebenden Leukozyten zeigte für alle Materialien eine Abnahme über die Zeit (Abb. 25 B). Zwischen Tag 1 und 14 verringerte sich der Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen bei PEEK und PS signifikant ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von Mg wurde eine signifikante Abnahme des Anteils der Zellpopulation bereits zwischen Tag 1 und 7 beobachtet ($p = 0,004$).

Beim Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 3 induzierte Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel als PEEK und PS ($p \leq 0,05$).

4.8.4 Eosinophile Granulozyten

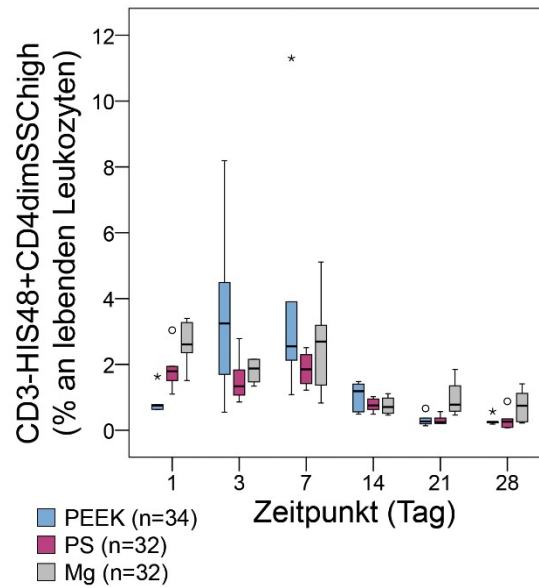


Abb. 26: Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel verringerte sich zwischen Tag 1 und 14 für PS und Mg signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb. 26). Nach Implantation von PEEK erfolgte zwischen Tag 1 und 7 ein signifikanter Anstieg, nachfolgend verringerte sich der Anteil der Zellpopulation zwischen Tag 7 und 28 signifikant ($p \leq 0,05$).

Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 ergab für Mg einen signifikant höheren Anteil der eosinophilen Granulozyten als für PEEK ($p = 0,016$). Zudem induzierte Mg an Tag 21 einen signifikant höheren Anteil der Zellpopulation in der subkutanen Fremdkörperkapsel als PEEK und PS ($p \leq 0,05$).

4.8.5 Frühe Monozyten/Makrophagen

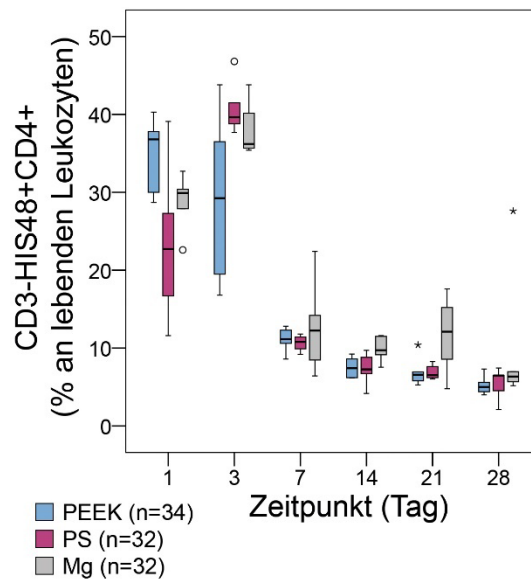


Abb. 27: Prozentualer Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel stieg für die Materialien PS und Mg zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 27). An Tag 3 nach der Implantation erreichte der Anteil der Zellpopulation für PS und Mg seinen maximalen Wert. Anschließend verminderte sich der prozentuale Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten zwischen den Tagen 3 und 7 für PS und Mg signifikant ($p \leq 0,05$). Die Zeitpunktvergleiche für das Material PEEK zeigten eine Abnahme des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten, welche für die Tage 7, 14 und 28 signifikant war ($p \leq 0,05$).

Zu den untersuchten Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialgruppen nachgewiesen werden.

Betrachtung der Subpopulationen: frühe Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp und gewebeständige Makrophagen

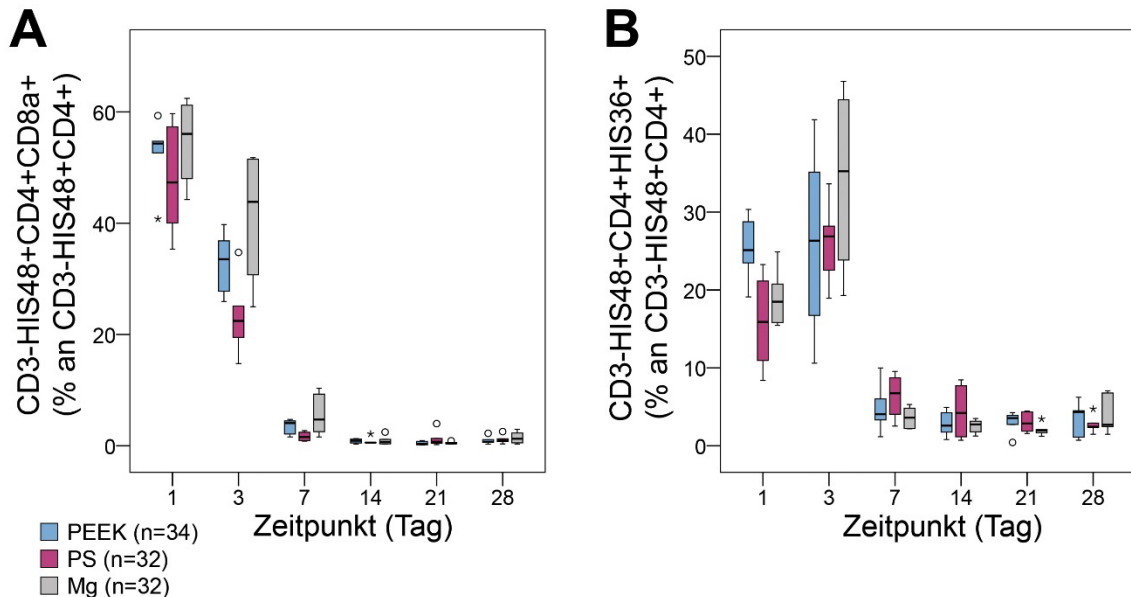


Abb. 28: Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+, A) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+, B) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der subkutanen Fremdkörperkapsel

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Die zwei Subpopulationen, zytotoxischer Phänotyp (CD8a+) und gewebeständige Makrophagen (HIS36+), der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) wurden jeweils als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation dargestellt und statistisch getrennt davon betrachtet.

Der prozentuale Anteil des zytotoxischen Phänotyps (CD8a+) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der subkutanen Fremdkörperkapsel wies an Tag 1 nach der Implantation für alle Materialien den maximalen Wert auf (Abb. 28 A). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten wurde eine Abnahme des Anteils der Subpopulation beobachtet, welche für die Tage 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Tag 7 betrug der Anteil des zytotoxischen Phänotyps für alle Materialien im Mittel unter 2 %.

Der prozentuale Anteil der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den frühen Monozyten/Makrophagen stieg für die drei Materialien zwischen Tag 1 und 3 an (Abb. 28 B). An Tag 3 erreichte der Anteil der Subpopulation für PEEK, PS und Mg seinen maximalen Wert. Zwischen Tag 3 und 7 verringerte sich der Anteil der Subpopulation für alle Materialien signifikant ($p \leq 0,05$). Anschließend wies der Anteil der gewebeständigen Makrophagen für die drei Materialien einen stabilen Verlauf über die Zeit auf.

4.8.6 Späte ein- und mehrkernige Makrophagen

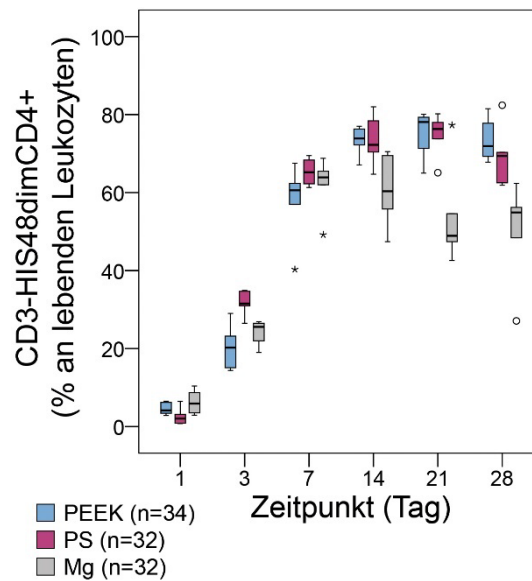


Abb. 29: Prozentualer Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit (Abb. 29). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der Zellpopulation nachgewiesen werden, welche für die Tage 3, 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Zudem erhöhte sich der Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen für die drei Materialien zwischen Tag 3 und 7 signifikant ($p \leq 0,05$). Die Zeitpunktvergleiche für Mg ergaben eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen zwischen Tag 7 und 28 ($p = 0,041$).

Beim Materialgruppenvergleich an den Tagen 14 und 28 induzierte Mg jeweils einen signifikant geringeren Anteil der Zellpopulation als PEEK und PS ($p \leq 0,05$). Am dritten postoperativen Tag führte die Implantation von PS zu einem signifikant höheren Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen an den lebenden Leukozyten als bei PEEK und Mg ($p \leq 0,05$).

Betrachtung der Subpopulationen: späte ein- und mehrkernige Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp und gewebeständige Makrophagen

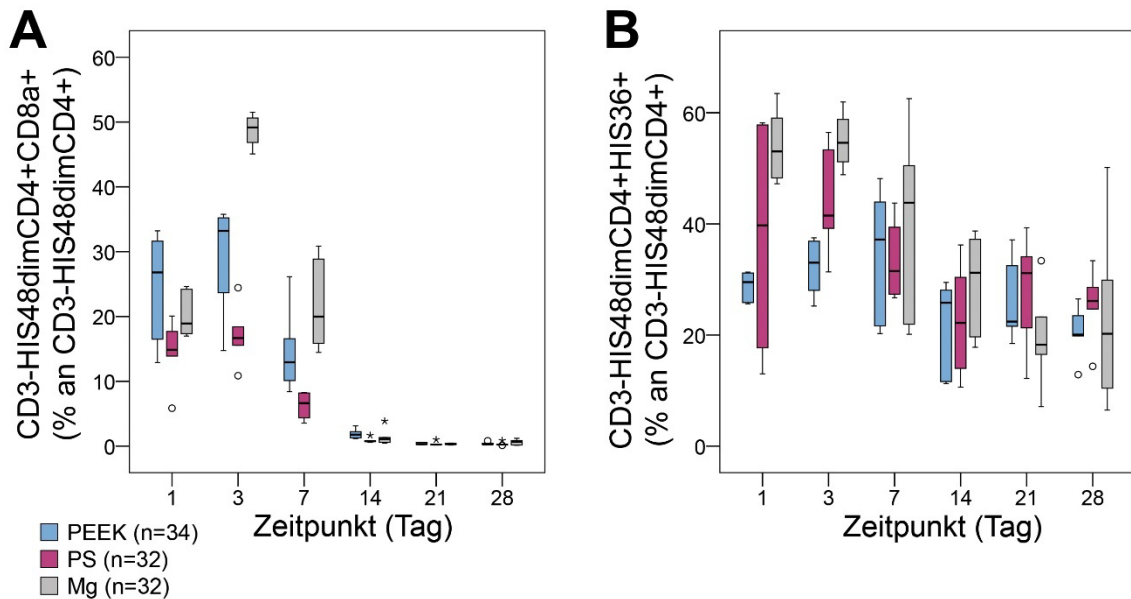


Abb. 30: Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+, A) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+, B) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) in der subkutanen Fremdkörperkapsel
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Die zwei Subpopulationen, zytotoxischer Phänotyp (CD8a+) und gewebeständige Makrophagen (HIS36+), der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) wurden jeweils als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation dargestellt und statistisch getrennt davon betrachtet.

Der prozentuale Anteil des zytotoxischen Phänotyps (CD8a+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der subkutanen Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien zwischen Tag 1 und 3 einen Anstieg, welcher für Mg signifikant war ($p = 0,016$) (Abb. 30 A). An Tag 3 erreichte der Anteil der Subpopulation für PEEK, PS und Mg seinen maximalen Wert. Anschließend verminderte sich der Anteil des zytotoxischen Phänotyps über die Zeit, wobei eine signifikante Abnahme zwischen den Tagen 3 und 7 sowie zwischen den Tagen 7 und 28 für alle Materialien beobachtet wurde ($p \leq 0,05$). Nach Tag 14 betrug der Anteil des zytotoxischen Phänotyps für alle Materialien im Mittel unter 1 %.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 3 ergab für Mg einen signifikant höheren Anteil der Subpopulation als für PEEK und PS ($p \leq 0,05$). Zudem induzierte Mg an Tag 7 einen signifikant größeren Anteil des zytotoxischen Phänotyps als PS ($p = 0,01$).

Der prozentuale Anteil der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der subkutanen Fremdkörperkapsel verminderte sich für das Material Mg zwischen Tag 1 und 14 signifikant ($p = 0,004$) (Abb. 30 B). Nach Implantation von PEEK und PS konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten beobachtet werden.

Beim Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 3 induzierte Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der gewebeständigen Makrophagen als PEEK ($p \leq 0,05$).

4.8.7 Mastzellen, natürliche Killerzellen und nicht spezifisch gefärbte Leukozyten

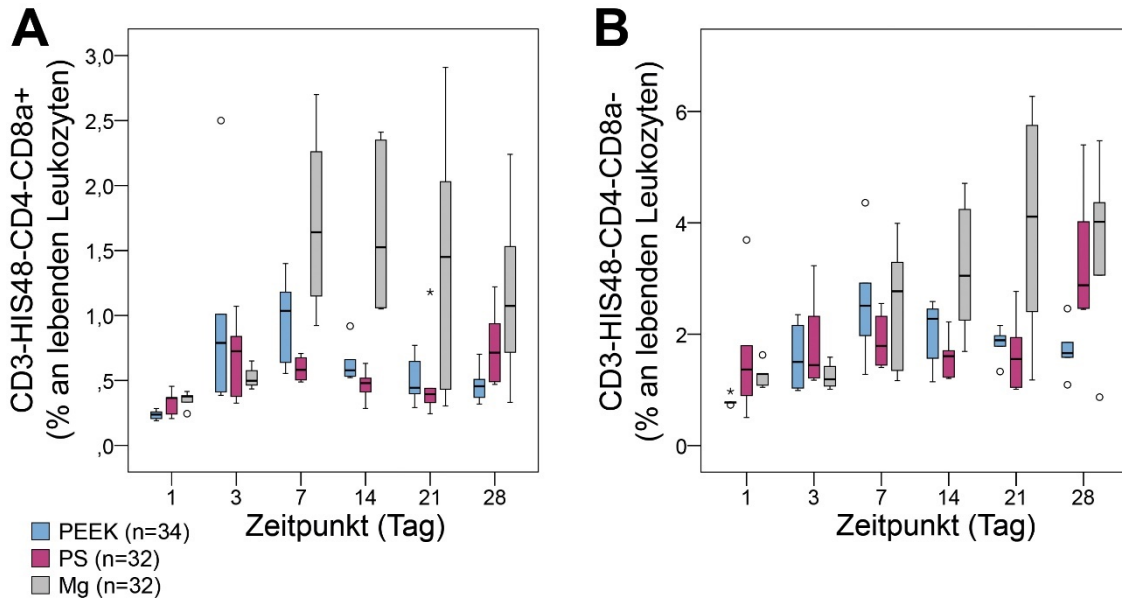


Abb. 31: Prozentualer Anteil der Mastzellen/natürlichen Killerzellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+, A) und der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-, B) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 14, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A14 und Tab. A15

Der prozentuale Anteil der Mastzellen/NK-Zellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel stieg zwischen Tag 1 und 7 für die Materialien PEEK und Mg signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 31 A). Zwischen Tag 7 und 28 verringerte sich der Anteil der Zellpopulation für PEEK und Mg, wobei für das Material PEEK ein signifikanter Unterschied beobachtet wurde ($p = 0,017$). Die Zeitpunktvorgleiche für das Material PS ergaben einen signifikanten Anstieg des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 1 und 28 ($p = 0,008$).

Beim Materialgruppenvergleich an Tag 7 induzierte Mg einen signifikant höheren Anteil der Mastzellen/NK-Zellen als PS ($p = 0,01$). Nach Implantation von Mg wurde zudem an Tag 14 ein signifikant höherer Anteil der Zellpopulation an den lebenden Leukozyten als bei PEEK und PS beobachtet ($p \leq 0,05$).

Der prozentuale Anteil der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-, B-Lymphozyten und dendritische Zellen) an den lebenden Leukozyten in der subkutanen Fremdkörperkapsel stieg zwischen Tag 1 und 7 für PEEK signifikant an (Abb. 31 B). Nachfolgend verminderte sich der Anteil der Zellpopulation für PEEK über die Zeit. Nach Implantation von Mg zeigte sich eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der nicht spezifisch gefärbten Zellen zwischen Tag 1 und 14 ($p = 0,004$).

Bei den Zeitpunktvergleichen für PS wurden keine signifikanten Unterschiede aufgefunden.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 ergab für Mg einen signifikant erhöhten Anteil der Zellpopulation als für PEEK ($p = 0,008$). Zudem induzierte Mg an Tag 14 einen signifikant höheren Anteil der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten als PS ($p = 0,009$).

4.9 Durchflusszytometrische Untersuchungen in der intramuskulären Fremdkörperkapsel

Zusammenfassend konnten die typischen Zellpopulationen der akuten und chronischen Entzündungsreaktion sowie der Fremdkörperreaktion im zeitlichen Verlauf in der intramuskulären Fremdkörperkapsel identifiziert und quantifiziert werden. Bei allen Zellpopulationen wurde ein signifikanter Einfluss der Zeit beobachtet. Im Trend gab es zwischen den Materialien PEEK, PS und Mg zu den untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede.

Tab. 21: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA bei der intramuskulären Fremdkörperkapsel

Zellpopulation (jeweils n = 105)	Zweifaktorielle ANOVA		
	p-Wert für Material	p-Wert für Zeitpunkt	p-Wert für Interaktion Material / Zeitpunkt
lebende Leukozyten/Kapsel	n. s.	<0,001	<0,001
CD3+CD4 ⁺¹	0,017	<0,001	n. s.
CD3+CD8a ⁺¹	0,001	<0,001	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	<0,001	<0,001	<0,001
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	<0,001	<0,001	0,001
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	<0,001	n. s.
CD3-HIS48+CD4 ⁺¹	0,007	<0,001	<0,001
CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²	<0,001	<0,001	0,005
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ⁺²	n. s.	<0,001	0,028
CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹	0,003	<0,001	<0,001
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺³	<0,001	<0,001	<0,001
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺³	<0,001	<0,001	0,001
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺¹	<0,001	<0,001	<0,001
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	<0,001	<0,001	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+,
n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Aus den entnommenen intramuskulären Fremdkörperkapseln (n = 108) konnte eine vitale Einzelzellsuspension gewonnen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht werden. Im statistischen Modell waren die Residuen annähernd normal-

verteilt. Es wurden relativ ungleiche Varianzen beobachtet. Auf der Ebene der zweifaktoriellen ANOVA gab es signifikante Unterschiede über die Zeit bei allen untersuchten Zellpopulationen ($p \leq 0,05$) (Tab. 21). Das Material hatte auf bestimmte Zellpopulationen einen signifikanten Einfluss. Zudem konnten Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren Material und Zeitpunkt beobachtet werden.

Im Folgenden werden bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene die Ergebnisse der Post-hoc-Tests mit anschließender Bonferroni-Holm-Prozedur betrachtet. Aus Gründen der Übersicht sind die signifikanten p-Werte der Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche im Anhang aufgeführt (Tab. A16 und Tab. A17).

4.9.1 Lebende Leukozyten

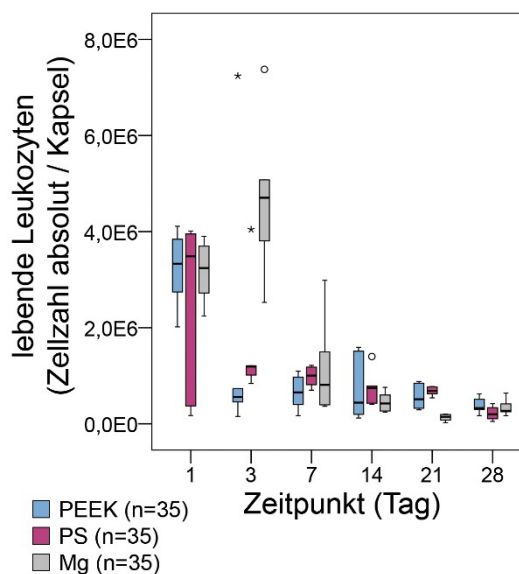


Abb. 32: Absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel wies an Tag 1 für PEEK und PS sowie an Tag 3 für Mg den maximalen Wert auf (Abb. 32). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Abnahme der Zellzahl bei PEEK nachgewiesen werden, welche für die Tage 7, 14 und 28 signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von Mg verringerte sich die Zellzahl zwischen Tag 3 und 7 signifikant ($p = 0,009$). Die Zeitpunktvergleiche für PS ergaben eine signifikante Abnahme der Zellzahl der lebenden Leukozyten zwischen Tag 7 und 28 ($p = 0,002$).

4.9.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

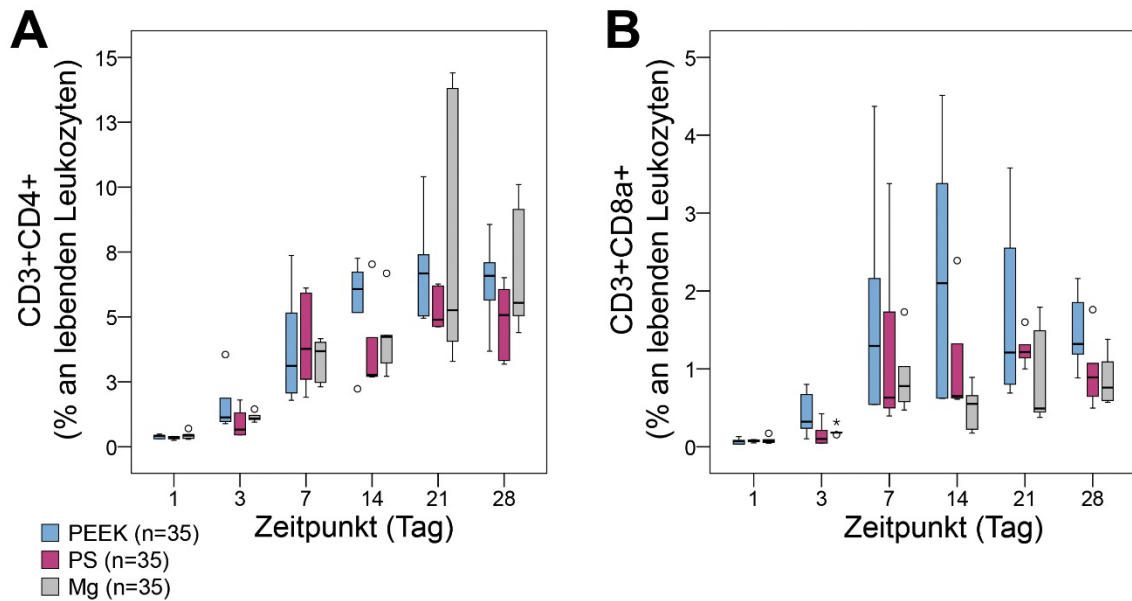


Abb. 33: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+, A) und der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+, B) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit (Abb. 33 A). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der T-Helferzellen nachgewiesen werden, welche für die Tage 3, 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von Mg wurde zudem ein signifikanter Anstieg des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 7 und 28 beobachtet ($p = 0,002$).

Zu den untersuchten Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien bei den paarweisen Vergleichen aufgefunden werden.

Der prozentuale Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) wies ebenfalls für die drei Materialien einen Anstieg über die Zeit auf (Abb. 33 B). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der zytotoxischen T-Zellen festgestellt werden, welche für die Tage 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von PS und Mg wurde zudem ein signifikanter Anstieg des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 3 und 7 nachgewiesen ($p \leq 0,05$).

Der Materialgruppenvergleich ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.9.3 Neutrophile Granulozyten und CD4-negative Monozyten/Makrophagen

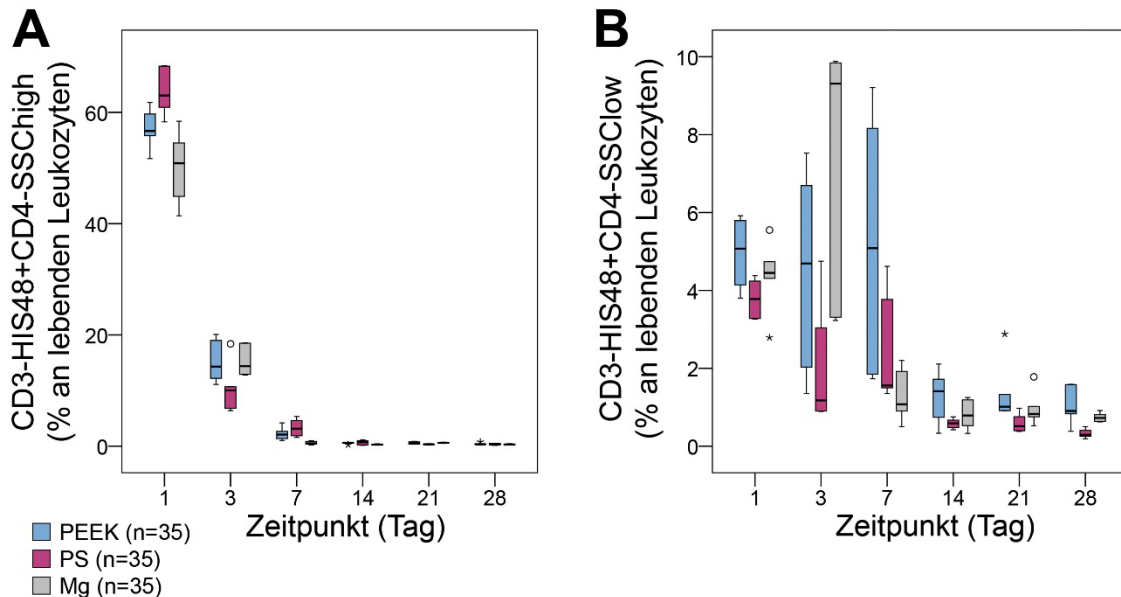


Abb. 34: Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh, A) und der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow, B) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4-SSChigh) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel erreichte für die drei Materialien an Tag 1 nach der Implantation den höchsten Wert (Abb. 34 A). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Abnahme des Anteils der Zellpopulation nachgewiesen werden, welche für die Tage 3, 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Tag 7 betrug der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel für alle Materialien im Mittel unter 1 %.

Der Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 7 ergab für Mg jeweils einen signifikant geringeren Anteil der Zellpopulation als für PS ($p \leq 0,05$).

Der prozentuale Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4-SSClow) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel wies an Tag 1 für PS und an Tag 3 für Mg den maximalen Wert auf (Abb. 34 B). Nach Implantation von PEEK erreichte der prozentuale Anteil der Zellpopulation an Tag 7 seinen höchsten Wert. Anschließend verringerte sich der Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen im Verlauf der Zeit, wobei eine signifikante Abnahme zwischen den Tagen 3 und 7 für Mg sowie zwischen den Tagen 7 und 28 für PEEK und PS festgestellt wurde ($p \leq 0,05$).

Der Materialgruppenvergleich an Tag 28 ergab für Mg einen signifikant höheren Anteil der Zellpopulation als für PS ($p = 0,002$).

4.9.4 Eosinophile Granulozyten

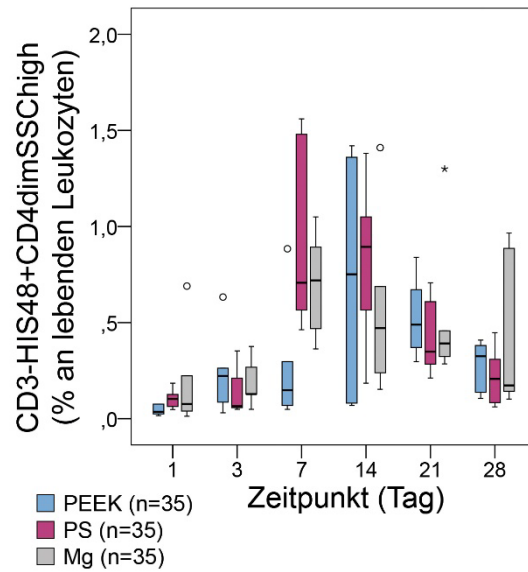


Abb. 35: Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten (CD3-HIS48+CD4dimSSChigh) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel stieg zwischen Tag 1 und 7 für PS signifikant an, gefolgt von einer signifikanten Abnahme zwischen Tag 7 und 28 ($p \leq 0,05$) (Abb. 35). Die Zeitpunktvergleiche für das Material PEEK zeigten einen signifikanten Anstieg des Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 1 und 14 ($p = 0,009$). Nach Implantation von Mg konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Zeitpunkten nachgewiesen werden.

4.9.5 Frühe Monozyten/Makrophagen

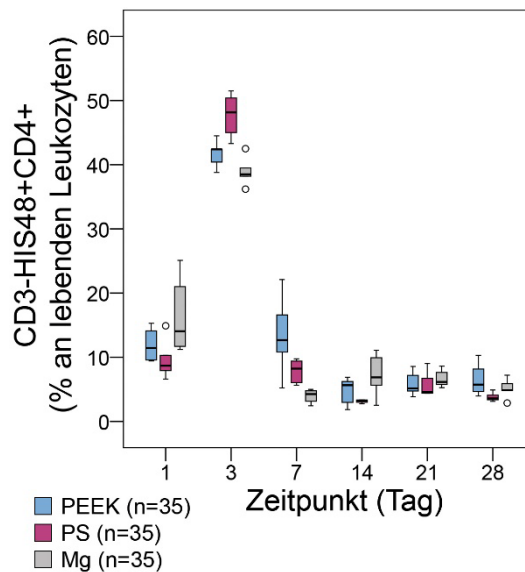


Abb. 36: Prozentualer Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel
 PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel stieg für alle Materialien zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 36). An Tag 3 erreichte der prozentuale Anteil der Zellpopulation für PEEK, PS und Mg seinen maximalen Wert. Zwischen Tag 3 und 7 verminderte sich der Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten für alle Materialien signifikant ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von PEEK und PS fiel der Anteil der Zellpopulation zudem zwischen Tag 7 und 28 signifikant ab ($p \leq 0,05$).

Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 ergab für Mg einen signifikant höheren Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten als für PS ($p = 0,015$). An den Tagen 3 und 7 induzierte Mg hingegen einen signifikant geringeren Anteil der Zellpopulation als PS ($p \leq 0,05$). Zudem war im Vergleich zu Mg der Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen an Tag 7 nach Implantation von PEEK signifikant höher ($p = 0,002$).

Betrachtung der Subpopulationen: frühe Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp und gewebeständige Makrophagen

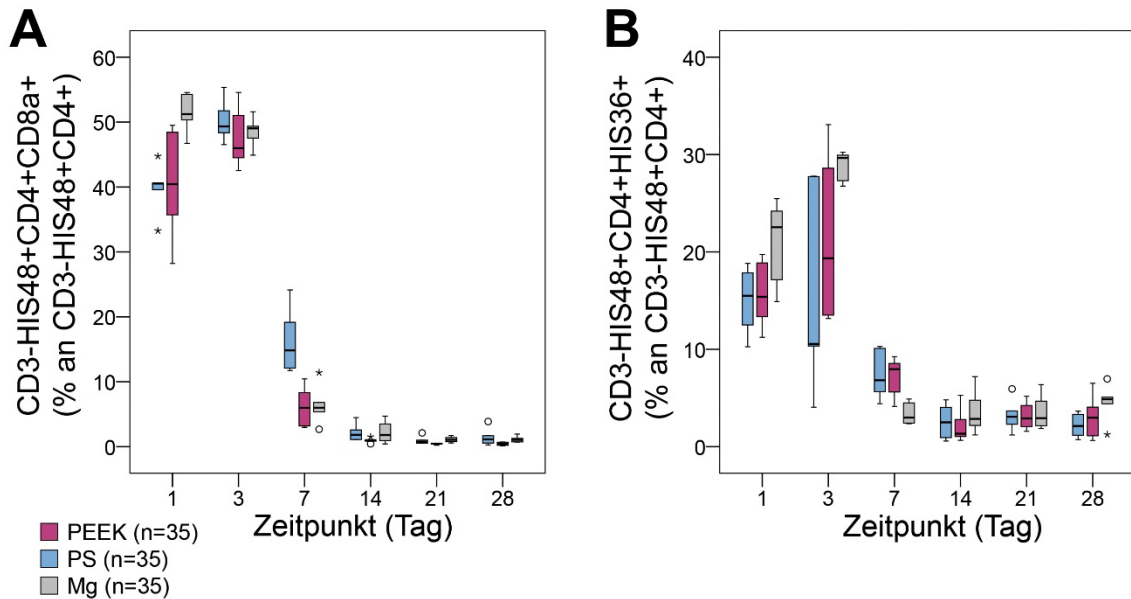


Abb. 37: Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+, A) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+, B) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Die zwei Subpopulationen, zytotoxischer Phänotyp (CD8a+) und gewebeständige Makrophagen (HIS36+), der frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) wurden jeweils als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation dargestellt und statistisch getrennt davon betrachtet.

Der prozentuale Anteil des zytotoxischen Phänotyps (CD8a+) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel wies an Tag 1 für Mg und an Tag 3 für PEEK und PS jeweils den höchsten Wert auf (Abb. 37 A). Nach Tag 3 verminderte sich der Anteil der Subpopulation über die Zeit, wobei eine signifikante Abnahme zwischen Tag 3 und 7 sowie zwischen Tag 7 und 28 für alle Materialien beobachtet wurde ($p \leq 0,05$). Nach Tag 14 betrug der Anteil des zytotoxischen Phänotyps für alle Materialien im Mittel unter 1 %.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 ergab für Mg einen signifikant höheren prozentualen Anteil der Subpopulation als für PEEK und PS ($p \leq 0,05$). Das Material PEEK induzierte an Tag 7 einen signifikant größeren Anteil des zytotoxischen Phänotyps als PS und Mg ($p \leq 0,05$).

Der prozentuale Anteil der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den frühen Monozyten/Makrophagen (CD3-HIS48+CD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel erreichte für PEEK an Tag 1 den höchsten Wert (Abb. 37 B). Für das Material Mg stieg der Anteil der Subpopulation zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p = 0,004$). An Tag 3 erzielte der Anteil der gewebeständigen Makrophagen für PS und Mg seinen

maximalen Wert. Anschließend verringerte sich der Anteil der Subpopulation im Verlauf der Zeit, wobei eine signifikante Abnahme zwischen Tag 3 und 7 für PS und Mg sowie zwischen Tag 7 und 28 für PEEK und PS festgestellt wurde ($p \leq 0,05$).

4.9.6 Späte ein- und mehrkernige Makrophagen

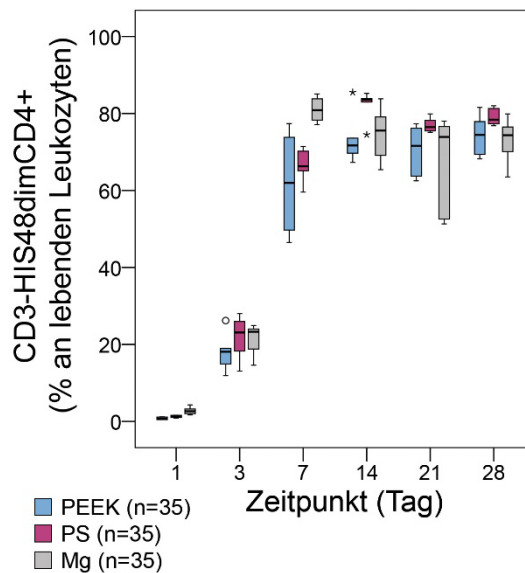


Abb. 38: Prozentualer Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit, gefolgt von einer Plateauphase (Abb. 38). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der Zellpopulation nachgewiesen werden, welche für die Tage 3, 7, 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Zudem erhöhte sich der Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen für die drei Materialien zwischen Tag 3 und 7 signifikant ($p \leq 0,05$). Die Zeitpunktvorgleiche für Mg ergaben eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der Zellpopulation zwischen Tag 7 und 28 ($p = 0,009$).

Beim Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 7 induzierte Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen an den lebenden Leukozyten als PEEK und PS ($p \leq 0,05$).

Betrachtung der Subpopulationen: späte ein- und mehrkernige Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp und gewebeständige Makrophagen

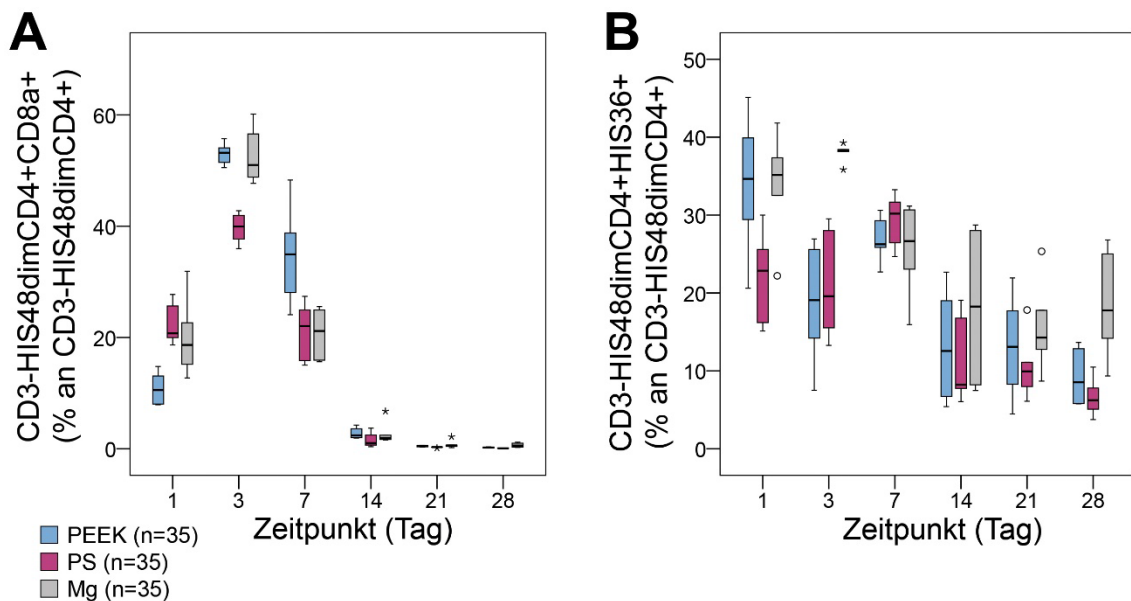


Abb. 39: Prozentualer Anteil der Zellen mit zytotoxischem Phänotyp (CD8a+, A) und der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+, B) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) in der intramuskulären Fremdkörperkapsel
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Die zwei Subpopulationen, zytotoxischer Phänotyp (CD8a+) und gewebeständige Makrophagen (HIS36+), der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen (CD3-HIS48dimCD4+) wurden jeweils als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation dargestellt und statistisch getrennt davon betrachtet.

Der prozentuale Anteil des zytotoxischen Phänotyps (CD8a+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der intramuskulären Fremdkörperkapsel stieg für alle Materialien zwischen Tag 1 und 3 signifikant an ($p \leq 0,05$) (Abb. 39 A). An Tag 3 nach der Implantation erreichte der Anteil der Zellpopulation für PEEK, PS und Mg seinen maximalen Wert. Anschließend verminderte sich der Anteil des zytotoxischen Phänotyps über die Zeit, wobei eine signifikante Abnahme zwischen den Tagen 3 und 7 sowie zwischen den Tagen 7 und 28 für die drei Materialien beobachtet wurde ($p \leq 0,05$). Nach Tag 14 betrug der Anteil des zytotoxischen Phänotyps für alle Materialien im Mittel unter 1 %.

Der Materialgruppenvergleich an Tag 1 ergab für PS und Mg einen signifikant höheren Anteil des zytotoxischen Phänotyps als für PEEK ($p \leq 0,05$). Das Material PS induzierte an Tag 3 einen signifikant geringeren Anteil der Zellpopulation als PEEK und Mg ($p \leq 0,05$). An Tag 7 wurde für PEEK ein signifikant höherer Anteil des zytotoxischen Phänotyps als für PS und Mg beobachtet ($p \leq 0,05$).

Der prozentuale Anteil der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der intramuskulären Fremdkörperkapsel fiel

für alle Materialien zwischen Tag 1 und 28 signifikant ab ($p \leq 0,05$) (Abb. 39 B). Beim Materialgruppenvergleich an den Tagen 3 und 28 induzierte Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der Subpopulation als PEEK und PS ($p \leq 0,05$).

4.9.7 Mastzellen, natürliche Killerzellen und nicht spezifisch gefärbte Leukozyten

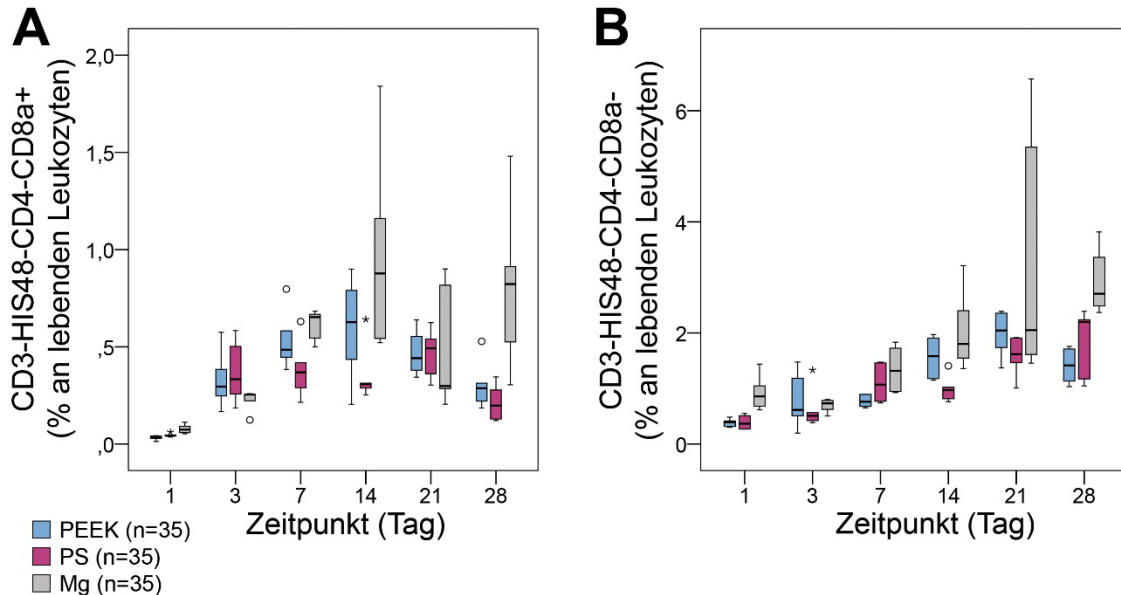


Abb. 40: Prozentualer Anteil der Mastzellen/natürlichen Killerzellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+, A) und der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-, B) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel
PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, Stichprobenumfang für Boxplots siehe Tab. 15, p-Werte und Signifikanzen für Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche siehe Tab. A16 und Tab. A17

Der prozentuale Anteil der Mastzellen/NK-Zellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg zwischen Tag 1 und den jeweils darauf folgenden Tagen, welcher für die Tage 3, 7, 14 und 28 signifikant war ($p \leq 0,05$) (Abb. 40 A). Nach Implantation von Mg wurde zudem ein signifikanter Anstieg des Anteils der Mastzellen/NK-Zellen zwischen Tag 3 und 7 beobachtet ($p = 0,004$). Der Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 28 ergab für Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der Mastzellen/NK-Zellen an den lebenden Leukozyten als für PEEK und PS ($p \leq 0,05$). Zudem induzierte Mg an Tag 7 einen signifikant höheren Anteil der Zellpopulation als PS ($p = 0,009$).

Der prozentuale Anteil der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-, B-Lymphozyten und dendritische Zellen) an den lebenden Leukozyten in der intramuskulären Fremdkörperkapsel zeigte für alle Materialien einen Anstieg über die Zeit (Abb. 40 B). Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Zunahme des Anteils der Zellpopulation nachgewiesen werden, welche für die Tage 14 und 28 bei PEEK, PS und Mg signifikant war ($p \leq 0,05$). Nach Implantation von PEEK und Mg wurde zudem ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils

der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten zwischen Tag 7 und 28 beobachtet ($p \leq 0,05$).

Der Materialgruppenvergleich an den Tagen 1 und 28 ergab für Mg jeweils einen signifikant höheren Anteil der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten an den lebenden Leukozyten als für PEEK und PS ($p \leq 0,05$). Zudem induzierte Mg an Tag 7 einen signifikant höheren Anteil der Zellpopulation als PEEK ($p = 0,002$). An Tag 14 wurde für PS ein signifikant geringerer Anteil der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten als für Mg beobachtet ($p = 0,009$).

4.10 Ausschluss einer bakteriellen Kontamination

Von den untersuchten Gewebeproben konnten alle Proben ($n = 72$) quantitativ ausgewertet werden. Die Schmelzkurvenanalyse ergab keinen Nachweis von unspezifischen PCR-Produkten bzw. Nebenprodukten (Primer-Dimere).

Der relative Expressionsunterschied aller untersuchten Gewebeproben lag unter 0,05. Somit konnten bakterielle Kontaminationen vollständig ausgeschlossen werden.

4.11 *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium

Mit zunehmender Implantationsdauer zeigte sich makroskopisch eine Veränderung der Oberflächenfarbe der Mg-Implantate von silbrig glänzend zu schwarz (Abb. 41). Die subkutanen Implantate wiesen gegenüber den intramuskulären Implantaten an Tag 1, 3 und 7 eine vermehrte schwarze Färbung ihrer Oberfläche auf. Nach Trocknung der entnommenen Mg-Implantate nahmen diese eine weiße Färbung an. Die zylindrische Form der Implantate blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten erhalten.



Abb. 41: Korrosion von reinem Magnesium *in vivo*
A–F: reine Magnesiumimplantate an Tag 1, 3, 7, 14, 21 und 28 unmittelbar nach Entnahme, die Länge des Maßstabalkens entspricht jeweils 8 mm

4. Ergebnisse

Tab. 22: *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium ($n = 6$ je Zeitpunkt und Implantatlokalisation)

Mittelwert \pm SD (mm/Jahr)						
Zeitpunkt (Tag)	1	3	7	14	21	28
subkutan	0,88 \pm 0,58	0,54 \pm 0,10	0,66 \pm 0,23	0,30 \pm 0,08	0,28 \pm 0,07	0,35 \pm 0,05
intramuskulär	0,88 \pm 0,48	0,47 \pm 0,24	0,48 \pm 0,10	0,30 \pm 0,04	0,28 \pm 0,05	0,37 \pm 0,12

SD = Standardabweichung

Die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von Mg konnte für alle Implantate bestimmt werden ($n = 6$ je Zeitpunkt und Lokalisation) (Tab. 22). Die höchste *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der subkutanen und intramuskulären Implantate wurde an Tag 1 nach der Implantation gemessen. Zwischen Tag 1 und den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten konnte eine Abnahme der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der subkutanen und intramuskulären Implantate nachgewiesen werden, welche für die Tage 14, 21 und 28 bei den intramuskulären Implantaten signifikant war (Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$, Tab. 23). Zwischen Tag 14 und Tag 28 nach der Implantation zeigte die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit einen stabilen Verlauf. An Tag 7 wurde eine signifikant höhere *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit nach subkutaner Implantation gegenüber der intramuskulären Implantation festgestellt (Wilcoxon-Test, $p = 0,031$, Tab. 24).

Tab. 23: Zeitpunktvergleiche der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium: p -Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur ($n = 6$ je Zeitpunkt und Implantatlokalisation)

Zeitpunktvergleich	Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 14	Tag 1 / 21	Tag 1 / 28
subkutan	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
intramuskulär	n. s.	n. s.	0,002	0,002	0,009

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. 24: Vergleich der Implantatlokalisation der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von reinem Magnesium: p -Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Wilcoxon-Test) ($n = 6$ je Zeitpunkt und Implantatlokalisation)

Vergleich der Implantatlokalisation	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
subkutan / intramuskulär	n. s.	n. s.	0,031	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, die FBR nach Implantation von Mg im Vergleich zu den permanenten Biomaterialien PEEK und PS im subkutanen und intramuskulären Gewebe der Ratte mithilfe der Durchflusszytometrie im zeitlichen Verlauf darzustellen, zu beschreiben und zu evaluieren. Hierfür wurde die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Analyse der Fremdkörperkapsel im Tiermodell etabliert. Zusätzlich wurden systemische Effekte nach Implantation der Materialien mittels Durchflusszytometrie im Blut und in der Milz untersucht. Dabei wurden die *In-vivo*-Korrosion der Mg-Implantate sowie eine mögliche bakterielle Kontamination berücksichtigt.

Anhand der Ergebnisse dieser Pilotstudie konnten die zuvor formulierten Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

- Wie ist der zelluläre Ablauf der FBR im untersuchten Zeitraum auf Mg im Vergleich zu den permanenten Implantatmaterialien PEEK und PS qualitativ und quantitativ charakterisiert?

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnten die typischen Zellpopulationen der FBR im Gewebe der subkutanen und intramuskulären Fremdkörperkapsel identifiziert und quantifiziert werden. Während der akuten Entzündungsreaktion der FBR dominierten die neutrophilen Granulozyten in der Implantatumgebung, gefolgt von einer Infiltration von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten. Zudem wurden Mastzellen, eosinophile Granulozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen und mehrkernige Makrophagen während der chronischen Entzündungsreaktion im entnommenen Kapselgewebe nachgewiesen. Für jede Zellpopulation konnten signifikante Unterschiede über die Zeit nach subkutaner sowie intramuskulärer Implantation der drei verschiedenen Biomaterialien detektiert werden, wobei alle Materialien einen ähnlichen zellulären Verlauf der FBR aufwiesen. Eine Beeinflussung der lokalen Entzündungsreaktion durch Bakterien konnte mittels RTQ-PCR ausgeschlossen werden.

- Zeigt Mg gegenüber den permanenten Implantatmaterialien infolge der Korrosion eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion?

Während der ersten vier Wochen nach Implantation korrodierte Mg *in vivo* mit einer niedrigen Korrosionsgeschwindigkeit, begleitet von geringen Gasansammlungen an der Implantationsstelle. Durchflusszytometrisch wurde keine verstärkte lokale Entzündungsreaktion infolge der Korrosion von Mg im subkutanen und intramuskulären Kapselgewebe gegenüber den permanenten Implantatmaterialien nachgewiesen. Die durchflusszytometrische Analyse der subkutanen Fremdkörperkapsel um Mg-Implantate ergab gegenüber den nicht resorbierbaren Polymeren lediglich einen erhöhten Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen in der frühen Phase der FBR sowie einen erhöhten Anteil der Mastzellen/NK-Zellen an den Leukozyten in der späteren Phase der FBR. Diese Unterschiede wurden nach intramuskulärer Implantation nicht aufgefunden. Zudem waren die beobachteten makroskopischen Entzündungszeichen sowie die Ausprägung der Fremdkörperkapsel um Mg-Implantate zu allen untersuchten Zeitpunkten mit der Gewebereaktion auf PEEK- und PS-Implantate vergleichbar. Das Wohlbefinden der Versuchstiere war nach Implantation von Mg wie auch nach Implantation der permanenten Implantatmaterialien unverändert gut.

- Gibt es einen Unterschied in der zellulären Immunantwort zwischen der subkutanen und intramuskulären Implantatlokalisierung?

Die subkutane und intramuskuläre Implantation führte zu ähnlichen Verläufen der untersuchten Zellpopulationen der FBR im untersuchten Zeitraum. Auch die Anteile der Leukozytenpopulationen zu den gewählten Zeitpunkten waren mehrheitlich vergleichbar. In der intramuskulären Fremdkörperkapsel zeigte sich jedoch am ersten postoperativen Tag ein deutlich erhöhter Anteil der neutrophilen Granulozyten an den lebenden Leukozyten sowie eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zum subkutanen Kapselgewebe. Zudem setzte die Infiltration der frühen Monozyten/Makrophagen in die intramuskuläre Fremdkörperkapsel zeitlich verzögert ein. Darüber hinaus war der Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl in der subkutanen Fremdkörperkapsel während der gesamten Implantationsdauer von Mg, PEEK und PS höher als nach intramuskulärer Implantation und wies einen anderen zeitlichen Verlauf auf.

Nach subkutaner Implantation traten, wie bereits beschrieben, einzelne Unterschiede zwischen den verwendeten Biomaterialien auf, die intramuskulär nicht beobachtet wurden.

- Gibt es eine systemische Immunantwort auf lokale Implantate?

Eine systemische Immunantwort auf die implantierten Materialien PEEK, PS und Mg wurde nicht beobachtet. Bei genauer Betrachtung der prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen an der Gesamtleukozytenzahl in Blut und Milz konnten vereinzelt signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Die bei den finalen Blutproben im Zeitverlauf erhobenen signifikanten Unterschiede lagen innerhalb des studieninternen Referenzbereiches und wurden als physiologische Schwankungen der Zellpopulationen angesehen. Da keine Unterschiede zwischen Mg und den beiden permanenten Implantatmaterialien PEEK und PS aufgefunden wurden, konnte auch ein Einfluss der Korrosionsprodukte von Mg auf die Leukozytenpopulationen in Blut und Milz ausgeschlossen werden. Das Wohlbefinden der Versuchstiere ließ ebenfalls auf eine ausgebliebene systemische Immunantwort schließen.

5.1 Validität des Tiermodells

In der vorliegenden Pilotstudie wurde die Ratte als Tiermodell zur Untersuchung der FBR verwendet. Ratten werden aufgrund ihrer einfachen Haltung und Handhabung, der Kosteneffizienz sowie der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer Vielzahl von anderen Studien häufig zur Evaluierung der Biokompatibilität von Biomaterialien eingesetzt (Kim et al., 2010; Lucke et al., 2015; Santos et al., 2010; Vaisman et al., 2010). Das gewählte Tiermodell ermöglichte nach Implantation von insgesamt vier Implantaten pro Tier in subkutanen und intramuskuläres Gewebe die gleichzeitige durchflusszytometrische und histologische Analyse der FBR. Folglich konnte die Anzahl der Versuchstiere im Sinne des 3R-Prinzips reduziert werden. Die Maus wurde als Tiermodell aufgrund ihrer zu geringen Körpergröße für diese Implantationsstudie nicht in Betracht gezogen.

Obwohl gemäß der Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 der Einsatz von Nagetieren für die Prüfung auf lokale biologische Effekte nach Implantation empfohlen wird, muss

die Übertragbarkeit von tierexperimentellen Daten auf den Menschen kritisch betrachtet werden. Wisniewski et al. (2002) beobachteten nach subkutaner Implantation eines Mikrodialysekatheters signifikante Unterschiede in der Implantat-Gewebe-Interaktion bei Ratten und Menschen, wobei allein biochemische Parameter bei beiden Spezies untersucht wurden. Als Ursache wird ein Zusammenspiel der physikalischen, vaskulären und metabolischen Unterschiede in Anatomie sowie FBR zwischen Mensch und Ratte vermutet (Helton et al., 2011; Wisniewski et al., 2002). Ferner ergab ein Vergleich der FBR zwischen Ratten und Mäusen bei der Ratte eine stärkere zelluläre Immunantwort nach Implantation eines Biomaterials (Khouw et al., 2000b; Kidd et al., 2002). Für verschiedene Rattenstämme wurde dagegen eine vergleichbare FBR beobachtet. Die Translation der experimentell gewonnenen Ergebnisse der Pilotstudie auf humane Verhältnisse wird zudem durch die Verwendung eines Inzuchtstammes eingeschränkt, der zwar mit einem hohen Maß an Standardisierung einhergeht, jedoch gleichzeitig die Heterogenität von menschlichen Individuen unberücksichtigt lässt.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse der Pilotstudie durch die ausschließliche Verwendung weiblicher Ratten kann nicht ausgeschlossen werden. Bei Tieren und Menschen ist der Geschlechtsdimorphismus im Immunsystem gut beschrieben (Klein und Flanagan, 2016). So entwickeln weibliche Individuen verstärkte angeborene und erworbene Immunantworten im Vergleich zu männlichen Individuen. Sexualhormone wie beispielsweise Östrogen können das Immunsystem modulieren, indem sie die Differenzierung und Funktion von Leukozyten beeinflussen (Ahmed und Talal, 1990; Chao et al., 1995). Dalu et al. (2000) verglichen die FBR bei männlichen und weiblichen Mäusen nach subkutaner Implantation eines Polymers, um einen möglichen Geschlechtsdimorphismus bei der FBR zu untersuchen. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich der auftretenden Zellpopulationen, der Stärke der Entzündungsreaktion und der Ausbildung der Fremdkörperkapsel zwischen den beiden Geschlechtern aufgefunden, jedoch wiesen die weiblichen Tiere höhere Zytokinpiegel in der Implantatumgebung auf. Aufgrund dieser erhöhten Zytokinpiegel gingen die Autoren von einer gesteigerten Aktivität der implantatnahen Leukozyten bei den weiblichen Mäusen aus. Die Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 enthält keine Empfehlungen bezüglich des Geschlechts der Versuchstiere für die Prüfung auf lokale biologische Effekte nach Implantation. Die Verwendung von ausschließlich weiblichen Tieren in der Pilotstudie ermöglichte eine komplikationslose Haltung in Kleingruppen und eine einfache Handhabung der Tiere. Morris und Komocsar (1997) fanden zudem unter physiologischen Bedingungen keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede beim Vergleich von durchflusszytometrisch analysierten Lymphozytenpopulationen in Blut und Milz der Ratte.

Das Tiermodell Ratte erwies sich ungeachtet der zuvor aufgeführten Limitationen als geeignet, da die durchgeführte Implantationsstudie Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Biomaterialien darstellte und alle Fragestellungen beantworten konnte.

5.2 Validität der Methoden

5.2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Pilotstudie erfolgte die Untersuchung der FBR auf Mg-Implantate, da reines Magnesium häufig als Kontrollwerkstoff in weiterführenden Studien zur Untersuchung des Korrosionsverhaltens und der Gewebeantwort von Magnesiumlegierungen eingesetzt wird (Walker et al., 2014; Zainal Abidin et al., 2013).

Die Materialien PEEK und PS dienten gemäß DIN EN ISO 10993-6:2009-08 als Kontrollwerkstoffe. Das Polymer PEEK wurde als Negativkontrolle angesehen, da zahlreiche Autoren nach Implantation von PEEK eine milde FBR beobachteten (Jockisch et al., 1992; Petillo et al., 1994; Williams et al., 1987). Für das Polymer PS wurde einerseits eine milde FBR auf scheibenförmige Proben aus PS-Zellkulturflaschen beschrieben, andererseits führte die Implantation von PS in Partikelform zu einer deutlichen lokalen Immunantwort (Bratlie et al., 2010; Gretzer et al., 2006). Implantate aus PS-Zellkulturflaschen sind zwar ebenso wie die verwendeten PS-Implantate solide, jedoch sind Zellkulturflaschen häufig beschichtet. Die Implantate dieser Studie waren zudem in Form und Größe nicht mit den zuvor beschriebenen PS-Implantaten aus Zellkulturflaschen vergleichbar. Zysk et al. (2005) beobachteten nach Injektion von unterschiedlich großen PS-Partikeln in Mäuse eine lokale Immunantwort auf PS-Partikel jeder Größe. Zusätzlich stellten die Autoren eine Abnahme der Stärke der FBR mit zunehmender Partikelgröße fest. Letztlich wurde für die verwendeten soliden PS-Implantate eine FBR von mittlerem Ausmaß erwartet. Auf die Implantation einer Positivkontrolle mit starker FBR wurde im Sinne des Tierwohls und unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips verzichtet.

Bei bisherigen Studien zur Biomaterialforschung im Rattenmodell wurde häufig eine Gruppengröße von sechs Tieren gewählt (Kim et al., 2010; Lucke et al., 2015; Maiborodin et al., 2013; Vaisman et al., 2010). Entsprechend den Empfehlungen für die Fallzahlplanung von Tierversuchen in der medizinischen Grundlagenforschung ist für eine Pilotstudie an Mäusen und Ratten eine Versuchstierzahl von mindestens fünf Tieren pro Gruppe vorgesehen, damit statistische Analysen möglich sind (Mayer und Muehe, 2013). Eine Pilotstudie ist eine Studie mit neuen Ansätzen, für die eine vorherige Fallzahlabeschätzung aufgrund fehlender Vorinformationen nicht möglich ist. Im Rahmen dieser Pilotstudie stellte die durchflusszytometrische Untersuchung der subkutanen und intramuskulären Fremdkörperkapsel der Ratte einen neuen Forschungsansatz dar. Die Verwendung von sechs Tieren pro Gruppe ermöglichte trotz einiger ausgeschlossener Proben (Tab. A9) eine statistische Auswertung der Versuchsdaten und lieferte aussagekräftige Resultate. Eine weitere Reduzierung der Gruppengröße im Sinne des 3R-Prinzips wäre daher nicht sinnvoll gewesen.

Die Untersuchungszeitpunkte Tag 1, 3, 7, 14, 21 und 28 bildeten die wesentlichen Vorgänge der FBR in den ersten vier Wochen nach Implantation zeitlich ab. In anderen Studien zur Untersuchung der FBR auf Biomaterialien wurden ähnliche Zeitpunkte gewählt (Khouw et al., 2000a; Patino et al., 2003; Sheng et al., 2014).

Die Norm DIN EN ISO 10993-6:2009-08 empfiehlt für die Beurteilung der lokalen biologischen Effekte nach Implantation den Einsatz von Kontrollwerkstoffen mit bekannter Biokompatibilität oder die Durchführung von Scheineingriffen (engl. *sham surgery*). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die FBR auf Mg mit der Gewebereaktion auf

den Kontrollwerkstoff PEEK verglichen. Als weiteres Vergleichsmaterial diente das permanente Polymer PS. In Anlehnung an andere vergleichende Studien der Biomaterialforschung wurde auf zusätzliche Scheineingriffe ohne Implantation eines Materials verzichtet (Chen et al., 2017; Erdmann et al., 2010; Miura et al., 2016). Durch diesen Verzicht sollte einerseits im Sinne des 3R-Prinzips die benötigte Versuchstierzahl geringgehalten werden, andererseits waren die Effekte des chirurgischen Eingriffes selbst bei allen Implantationen vorhanden und mussten nicht mithilfe eines Scheineingriffes ausgeschlossen werden. Vorrangiges Ziel der Pilotstudie war zudem die Detektion von Unterschieden zwischen den verschiedenen Implantatmaterialien.

Zu Beginn der Pilotstudie trat bei einigen Blutentnahmen eine Koagulation des Blutes auf, obwohl die venösen bzw. kardialen Punktionen an den lebenden Tieren von einer erfahrenen Tierärztin durchgeführt und die Empfehlungen zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren der GV-SOLAS (2009) berücksichtigt wurden. Im Verlauf der Pilotstudie verbesserte sich die Entnahmetechnik, sodass die Blutproben ohne Koagulation gewonnen werden konnten.

Bei der Entnahme der subkutanen Implantate fiel häufig eine Abweichung der Lage der Implantate vom ursprünglichen Implantationsort auf. Die Migration von subkutanen Implantaten bei der Ratte, die hauptsächlich auf Muskelkontraktionen der sich bewegendenden Tiere zurückzuführen ist, wurde bereits von Maiborodin et al. (2013) beschrieben. Der anatomische Aufbau der Rattenhaut aus dünnem, lockeren Haut- und Unterhautgewebe sowie zahlreichen Muskelfasern für die Piloerektion begünstigte zudem die Implantatmigration (Helton et al., 2011; Wisniewski et al., 2002).

Für die Etablierung der durchflusszytometrischen Analyse der Fremdkörperkapsel stellte die Gewinnung einer vollständigen Fremdkörperkapsel, der möglichst wenig Umgebungsgewebe anhaftete, einen wichtigen Schritt dar. Die Präparation und Entnahme der Fremdkörperkapseln an Tag 1 und 3 nach Implantation von PEEK, PS und Mg gestaltete sich vor allem zu Beginn der Pilotstudie schwierig, da nur eine dünne Fremdkörperkapsel vorhanden war und diese sich nur schwer vom Umgebungsgewebe abgrenzen ließ. Ein weiteres Problem bestand bei Entnahme der nach axillär oder zervikal verschobenen subkutanen Implantate. Hier war eine Abgrenzung der Fremdkörperkapsel von lokalen Lymphknoten kaum möglich. Die Arbeit unter Schutzatmosphäre in der Glovebox während der Entnahme der Mg-Implantate erwies sich ebenfalls als schwierig. Insgesamt verbesserte sich im Verlauf der Studie die Entnahmetechnik sowie die Geschwindigkeit der Entnahme.

Bei der Gewinnung der Fremdkörperkapseln konnten Verluste von Implantat-adhären-ten Leukozyten weitgehend ausgeschlossen werden, obwohl nach Entfernung der Fremdkörperkapseln keine Spülung der Implantate vorgenommen wurde. Es ließen sich durchflusszytometrisch zahlreiche ein- und mehrkernige Makrophagen im Probenmaterial nachweisen, deren direkte Adhäsion an die Implantatoberfläche umfangreich beschrieben wurde (Anderson et al., 2008; Chang et al., 2009; Marchant et al., 1984). Ferner wurde auf eine Spülung sämtlicher Implantate verzichtet, um die Korrosionsanalyse der Mg-Implantate nicht zu beeinflussen und die Vergleichbarkeit zu den Kapselproben der Kontrollwerkstoffe zu gewährleisten.

5.2.2 Durchflusszytometrie

Das etablierte durchflusszytometrische Untersuchungsverfahren ermöglichte eine objektive, schnelle, quantitative sowie multiparametrische Analyse der Leukozytenpopulationen in der Fremdkörperkapsel auf Einzelzellebene. Im Gegensatz zur histopathologischen Untersuchung, die den Goldstandard zur Beurteilung der lokalen Effekte nach Implantation darstellt, lieferte die Durchflusszytometrie jedoch keine Erkenntnisse zum Aufbau des Kapselgewebes sowie zu histopathologischen Veränderungen des Gewebes in der Implantatumgebung (DIN EN ISO 10993-6:2009-08). Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung und Darstellung der Leukozytenpopulationen im zeitlichen Verlauf der FBR, wofür sich die Durchflusszytometrie hervorragend eignete.

Durchflusszytometer und Antikörper-Panel

Das verwendete Durchflusszytometer besaß zwei Scatter-Kanäle, acht Fluoreszenz-Kanäle sowie drei Laser, wodurch die Auswahl der zu untersuchenden Oberflächenantigene begrenzt war. Ein komplexeres Durchflusszytometer mit mehr Fluoreszenz-Kanälen und Lasern stand in der FACS-Core-Unit des BCRT für die Pilotstudie nicht zur Verfügung.

Das verwendete Antikörper-Panel zur durchflusszytometrischen Analyse der Blut- und Milzproben zielte auf einen Nachweis einer systemischen Entzündungsreaktion ab und beinhaltete Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper zur Identifizierung von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Eine systemische Immunantwort ist typischerweise durch einen initialen Anstieg der Leukozytenzahl im Blut charakterisiert. Zusätzlich steigt der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten vor allem in der Frühphase der Entzündung an (Kraft et al., 2005). Die Verwendung eines umfangreicheren Antikörper-Panels mit Zellsubtypmarkern für die differenzierte Untersuchung der Leukozytenpopulationen in Blut und Milz der Ratte war einerseits materialbedingt nicht möglich, andererseits zur Beantwortung der Fragestellung auch nicht erforderlich (Barnett-Vanes et al., 2016).

Für die Untersuchung der lokalen Immunantwort auf Biomaterialien wurde ein komplexes Antikörper-Panel mit Verwendung von Zellsubtypmarkern etabliert. Bei der Auswahl der Antikörper stand die Identifizierung der typischen Zellpopulationen der FBR wie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und T-Lymphozyten im Vordergrund. Ein Problem stellte die eingeschränkte Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern für die Durchflusszytometrie bei der Ratte dar. Infolge musste für die Markierung von Mastzellen der Ratte auf einen kreuzreaktiven anti-Maus-Antikörper (ACK2) zurückgegriffen werden, der in den Vorversuchen positive Färbeergebnisse in der Haut der Ratte erzielte, jedoch in der Fremdkörperkapsel keine Zellen anfärbte (Kim et al., 1998).

Eine Validierung der durchflusszytometrischen Ergebnisse erfolgte durch morphologische Charakterisierung der Zellpopulationen mittels Zellsortierung, Zytozentrifugation und Lichtmikroskopie (Barnett-Vanes et al., 2016).

Aufarbeitung des Probenmaterials

Die Durchflusszytometrie wurde ursprünglich zur Untersuchung von Zellen des Blutes entwickelt (Givan, 2001). Diese Methode bietet jedoch das Potential auch Zellen aus festen Geweben zu untersuchen, wobei das Hauptproblem in der Gewinnung einer vitalen Einzelzellsuspension aus dem soliden Gewebe besteht (Campanella et al., 2002). Die Isolierung von Zellen aus einem Gewebe wird meist mittels enzymatischer

und/oder mechanischer Zerkleinerung durchgeführt (Barnett-Vanes et al., 2016; Caraher et al., 2000). In dieser Arbeit wurde erstmals erfolgreich eine vitale, heterogene Einzelzellsuspension aus der kollagenreichen subkutanen sowie intramuskulären Fremdkörperkapsel mittels enzymatischem Verdau und mechanischer Zerkleinerung für eine durchflusszytometrische Analyse gewonnen.

Für die Gewinnung einer vitalen Einzelzellsuspension aus Blut, Milz- und Kapselgewebe waren mehrere Schritte wie Mischen, Zentrifugieren, Entfernen des Überstandes und Resuspendieren zur Aufarbeitung der Proben erforderlich. Bei jedem Waschschrift gingen Zellen verloren, wodurch sich die gemessene absolute Zellzahl der Leukozyten verringerte (Caldwell und Taylor, 1986).

Die durchflusszytometrisch gemessenen absoluten Leukozytenzahlen im Blut waren nicht mit den Referenzwerten aus der Literatur (Tab. 25) vergleichbar, da für die Erstellung eines automatisierten Differentialblutbildes in hämatologischen Laboren routinemäßig keine Antikörperfärbungen und Waschschrift durchgeführt werden (Dörner et al., 2009). Somit musste ein eigener, studieninterner Referenzbereich aus den präoperativen Blutproben gebildet werden. Auch für die Beurteilung der absoluten Leukozytenzahl in der Milz hätte ein studieninterner Referenzbereich erstellt werden müssen, jedoch wurde dies unter Berücksichtigung einer Verminderung der Versuchstierzahl im Sinne des 3R-Prinzips zunächst zurückgestellt. Bei Auftreten einer deutlichen systemischen Immunantwort im Blut, wäre im Nachhinein ein studieninterner Referenzbereich mit Tieren aus einer Tötungsanzeige gebildet worden. Tiere von anderen Arbeitsgruppen, die in Stamm, Größe, Gewicht, Alter und Geschlecht den Versuchstieren entsprachen, standen nicht zur Verfügung.

Im Rahmen der Aufarbeitung der Fremdkörperkapseln zu einer vitalen Einzelzellsuspension erfolgte eine Filtration der Proben durch ein 100 µm Zellsieb. Eine zusätzliche Filtration der Proben durch ein 35 µm Zellsieb unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer war durch die FACS-Core-Unit des BCRT vorgeschrieben, um eine Verstopfung der Messkapillare im Durchflusszytometer zu verhindern. Die hierdurch aufgetretenen Zellverluste konnten nicht vermieden werden. Zur Evaluierung der zurückgehaltenen Zellen in den Zellsieben wurden diese mit Phosphatpuffer gespült. Die entstandene Lösung wurde nach Zytozentrifugation und anschließender histologischer Färbung lichtmikroskopisch untersucht. In den Spülungen der 100 µm Zellsiebe ließen sich unverdaute Gewebefragmente finden, die von ein- und mehrkernigen Makrophagen umgeben waren. In den histologischen Präparaten der 35 µm Zellsiebe waren hingegen keine Zellen nachweisbar.

Das entnommene Kapselgewebe war zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (Tag 1 und Tag 3) aufgrund von Blutansammlungen teilweise stark mit Erythrozyten kontaminiert. Im Rahmen der Pilotstudie war eine Lyse der Erythrozyten in den Kapselproben jedoch nicht vorgesehen, um eine möglichst große Zahl vitaler Leukozyten aus der Fremdkörperkapsel zu gewinnen (Terstappen et al., 1989). Um die Vergleichbarkeit mit den Kapselproben der anderen Zeitpunkte nicht zu gefährden, wurden die Erythrozyten auch nach Auftreten des Problems nicht lysiert.

Tab. 25: Referenzwerte für die Leukozytenpopulationen im Blut der Ratte

Zellpopulation	Leukozyten im peripheren Blut (Mittelwert \pm SD)	Leukozyten im peripheren Blut (2,5 % Perzentil–97,5 % Perzentil)	Leukozyten im peripheren Blut (Referenzbereich)
Leukozyten/ μ l Blut	5300 \pm 2000	4800–16600	5000–25000
Lymphozyten	81,5 \pm 3,6 %	77,0–96,0 %	65–84 %
Monozyten	1,8 \pm 0,5 %	0,0–4,0 %	0–5 %
neutrophile Granulozyten	13,6 \pm 2,9 %	3,0–21,8 %	9–34 %
Versuchstiere	11–12 Wochen alte weibliche Lewis Ratten (n = 10)	7–10 Wochen alte weibliche Sprague-Dawley Ratten (n = 784)	Ratte, keine genaueren Angaben
Referenz	Harlan (2010)	Bailly und Duprat (1990)	Baker et al. (2006)

SD = Standardabweichung, n = Stichprobenumfang

Messung der Proben

Die durchflusszytometrische Messung der mit Blut kontaminierten Kapselproben bereitete Probleme, da die hohe Zahl an Erythrozyten während der durchflusszytometrischen Messung zu einer Ereignisrate von mehr als 10^4 Ereignissen pro Sekunde führte. Oberhalb dieser Grenze war im Durchflusszytometer ein laminarer Probenstrom aus einzelnen Zellen nicht mehr gewährleistet, sodass die Proben verdünnt werden mussten. Die Berechnung der absoluten Leukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel war nur mithilfe des Verdünnungsfaktors möglich. Dieser wurde anfänglich nicht dokumentiert, da zu Beginn der Pilotstudie eine Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel nicht vorgesehen war. Eine Wiederholung der Versuche an 26 Tieren konnte demzufolge leider nicht vermieden werden (Tab. 7).

Bei Proben mit hoher Gesamtzahl an Ereignissen konnte keine vollständige Fremdkörperkapsel gemessen werden, da die maximale Anzahl der gemessenen Ereignisse mit der verwendeten Softwareversion des Durchflusszytometers bei den gewählten Einstellungen je Messung auf $2,7 \cdot 10^6$ Ereignisse begrenzt war. Bei den unvollständig gemessenen Fremdkörperkapseln konnte mithilfe des gemessenen und des gesamten Probenvolumens die absolute Leukozytenzahl berechnet werden.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung traten sporadisch Auffälligkeiten im FSC/SSC-Diagramm sowie im Färbeverhalten der subkutanen Kapselproben auf, die unabhängig vom implantierten Material und dem Untersuchungszeitpunkt waren (Abb. 42). Diese Proben wiesen einen deutlich erhöhten Anteil der T-Lymphozyten und der nicht spezifisch gefärbten Leukozyten an den lebenden Leukozyten der Fremdkörperkapsel auf, dagegen waren die Anteile der neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen erniedrigt. Die Proben waren hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl unauffällig. Die Fremdkörperkapseln nach intramuskulärer Implantation waren nicht betroffen. Makroskopisch wurde nach subkutaner Implantation gelegentlich eine Migration der Implantate nach axillär oder zervikal beobachtet. Der hohe Anteil der Lymphozyten an den lebenden Leukozyten in den betroffenen Proben ließ demzufolge auf eine Kontamination der subkutanen Fremdkörperkapseln mit lymphatischem Gewebe schließen, was zu einem Ausschluss der Proben führte (Tab. A9).

Das etablierte Gating für Blut und Milz bzw. Fremdkörperkapsel ermöglichte eine gute Abgrenzung der einzelnen Zellpopulationen entsprechend ihrer Antigenexpression. Obwohl sich die Anteile der Zellpopulationen in der Fremdkörperkapsel im Verlauf der FBR kontinuierlich veränderten, konnte das Gating für alle Kapselproben angewendet werden.

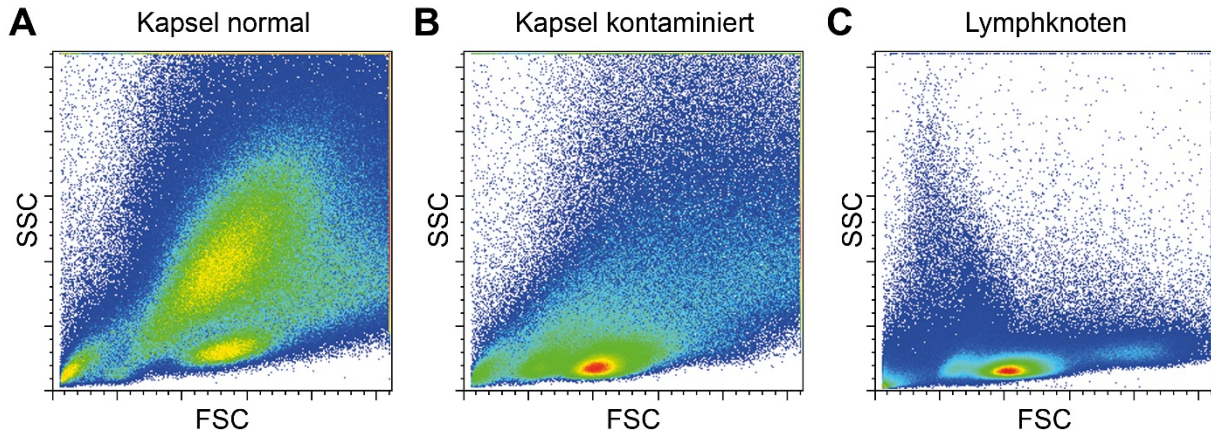


Abb. 42: FSC/SSC-Diagramm von subkutanen Fremdkörperkapseln und Lymphknoten der Ratte
 A: subkutane Fremdkörperkapsel 28 Tage nach Implantation von Polyetheretherketon, B: mit lymphatischem Gewebe kontaminierte subkutane Fremdkörperkapsel 28 Tage nach Implantation von Polyetheretherketon, C: axillärer Lymphknoten

5.2.3 Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Krankheitserreger

Bakterien stellen typische Erreger der postoperativen Wundinfektion dar (RKI, 2007). Zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination während des chirurgischen Eingriffes wurde eine RTQ-PCR von Gewebeproben aus der Implantatumgebung durchgeführt. Andere Krankheitserreger konnten aufgrund der spezifisch pathogenfreien Aufzucht der Versuchstiere und der Anwendung der FELASA Richtlinien zur Gesundheitsüberwachung von Versuchstierhaltungen weitgehend ausgeschlossen werden (Mähler et al., 2014). In den Haltungsräumen der FEM erfolgten entsprechend dieser Richtlinien regelmäßige Untersuchungen von indirekten Sentinel-Tieren auf Viren, Parasiten, Pilze und Bakterien.

5.2.4 *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit

Die Bestimmung der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit von Mg anhand des Masseverlustes der Implantate wird häufig als Korrosionsnachweismethode eingesetzt und gilt als zuverlässig (Song, 2005; Xue et al., 2012). Vor dem Wiegen der korrodierten Implantate wurden die Korrosionsprodukte und organischen Bestandteile von der Magnesiumoberfläche durch eine Behandlung mit einer wässrigen Lösung von Chrom(VI)-oxid entfernt (Kirkland et al., 2012; Reifenrath et al., 2015). Aufgrund der zu erwartenden geringen Masseverluste für die frühen Untersuchungszeitpunkte und der Messgenauigkeit der Präzisionswaage musste mit einer großen Streubreite der Korrosionsgeschwindigkeit für diese Zeitpunkte gerechnet werden.

5.2.5 Statistisches Modell

Das gewählte statistische Modell erwies sich als geeignet, denn es ermöglichte eine gleichartige Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse aus Blut, Milz sowie subkutaner und intramuskulärer Fremdkörperkapsel. Die zweifaktorielle ANOVA gestattete die gleichzeitige Erfassung von Unterschieden zwischen den Gruppen Material und Zeitpunkt sowie möglicher Interaktionen zwischen den beiden Faktoren. Der anschließende Mann-Whitney-U-Test berücksichtigte als nichtparametrischer Test eine Verletzung der Annahmen hinsichtlich Normalverteilung der Residuen und Varianzgleichheit zwischen den Gruppen. Eine Kombination aus Mann-Whitney-U-Test und nachfolgender Bonferroni-Holm-Prozedur erlaubte Vergleiche zwischen ausgewählten Untersuchungszeitpunkten ohne übermäßige Erhöhung des Signifikanzniveaus durch multiple Mehrfachvergleiche zwischen den Gruppen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Durchflusszytometrische Untersuchung des Blutes und der Milz

Die Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8a ermöglichte die sichere Analyse von T-Helferzellen (CD3+CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8a+) im Blut und in der Milz der Ratte (Morris und Komocsar, 1997). Weiterhin wurden doppelt positive T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD8a+) in Blut und Milz nachgewiesen, die ausführlich von Kenny et al. (2000) und Jimenez et al. (2002) bei der Ratte beschrieben wurden. Aufgrund des sehr kleinen prozentualen Anteils an den lebenden Leukozyten wurden die doppelt positiven T-Lymphozyten nicht weiter betrachtet. Auf den zusätzlichen Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen NK-Zellen und B-Lymphozyten der Ratte wurde entsprechend der Fragestellung der Pilotstudie und der zur Verfügung stehenden instrumentellen Ausstattung verzichtet.

Obwohl die Antikörper CD11b/c und HIS48 jeweils Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen der Ratte markieren, konnten innerhalb der CD3-negativen Zellpopulation in Blut und Milz fünf verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer unterschiedlichen Expression von CD11b/c und HIS48 unterschieden werden: Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, aktivierte Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und B-Lymphozyten. Dies steht im Einklang mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen von Fecho und Lysle (2002), die vier Subpopulationen von Leukozyten unter Verwendung von CD11b/c und HIS48 als Oberflächenmarker im entzündeten Peritonealexsudat der Ratte nachwies. Neutrophile Granulozyten stellten sich übereinstimmend als CD11b/c+HIS48med dar.

Fecho und Lysle (2002) nahmen an, dass die Zellen im Gate CD11b/c-HIS48- T-Lymphozyten repräsentierten, da im untersuchten Material ein Vorkommen von B-Lymphozyten ausgeschlossen und ein spezifischer T-Zellmarker nicht eingesetzt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch nach Ausschluss der T-Lymphozyten die Leukozyten innerhalb des Gates CD3-CD11b/c-HIS48- unter Berücksichtigung der morphologischen Charakteristika als B-Lymphozyten identifiziert werden.

Im Blut und in der Milz der Versuchstiere ließen sich analog zu Barnett-Vanes et al. (2016) zwei Subpopulationen von Monozyten/Makrophagen anhand ihrer unterschiedlichen Expressionsstärke von HIS48 und CD4, ihrer Streulicht-Parameter sowie ihrer morphologischen Eigenschaften differenzieren. Die Monozyten/Makrophagen im Gate CD3-CD11b/c+HIS48high waren im FSC/SSC-Diagramm größer und besaßen eine höhere Granularität als die HIS48low-Monozyten/Makrophagen. Zudem exprimierten nur die HIS48low-Monozyten/Makrophagen das CD4-Antigen auf ihrer Zelloberfläche. Swirski et al. (2009) identifizierten ebenfalls zwei unterschiedliche Monozytenpopulationen anhand der Expression von Ly6C in Blut und Milz von Mäusen, wobei zwischen ortsständigen Monozyten (Ly6Clow) und inflammatorischen Monozyten (Ly6Chigh) unterschieden wurde. Die Expression von HIS48 auf der Zelloberfläche von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten der Ratte erscheint analog zur Expression von Ly6C auf murinen Monozyten und Granulozyten (Barnett-Vanes et al., 2016). Somit konnten die HIS48high-Zellen als aktivierte inflammatorische Monozyten und die HIS48low-Zellen als ortsständige Monozyten/Makrophagen identifiziert werden.

In Ergänzung zu Fecho und Lysle (2002) ermöglichte die kombinierte Analyse der Expression von CD11b/c und HIS48 von Blut- und Milzleukozyten den Nachweis einer zusätzlichen fünften Zellpopulation. Die Zellen des Gates CD3-CD11b/c+HIS48- konnten mittels Zellsortierung von Blutleukozyten, Zytozentrifugation und histologischer Färbung als NK-Zellen erkannt werden.

5.3.2 Beurteilung der systemischen Immunantwort

In der vorliegenden Arbeit wurde eine durchflusszytometrische Analyse etabliert, um die systemische Immunantwort auf die Implantation von verschiedenen permanenten und bioresorbierbaren Biomaterialien im Rattenmodell zu untersuchen. Die systemische Immunantwort nach Implantation eines Fremdkörpers wurde bisher nur unter Zuhilfenahme einfacher hämatologischer Analyseverfahren wie elektronischer Zählgeräte oder der manuellen Zelldifferenzierung mittels Zählkammer oder Blutausstrich evaluiert (Castellani et al., 2011; Paramitha et al., 2015; Zhang et al., 2009). Shieh et al. (2014) verwendeten die durchflusszytometrische Untersuchung von Milzgewebe bereits zur immunotoxikologischen Beurteilung von kollagenbasierten Biomaterialien nach Implantation im Rattenmodell, wobei nur die CD4-positiven und CD8a-positiven Zellen betrachtet wurden. Das etablierte durchflusszytometrische Antikörper-Panel erlaubte eine komplexere Charakterisierung, genauere Identifizierung sowie eine schnelle Quantifizierung der typischen Leukozytenpopulationen während der FBR in Blut und Milz der Ratte.

Blut

Die absolute Zellzahl der lebenden Leukozyten und die prozentualen Anteile der untersuchten Subpopulationen an den lebenden Leukozyten im Blut befanden sich nach Implantation der drei verschiedenen Materialien zu den gewählten Zeitpunkten innerhalb des studieninternen Referenzbereiches. Neben der Betrachtung der absoluten Leukozytenzahl im Blut dienten auch Abweichungen der Anteile der Subpopulationen als Indikator für die systemische Immunantwort (Noviana et al., 2012; Paramitha et al., 2015). Es wurde keine Leukozytose bzw. Leukopenie beobachtet und ein initialer Anstieg der neutrophilen Granulozyten blieb aus. Folglich konnte eine systemische

Immunantwort auf die drei untersuchten Implantatmaterialien PEEK, PS und Mg ausgeschlossen werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Paramitha et al. (2015), die nach Implantation von kleinen Stäben aus reinem Magnesium und anderen Metallen zwischen Knochen und Muskulatur von Mäusen keine nachteiligen Effekte der bioresorbierbaren Metallimplantate auf die Leukozyten des Blutes auffinden konnten. Auch nach Implantation von verschiedenen Magnesiumlegierungen in den Knochen der Ratte befanden sich die erhobenen Parameter im Blut innerhalb der physiologischen Referenzwerte und es konnte keine systemische Entzündungsreaktion infolge der Implantation nachgewiesen werden (Castellani et al., 2011; Zhang et al., 2009).

Die durchflusszytometrische Analyse der finalen Blutproben ergab für die untersuchten prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen an den lebenden Leukozyten einzeln signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Diese signifikanten Unterschiede lagen jedoch innerhalb des studieninternen Referenzbereiches und wurden als physiologische Schwankungen der Zellpopulationen angesehen. Paramitha et al. (2015) beobachteten im Blut nach der Implantation von reinem Magnesium ebenfalls signifikante Veränderungen der Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf, jedoch war eine direkte Vergleichbarkeit mit den Daten dieser Studie nicht gegeben, da sich die Implantatlokalisierung, die gewählten Untersuchungszeitpunkte sowie das verwendete Tiermodell unterschieden.

Eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl im Blut als unspezifische Reaktion auf das Operationstrauma wurde ebenfalls nicht beobachtet (Fasching et al., 1988). Ein systemischer Effekt auf einzelne Leukozytenpopulationen infolge des chirurgischen Eingriffes könnte jedoch nur mittels Scheineingriff vollständig ausgeschlossen werden.

In den finalen Blutproben befand sich der prozentuale Anteil der NK-Zellen an den lebenden Leukozyten aller Materialien zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten an der unteren Grenze des studieninternen Referenzbereiches. Als Ursache für den Abfall des Anteils der NK-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl im Blut kann eine Rekrutierung der Zellen in die Implantatumgebung angesehen werden (Vivier et al., 2008). Die von Grooteman et al. (1996) beschriebene Verringerung des Anteils von NK-Zellen im Blut von Dialysepatienten nach Exposition gegenüber biopolymerhaltigen Dialysemembranen kann möglicherweise analog zum Abfall des Anteils der NK-Zellen bei PS bzw. PEEK gesehen werden, da sie ebenfalls zu den Polymeren gehören. Eine Abnahme des Anteils der NK-Zellen im Blut nach Implantation von Mg kann damit jedoch nicht erklärt werden. Letztlich bleibt der verminderte Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut während der FBR auf PEEK, PS und Mg unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Milz

Die Interpretation der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Leukozyten der Milz gestaltete sich schwierig, da keine studieninternen Referenzwerte zur Verfügung standen und Referenzwerte aus der Literatur eine große Schwankungsbreite zeigen (Tab. 26). Auf eine Erhebung eines studieninternen Referenzbereiches wurde jedoch bewusst verzichtet, da die finalen Blutwerte bereits keinen Hinweis auf eine systemische Immunantwort lieferten und die benötigte Versuchstierzahl im Sinne des 3R-Prinzips nicht erhöht werden sollte.

Die gemessenen prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen an der Gesamtleukozytenzahl in der Milz waren am ehesten mit den Ergebnissen von Ladics und

Loveless (1994) vergleichbar, die Leukozytenpopulationen in der Milz der Ratte für spätere immunotoxikologische Studien durchflusszytometrisch untersuchten. Zudem wurde im zeitlichen Verlauf eine weitgehend konstante Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen in der Milz beobachtet. Somit ergaben sich nach der durchflusszytometrischen Untersuchung von Milzgewebe nach Implantation aller drei Implantatmaterialien keine Hinweise auf eine systemische Immunantwort.

Eine Auffälligkeit stellte der signifikante Unterschied des prozentualen Anteils der aktivierten inflammatorischen Monozyten/Makrophagen (CD3-CD11b/c+HIS48high) an den lebenden Leukozyten in der Milz zwischen Tag 1 und 3 nach der Implantation von PEEK, PS und Mg dar. Von Swirski et al. (2009) wurde die Milz als ein extramedullärer Speicherort für inflammatorische und ortsständige Monozyten beschrieben, welcher im Rahmen einer Gewebeverletzung eine große Zahl an Monozyten mobilisieren kann. Ein Tag nach einer ischämischen Myokardverletzung im Mausmodell war die Zahl der inflammatorischen Monozyten der Milz signifikant vermindert, gleichzeitig erhöhte sich ihre Anzahl im Blut im Vergleich zu den präoperativen Werten signifikant (Swirski et al., 2009). Der Effekt im Blut konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

Tab. 26: Referenzwerte für die Leukozytenpopulationen in der Milz der Ratte

Zellpopulation	Prozent an gesamten Zellen der Milz (Mittelwert \pm SD)	Prozent an Gesamtleukozyten der Milz (Mittelwert \pm SD)	Prozent an lebenden Leukozyten der Milz
Lymphozyten	88 \pm 1	k. A.	k. A.
T-Lymphozyten	51 \pm 1	39,9 \pm 3,4	31,5–33,5
CD4+	30 \pm 1	23,7 \pm 2,6	21,5–26,5
CD8+	24 \pm 1	16,3 \pm 2,2	14–18
B-Lymphozyten	32 \pm 3	54,8 \pm 3,9	51–59
Monozyten/Makrophagen	8 \pm 0,5	k. A.	k. A.
Granulozyten	4 \pm 0,3	k. A.	k. A.
Versuchstiere	7–10 Wochen alte männliche CD-Ratten	10–14 Wochen alte weibliche Sprague-Dawley Ratten	Ratte (kein Stamm angegeben)
Referenz	Ladics und Loveless (1994)	Morris und Komocsar (1998)	Bio-Rad (2017)

SD = Standardabweichung, k. A. = keine Angabe

5.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Fremdkörperkapsel

Die im Rahmen dieser Pilotstudie etablierte durchflusszytometrische Untersuchung der Fremdkörperkapsel stellt ein neuartiges Verfahren zur Evaluierung der FBR und der daraus resultierenden Biokompatibilität von Implantatmaterialien dar. Erstmals wurden die Leukozyten einer gesamten Fremdkörperkapsel durchflusszytometrisch untersucht, wohingegen in bisherigen Studien mit Käfig-Implantat-Systemen oder

röhrenförmigen Implantaten nur die Zellen des Exsudates untersucht wurden (Petillo et al., 1994; Rhodes et al., 1994; Rodriguez et al., 2008). Bei ausschließlicher Analyse des Exsudates werden die Leukozyten der bindegewebigen Kapsel und des Granulationsgewebes sowie die Implantat-adhärenz Zellen nicht betrachtet.

Die T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in der Fremdkörperkapsel wurden, wie auch von Rodriguez et al. (2008), anhand ihrer charakteristischen Oberflächenantigene identifiziert. Die kombinierte durchflusszytometrische Analyse der Expression von HIS48 und CD4 ermöglichte die Identifizierung von fünf verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der CD3-negativen Zellen der Fremdkörperkapsel: neutrophile Granulozyten und CD4-negative Monozyten/Makrophagen, frühe Monozyten/Makrophagen, eosinophile Granulozyten, späte ein- und mehrkernige Makrophagen sowie eine heterogene Population aus Mastzellen, NK-Zellen und nicht spezifisch gefärbten Leukozyten.

Rodriguez et al. (2008) identifizierten ebenfalls Monozyten und Makrophagen der Ratte anhand ihrer doppelt positiven Expression von HIS48 und CD4 im Exsudat nach Implantation eines Käfig-Implantat-Systems. In der vorliegenden Arbeit wurden diese doppelt positiven Monozyten/Makrophagen entsprechend ihres zeitlichen Auftretens während der FBR, ihrer Antigenexpression und ihrer Morphologie in frühe Monozyten/Makrophagen bzw. späte ein- und mehrkernige Makrophagen eingeteilt. Der Antikörper-Klon HIS36 erlaubte die Unterscheidung zwischen rekrutierten und gewebeständigen Makrophagen innerhalb der frühen Monozyten/Makrophagen und späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der Fremdkörperkapsel (Dörger et al., 2001).

Ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit war das Auffinden von Monozyten/Makrophagen in der Fremdkörperkapsel, die die Oberflächenantigene CD4 und CD8a gleichzeitig exprimierten. Baba et al. (2006) beobachteten nach induzierter Myokarditis im Blut und im entzündeten Myokard der Ratte eine Population von Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp, die sich durch eine doppelt positive Expression von CD4 und CD8a auszeichnete. Die Autoren postulierten, dass diese Zellen einen hämatogenen Ursprung hätten und während der akuten Entzündungsreaktion zum Entzündungsort migrieren würden. Nach eingehender Literaturrecherche wurde ein Auftreten von Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp (CD4+CD8a+) während der FBR im Rattenmodell bisher nicht beschrieben.

Während Monozyten und Makrophagen der Ratte mehrheitlich als CD4-positive Zellen beschrieben werden, konnte im Rahmen dieser Studie ein geringer Anteil an CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel nachgewiesen werden (Barclay, 1981; Jefferies et al., 1985). Nach Scriba et al. (1997) geht die fehlende Expression von CD4 auf der Zelloberfläche von Monozyten der Ratte mit einer Aktivierung der Zellen einher. In Übereinstimmung mit Barnett-Vanes et al. (2016) wurden in der vorliegenden Arbeit die aktivierten inflammatorischen HIS48^{high}-Monozyten in Blut und Milz der Ratte als CD4-negative Zellen identifiziert. Somit konnten die aufgefundenen HIS48-positiven und CD4-negativen Monozyten/Makrophagen in der Fremdkörperkapsel als aktivierte inflammatorische Monozyten/Makrophagen definiert werden, die vermutlich aus den aktivierten inflammatorischen Monozyten des Blutes bzw. der Milz (CD3-CD11b/c+HIS48^{high}) hervorgegangen sind.

Die Granulozyten in der Fremdkörperkapsel zeichneten sich durch ihre Expression von HIS48 und ihre deutliche Granularität im Seitwärtsstreulicht aus (Fecho und Lysle,

2002; Ysebaert et al., 2000). Innerhalb des Gates CD3-HIS48-CD4- wurden Mastzellen und NK-Zellen anhand ihrer Expression von CD8a von den nicht spezifisch gefärbten Leukozyten (CD3-HIS48-CD4-CD8a-) in der Fremdkörperkapsel differenziert (Cantrell et al., 1982; Lin et al., 1998). Unter Zuhilfenahme von Zellsortierung, Zytozentrifugation und histologischer Färbung konnten den nicht spezifisch gefärbten Leukozyten B-Lymphozyten und dendritische Zellen zugeordnet werden.

5.3.4 Beurteilung der lokalen Immunantwort

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnten mithilfe der Durchflusszytometrie erstmals die zeitlichen Verläufe der Zellpopulationen während der FBR auf Mg im Rattenmodell erfasst und detailliert dargestellt werden. Die bisherigen histopathologischen Studien von Zainal Abidin et al. (2013), Chen et al. (2017) und Walker et al. (2014) zur Beurteilung der FBR nach intramuskulärer Implantation von reinem Magnesium wiesen deutliche Limitationen auf: Die Evaluierung der FBR basierte auf einer subjektiven Beschreibung bzw. einer histomorphometrischen Untersuchung der Präparate. Weiterhin wurden nur Infiltrate von Makrophagen, Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen in der Implantatumgebung betrachtet. Die histopathologischen Präparate wurden klassisch mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und erlaubten somit keine spezifische Charakterisierung der Zellpopulationen. Zudem deckten die Untersuchungszeitpunkte ausschließlich die chronische Entzündungsreaktion und die Fremdkörperreaktion der FBR ab. Hingegen ermöglichte die etablierte durchflusszytometrische Analyse einer vollständigen Fremdkörperkapsel um ein subkutanes bzw. intramuskuläres Mg-Implantat die Identifizierung, Quantifizierung und multiparametrische Analyse der typischen Zellpopulationen der akuten und chronischen Entzündungsreaktion sowie der Fremdkörperreaktion in den ersten vier Wochen nach Implantation auf Einzelzellebene.

Analog zu Mg konnten die zeitlichen Verläufe der Zellpopulationen auch während der FBR auf PEEK und PS durchflusszytometrisch erfasst und detailliert dargestellt werden.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der subkutanen als auch der intramuskulären Fremdkörperkapsel nach Implantation von PEEK stimmten mit den Beobachtungen von Petillo et al. (1994) überein, die Leukozytenpopulationen im Exsudat um PEEK-Implantate in einem Käfig-Implantat-System an Tag 4, 7 und 14 nach subkutaner Implantation im Rattenmodell durchflusszytometrisch untersuchten. Zudem zeigte das zeitliche Auftreten der einzelnen Zellpopulationen während der FBR nur minimale Materialunterschiede zwischen den beiden permanenten Polymeren PEEK und PS. Der aufgefundene Verlauf der FBR für PEEK und PS stand mit dem von Anderson (1988) beschriebenen Verlauf der FBR für nicht resorbierbare Biomaterialien im Einklang (Abb. 1 und). Folglich wurde entgegen der erwarteten FBR mit mittlerem Ausmaß auf die soliden PS-Implantate eine mit PEEK vergleichbare milde, lokale Immunantwort beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich auch in den ersten vier Wochen nach intramuskulärer Implantation von bioresorbierbaren Mg-Implantaten ein sehr ähnlicher zeitlicher Verlauf der Zellpopulationen im Vergleich zu den permanenten Materialien PEEK und PS (Abb. 43).

Anhand der durchflusszytometrischen und makroskopischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten schließlich die von Anderson (2001) definierten Phasen der FBR bei allen drei Implantatmaterialien nachvollzogen werden.

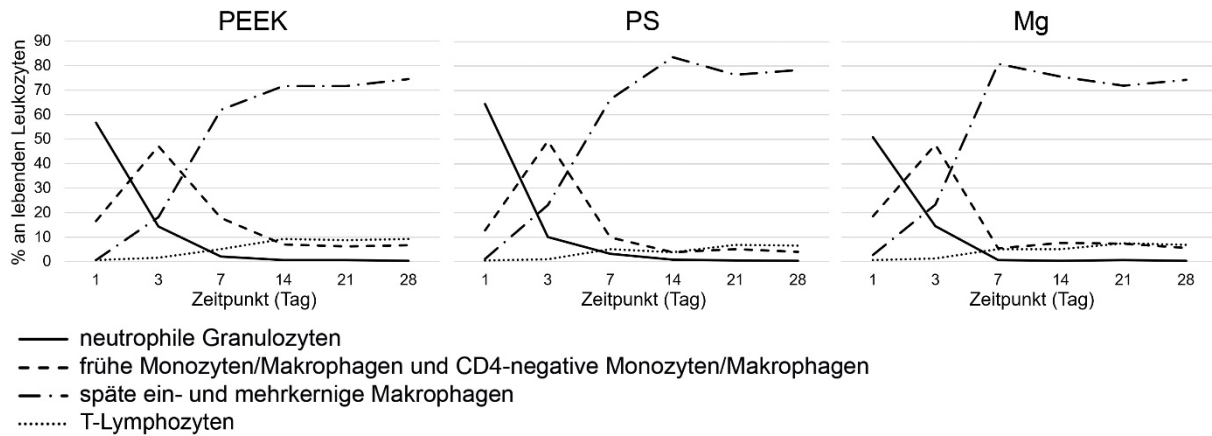


Abb. 43: Verlauf der Fremdkörperantwort nach intramuskulärer Implantation von Polyetheretherketon (PEEK), Polystyrol (PS) und reinem Magnesium (Mg)

Leukozyten der Fremdkörperkapsel im zeitlichen Verlauf

Die identifizierten Leukozytenpopulationen und ihre zeitlichen Verläufe während der FBR werden nachfolgend beispielhaft für die intramuskuläre Fremdkörperkapsel aller drei Materialien erörtert, da sich hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen PEEK, PS und Mg darstellten.

Bei Betrachtung der Gesamtleukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel führte die Implantation von Mg im Vergleich zum Kontrollwerkstoff PEEK, für den eine milde FBR beschrieben ist, zu keiner verstärkten zellulären Entzündungsreaktion im untersuchten Zeitraum (Williams et al., 1987). Die Gesamtleukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel nach Implantation von PS war ebenfalls vergleichbar. Wie von Marchant et al. (1983) beschrieben, kam es nach der Implantation der drei verschiedenen Materialien zu einer akuten lokalen Entzündungsreaktion, welche sich initial durch eine hohe Anzahl an lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel auszeichnete. Mit fortschreitender Implantationsdauer nahm, wie auch in anderen Studien beschrieben, die Anzahl an lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel kontinuierlich ab (Kim et al., 2010; Petillo et al., 1994; Rodriguez et al., 2008). Bei Betrachtung der Gesamtleukozytenzahl an Tag 1 und 3 traten starke Unterschiede zwischen den ursprünglichen Tieren und den Wiederholungstieren auf, die am ehesten auf eine bessere Entnahmetechnik der Fremdkörperkapsel sowie auf eine schnellere Aufarbeitung des Kapselgewebes für die frühen Untersuchungszeitpunkte bei den Wiederholungstieren zurückzuführen sind.

Im zeitlichen Verlauf änderte sich die zelluläre Zusammensetzung der Fremdkörperkapsel während der ersten sieben Tage nach Implantation von PEEK, PS bzw. Mg schnell. Am ersten Tag nach Implantation dominierten neutrophile Granulozyten das untersuchte Kapselgewebe. Dagegen stellten am dritten postoperativen Tag die frühen Monozyten/Makrophagen den vorwiegenden Anteil der lebenden Leukozyten in der unmittelbaren Implantat Umgebung dar, während der Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel deutlich zurückging. Dies beruhte auf der kurzen Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten, die gewöhnlich innerhalb der ersten 24 Stunden einer Entzündungsreaktion der Apoptose unterliegen (Kirk et al., 2010). Der initial hohe Anteil der neutrophilen Granulozyten an den lebenden Leukozyten und der zunehmende Nachweis von Monozyten/Makrophagen in der Fremdkörperkapsel stellten charakteristische Zeichen der

akuten Entzündungsreaktion zu Beginn der FBR dar (Anderson et al., 2008; Selders et al., 2017). Als Ursache für das schnelle Auftreten von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten in der Implantatumgebung kann eine Freisetzung und Rekrutierung aus dem marginalen Pool angesehen werden (Klonz et al., 1996). Dies würde auch die konstanten Anteile dieser Zellpopulationen in den finalen Blutproben erklären. Darüber hinaus stammten 15–30% der frühen Monozyten/Makrophagen von gewebe-ständigen Makrophagen (HIS36+) ab.

Während der akuten Entzündungsreaktion war der Anteil der inflammatorischen CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an den lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel erhöht, wohingegen der Anteil inflammatorischen Monozyten in der Milz (CD11b/c+HIS48high) initial erniedrigt war. Swirski et al. (2009) beobachteten ebenfalls an Tag 1 nach einer ischämischen Myokardverletzung im Mausmodell eine Akkumulation von inflammatorischen Monozyten im entzündeten Myokard und einen zeitgleichen Verlust von inflammatorischen Monozyten in der Milz. Somit lässt sich auch im Rahmen der FBR eine rasche Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten aus der Milz in die Implantatumgebung vermuten.

Wie von Baba et al. (2006) beschrieben, exprimierten bis zu 50% der frühen Monozyten/Makrophagen an den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten die Antigene CD4 und CD8a gleichzeitig. Bei Boddaert et al. (2018) korrelierte die Expression von CD8 mit dem proinflammatorischen Phänotyp von Makrophagen, die nach zerebraler Ischämie im Hirngewebe der Ratte nachweisbar waren. Die in dieser Arbeit aufgefundenen CD8a-positiven frühen Monozyten/Makrophagen stellten somit vermutlich proinflammatorische, klassisch aktivierte Makrophagen nach Mosser und Edwards (2008) dar.

Etwa eine Woche nach Implantation der drei Materialien erfolgte der Übergang von der akuten zur chronischen Entzündungsreaktion der FBR, wobei die späten ein- und mehrkernigen Makrophagen sowie die Lymphozyten die vorherrschenden Leukozytenpopulationen in der Fremdkörperkapsel darstellten. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls während der chronischen Entzündungsreaktion der FBR einen hohen Anteil von Makrophagen und Lymphozyten im Exsudat nachwiesen, welches mittels Käfig-Implantat-System bei der Ratte gewonnen wurde (Bergsma et al., 1995; Marchant et al., 1984; Petillo et al., 1994).

Nach Brown und Badylak (2013) können Makrophagen während der FBR ihren Phänotyp als auch ihre Funktion entsprechend den komplexen Umgebungsbedingungen ändern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte während der ersten vier Wochen der FBR der Phänotyp der aufgefundenen Makrophagenpopulationen anhand der morphologischen Eigenschaften und Antigenexpression nur vermutet werden.

Die frühen Monozyten/Makrophagen stellten sich während der akuten Entzündungsreaktion morphologisch als unreife, Monozyten-ähnliche Makrophagen dar. Mit fortschreitender Implantationsdauer erschienen zunehmend reife, größere Makrophagen mit vakuolisiertem Zytoplasma und multiplen Zellkernen in der Fremdkörperkapsel. Diese späten ein- und mehrkernigen Makrophagen zeigten eine verminderte Expressionsstärke von HIS48 im Vergleich zu den frühen Monozyten/Makrophagen. Die mehrkernigen Makrophagen besaßen bis zu 13 zufällig im Zytoplasma verteilte Zellkerne und wurden als Entwicklungsstufe zu Fremdkörperriesenzellen angesehen (Anderson, 2000).

In den mikroskopischen Präparaten, die mittels Zellsortierung und Zytozentrifugation hergestellt wurden und der Validierung der durchflusszytometrischen Ergebnisse dienten, fielen unerwartet bereits am dritten postoperativen Tag nach Implantation von

PEEK mehrkernige Makrophagen mit zwei bis drei Zellkernen auf. Für die Implantatmaterialien Mg und PS stand an diesem Untersuchungszeitpunkt kein Probenmaterial für die Zellsortierung zur Verfügung. Anderson et al. (2008) beschrieben die Fusion von Makrophagen zur Ausbildung von Fremdkörperriesenzellen erst sieben Tage nach Implantation eines Polymers. Petillo et al. (1994) beobachteten mehrkernige Makrophagen ebenfalls erst nach einer Implantationsdauer von sieben Tagen auf der Oberfläche von PEEK-Implantaten. Die Ergebnisse der *In-vitro*-Studie von Kirk et al. (2010) stellen einen möglichen Erklärungsansatz für das Auffinden von mehrkernigen Makrophagen bereits am dritten postoperativen Tag dar. Die Autoren beobachteten nach gemeinsamer Kultivierung von Monozyten und Granulozyten einen hemmenden Einfluss der Granulozyten auf die Entwicklung von Makrophagen und ihrer Fusion zu Fremdkörperriesenzellen. Demnach ermöglichte der deutlich reduzierte Anteil der neutrophilen Granulozyten an den lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel am dritten postoperativen Tag die beginnende Fusion von einkernigen Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen.

Analog zu den frühen Monozyten/Makrophagen exprimierten bis zu 50% der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen die Oberflächenantigene CD4 und CD8a gleichzeitig. Mit fortschreitender Implantationsdauer und dem Übergang zur chronischen Entzündungsreaktion verringerte sich der Anteil des zytotoxischen Phänotyps der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen. Die Abnahme der CD8-Expression wie auch die Fusion von Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen können mit der Ausbildung von Makrophagen mit antiinflammatorischem Phänotyp assoziiert werden (Boddaert et al., 2018; Franz et al., 2011). Zudem beobachteten Fadok et al. (1998), dass die Apoptose und anschließende Phagozytose von kurzlebigen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen in der Ausbildung eines antiinflammatorischen Phänotyps der Makrophagen resultierte. In Einklang mit dieser Beobachtung korrelierte in der vorliegenden Pilotstudie der Abfall der neutrophilen Granulozyten in der Fremdkörperkapsel mit der Zunahme der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen. Somit können die späten ein- und mehrkernigen Makrophagen ab Tag 14 nach Implantation aller Materialien als antiinflammatorische Makrophagen der Wundheilung nach Mosser und Edwards (2008) angesehen werden.

Aufgrund der zuvor aufgeführten ähnlichen Eigenschaften bezüglich Morphologie und Antigenexpression sowie des zeitlich aufeinanderfolgenden Auftretens wurden die frühen Monozyten/Makrophagen und die späten ein- und mehrkernigen Makrophagen letztlich als ineinander übergehende Populationen angesehen.

Mit zunehmender Implantationsdauer verringerte sich der Anteil der gewebeständigen Makrophagen (HIS36+) an den späten ein- und mehrkernigen Makrophagen in der Fremdkörperkapsel bei stabilem Verlauf der Gesamtleukozytenzahl und der Mutterpopulation. Nach Mulder et al. (2014) können sich neben rekrutierten Monozyten auch gewebeständige Makrophagen zu pro- bzw. antiinflammatorischen Makrophagen differenzieren. Zudem beobachteten die Autoren eine Änderung der Antigenexpression der Zellen. Neben einer möglichen Änderung des Phänotyps der gewebeständigen Makrophagen kann auch eine Fusion zu Fremdkörperriesenzellen als Ursache für die Verringerung des Anteils der Zellpopulation in Betracht gezogen werden. Die Fusion zu Fremdkörperriesenzellen ist jedoch von Gordon und Plüddemann (2017) nur für Makrophagen beschrieben, die sich aus rekrutierten Monozyten des Blutes differenzieren. Schließlich bleibt es unklar, ob gewebeständige Makrophagen bei Wechsel des Phänotyps die Expression des Oberflächenantigens für HIS36 verlieren und ob gewebeständige Makrophagen während der FBR nach Wechsel des Phänotyps fusionieren.

Wie von Anderson (1988) beschrieben, unterlag die Population der Makrophagen zu den späten Untersuchungszeitpunkten keinen dynamischen Veränderungen und bildete bei den permanenten Polymeren PEEK und PS wie erwartet eine Plateauphase aus. In der vorliegenden Arbeit stellte diese Phase die beginnende Fremdkörperreaktion auf die implantierten Materialien dar (Anderson, 2001). Für die Mg-Implantate wurde trotz ihrer Bioresorbierbarkeit eine vergleichbare Plateauphase der Makrophagen zu den späten Untersuchungszeitpunkten beobachtet. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Roth et al. (2015), die *in vitro* keinen negativen Einfluss von Magnesiumpartikeln und Magnesiumkorrosionsprodukten auf die Viabilität von Makrophagen nachweisen konnten. Die Ursache hierfür könnte die Regulation der phagosomalen Magnesiumkonzentration sein (Nüsse, 2011).

Wie von Marchant et al. (1984) beschrieben, waren mit fortschreitender Implantationsdauer neben Makrophagen auch zunehmend T-Lymphozyten in der Fremdkörperkapsel nachweisbar. Der von Rodriguez et al. (2008) im Exsudat um synthetische Biomaterialien aufgefundene hohe Anteil von T-Helferzellen im Vergleich zu den zytotoxischen T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ergänzend korrelierte das aufgefundene Verhältnis in der Fremdkörperkapsel mit dem Verhältnis der T-Zell-Subpopulationen in den präoperativen sowie finalen Blutproben der Versuchstiere. Die gleichen Verhältnisse der T-Zell-Subpopulationen in Blut und Fremdkörperkapsel lassen auf eine unspezifische Rekrutierung von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in die Implantatumgebung schließen.

Mittels Zellsortierung, Zytozentrifugation und histologischer Färbung konnten B-Lymphozyten und dendritische Zellen in der Fremdkörperkapsel nachgewiesen werden, deren geringer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl in der Fremdkörperkapsel mit den Beobachtungen anderer Studien übereinstimmt (Higgins et al., 2009; Vasilijic et al., 2005).

Der insgesamt geringe Anteil der Lymphozyten und die Dominanz von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in der Fremdkörperkapsel bestätigten das Vorliegen einer unspezifischen Immunantwort auf die Implantation der drei Biomaterialien. Eine T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort, wie beispielsweise nach Transplantation von lebendem organischen Gewebe, konnte somit nicht nachgewiesen werden (Murphy et al., 2012).

Eosinophile Granulozyten konnten in der Fremdkörperkapsel durchflusszytometrisch mit sehr geringem Anteil (0–1%) an den Gesamtleukozyten nachgewiesen werden. Eine Interpretation der Zellverläufe für die intramuskuläre Implantation gestaltete sich schwierig, da sich nach ausgiebiger Literaturrecherche keine Implantationsstudien finden ließen, die das intramuskuläre Auftreten von eosinophilen Granulozyten untersuchten. Das zeitliche Auftreten während der chronischen Entzündungsreaktion der FBR lässt eine Beteiligung der eosinophilen Granulozyten an der Wundheilung sowie an der Bildung einer kollagenreichen Fremdkörperkapsel vermuten (Ghanaati, 2012).

Die heterogene Zellpopulation Mastzellen/NK-Zellen (CD3-HIS48-CD4-CD8a+) stellte ebenfalls nur einen geringen Anteil an den lebenden Leukozyten in der Fremdkörperkapsel während der gesamten Implantationsdauer der drei Materialien dar. Aufgrund der fehlenden Antigenbindung des kreuzreaktiven anti-Maus-Antikörpers gegen Mastzellen (ACK2) konnten die Mastzellen nicht von den NK-Zellen unterschieden werden. Die mikroskopischen Präparate, die mittels Zellsortierung und Zytozentrifugation für das Gate CD3-HIS48-CD4- hergestellt wurden und der Validierung der durchflusszytometrischen Ergebnisse dienten, zeigten neben B-Lymphozyten vorwiegend

Mastzellen. Somit wurde angenommen, dass die gemischte Zellpopulation der Mastzellen/NK-Zellen hauptsächlich aus Mastzellen bestand. Der zeitliche Verlauf der heterogenen Zellpopulation ähnelte zudem dem von Trautmann et al. (2000) beschriebenen Verlauf der Mastzellen im Rahmen der physiologischen Wundheilung in menschlicher Haut. Aufgrund der fehlenden Trennbarkeit der Mastzellen/NK-Zellen konnte eine Rekrutierung von NK-Zellen aus dem peripheren Blut in die Implantatumgebung, wie oben vermutet, nicht beurteilt werden.

Einfluss der Implantatlokalisierung

Der deskriptive Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse nach subkutaner und intramuskulärer Implantation der drei Implantatmaterialien ergab drei wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Implantatlokalisationen, die während der akuten Entzündungsreaktion auftraten: In der subkutanen Fremdkörperkapsel zeigte sich am ersten postoperativen Tag ein deutlich geringerer Anteil der neutrophilen Granulozyten sowie eine niedrigere Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zum intramuskulären Kapselgewebe. Zudem setzte die Infiltration von frühen Monozyten/Makrophagen in die intramuskuläre Fremdkörperkapsel zeitlich verzögert ein. Darüber hinaus war der Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl in der subkutanen Fremdkörperkapsel während der gesamten Implantationsdauer von Mg, PEEK und PS höher als nach intramuskulärer Implantation und wies einen anderen zeitlichen Verlauf auf.

Eine unterschiedlich starke Immunantwort auf Biomaterialien in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation der Implantation ist vielfach beschrieben (Bakker et al., 1988; Butler et al., 2001; Rosengren et al., 1997; Santos et al., 2010). Santos et al. (2010) beobachteten beim Vergleich der Immunantwort nach subkutaner und intramuskulärer Implantation von stärkebasierten Biomaterialien im Rattenmodell mittels histopathologischer Untersuchung eine etwas stärkere akute Entzündungsreaktion mit verstärkter Infiltration von neutrophilen Granulozyten nach intramuskulärer Implantation. Dies steht im Einklang mit dem erhöhten Anteil der neutrophilen Granulozyten an der ebenso erhöhten Gesamtleukozytenzahl nach intramuskulärer Implantation in dieser Arbeit. In der Annahme, dass das chirurgische Einbringen der Implantate in den Muskel mit einer größeren Gewebeverletzung im Vergleich zur subkutanen Implantation einherging, kann die beobachtete verstärkte akute Entzündungsreaktion nach intramuskulärer Implantation auf diese erhöhte Gewebetraumatisierung zurückgeführt werden. Wang et al. (2015) stellten nach Implantation von Glukosesensoren, die mittels unterschiedlich großen Kanülen ins Subkutangewebe der Ratte eingebracht wurden, ebenfalls eine Korrelation zwischen der Gewebetraumatisierung und dem Ausmaß der akuten Entzündungsreaktion fest, wobei mit zunehmendem Kanüldurchmesser eine verstärkte Infiltration von neutrophilen Granulozyten nachweisbar war. Der Effekt war dabei unabhängig von der Implantatgröße.

Das zeitliche Auftreten der eosinophilen Granulozyten während der akuten Entzündungsreaktion im subkutanen Kapselgewebe war entgegen des Verlaufes in der intramuskulären Fremdkörperkapsel mit den Ergebnissen von Bergsma et al. (1995) vergleichbar. Die Autoren beobachteten unmittelbar nach Implantation eines Polymers in das Subkutangewebe der Ratte eosinophile Granulozyten in der Implantatumgebung, die nach einer Woche nicht mehr nachweisbar waren.

Als Ursache für die aufgefundenen Unterschiede in den Zellpopulationen bzw. in deren zeitlichen Verläufen zwischen intramuskulärer und subkutaner Implantation muss neben einer unterschiedlich starken Gewebetraumatisierung während des chirurgischen

Eingriffes auch die Migration der Implantate in Betracht gezogen werden. Nach subkutaner Implantation der drei Implantatmaterialien fiel bei der Implantatentnahme unerwartet eine Abweichung der Lage im Vergleich zum ursprünglichen Implantationsort auf. Nach Helton et al. (2011) wird die Migration von subkutanen Implantaten bei der Ratte durch ihr dünnes, lockeres Haut- und Unterhautgewebe begünstigt. Butler et al. (2001) leiteten von der Migration subkutaner Implantate eine kontinuierliche Gewebetraumatisierung ab, welche zu Veränderungen in den Zellpopulationen der FBR führen kann. Der Einfluss der Implantatmigration ließ sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmen.

Das zeitlich verzögerte Auftreten der frühen Monozyten/Makrophagen in der intramuskulären Fremdkörperkapsel kann mit der stärkeren Gewebetraumatisierung und der fehlenden Implantatmigration nach intramuskulärer Implantation nicht erklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Einfluss des Implantatmaterials

Während sich in der intramuskulären Fremdkörperkapsel vergleichbare zeitliche Verläufe der Zellpopulationen zwischen den drei Implantatmaterialien darstellten, wurden in der subkutanen Fremdkörperkapsel nach Implantation von Mg bei drei Zellpopulationen signifikante Unterschiede im Vergleich zu PEEK und PS aufgefunden, die mehrere aufeinander folgende Zeitpunkte betrafen. Bei der Beurteilung der aufgefundenen Materialunterschiede in der subkutanen Fremdkörperkapsel müssen zwei Effekte beachtet werden: die Korrosion der Mg-Implantate *in vivo* und die Migration von Implantaten im Subkutangewebe. Diese beiden Effekte traten in Kombination nur nach subkutaner Implantation auf, da nach intramuskulärer Implantation keine Implantatmigration beobachtet wurde. Es kann angenommen werden, dass die Migration der korrodierenden Mg-Implantate von einem mechanischen Abrieb der Korrosionsprodukte begleitet wurde, der zu einer Zunahme der Oberflächenrauheit der Mg-Implantate führte und mit einer verstärkten Gewebetraumatisierung im Vergleich zu den nicht resorbierbaren Implantatmaterialien einherging (Bontrager et al., 2014; Butler et al., 2001).

In der subkutanen Fremdkörperkapsel zeigte sich für die Mg-Implantate ein signifikant erhöhter Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl am ersten und dritten postoperativen Tag im Vergleich zu PEEK und PS. Ein initialer Anstieg dieser inflammatorischen Monozyten/Makrophagen könnte als ein Zeichen verstärkter Phagozytose von Zelltrümmern und geschädigten Zellen gewertet werden (Awojoodu et al., 2013). Jedoch wäre bei den Mg-Implantaten nach Butler et al. (2001) infolge einer migrationsbedingten Gewebetraumatisierung ein erhöhter Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zu PEEK und PS zu erwarten gewesen, der in der vorliegenden Arbeit nicht auftrat. Daher bleibt die Ursache des erhöhten Anteils der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl am ersten und dritten postoperativen Tag nach subkutaner Implantation von Mg unklar und bedarf weiteren Untersuchungen.

Des Weiteren stellte sich ein signifikant erhöhter Anteil der Mastzellen/NK-Zellen an den lebenden Leukozyten an Tag 7 und 14 nach Implantation von Mg im Vergleich zu den permanenten Polymeren dar. Wie bereits beschrieben, war eine Unterscheidung von Mastzellen und NK-Zellen in der heterogenen Zellpopulation CD3-HIS48-CD4-CD8a+ nicht möglich, wodurch der magnesiumspezifische Effekt keiner bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden konnte. Auch hier bedarf es einer weiteren Untersuchung.

Darüber hinaus fiel in der subkutanen Fremdkörperkapsel nach Implantation von Mg ein signifikant verringerter Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen an den lebenden Leukozyten im Vergleich zu PEEK und PS während der chronischen Entzündungsreaktion auf. Wie bereits weiter oben beschrieben, sind die frühen Monozyten/Makrophagen und die späten ein- und mehrkernigen Makrophagen letztlich als ineinander übergehende Populationen zu verstehen. Betrachtet man folglich beide Populationen gemeinsam als Anteil aller Makrophagen an den Leukozyten der Fremdkörperkapsel, so können die aufgefundenen Materialunterschiede der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen als weniger bedeutsam angesehen werden, denn nach Implantation von Mg war der Anteil der frühen Monozyten/Makrophagen zu den späten Zeitpunkten, wenn auch nicht signifikant, erhöht.

Zusätzlich zu den Erklärungsansätzen für die aufgefundenen Materialunterschiede im subkutanen Kapselgewebe stellten die gleichzeitig intramuskulär fehlenden Materialunterschiede ein weiteres Indiz für die geringe Relevanz des subkutan beobachteten materialspezifischen Effektes der Mg-Implantate dar.

5.3.5 Beurteilung der *In-vivo*-Korrosion von reinem Magnesium

Die verwendeten Mg-Implantate besaßen eine sehr hohe Reinheit, da die Verunreinigungen Eisen, Nickel und Kupfer unterhalb des jeweiligen Toleranzlimits lagen (Song und Atrens, 1999). Die hohe Reinheit des Metalls ging mit einer niedrigen *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit einher.

Verschiedene Studien belegen eine sehr unterschiedliche *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit für reine Magnesiumimplantate (Agarwal et al., 2016; Myrissa et al., 2016; Sanchez et al., 2014; Walker et al., 2012). Dabei muss beachtet werden, dass die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit unter anderem von der Reinheit des verwendeten Magnesiums sowie vom Implantationsgewebe abhängig ist (Willbold et al., 2013; Willbold et al., 2011; Yang und Zhang, 2009; Zhang et al., 2009). In gut durchblutetem Gewebe wie dem Knochenmark korrodiert Magnesium deutlich stärker als im kompakten Knochen und Muskelgewebe (Yang und Zhang, 2009; Zhang et al., 2009). Willbold et al. (2013) beobachteten im Kaninchenmodell nach subkutaner Implantation einer Magnesiumlegierung eine schnellere Korrosion als nach intramuskulärer Implantation aufgrund einer stärkeren Durchblutung des Subkutangewebes. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss des Implantationsgewebes auf die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der Mg-Implantate nicht bestätigt werden. Mit Ausnahme von Tag 7 nach Implantation ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen subkutaner und intramuskulärer Implantation auffinden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Reifenrath et al. (2015), die nach subkutaner und intramuskulärer Implantation einer Magnesiumlegierung in Lewis Ratten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit zwischen beiden Implantatlokalisationen beobachteten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand des Masseverlustes berechnete geringe *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der Mg-Implantate ist am ehesten mit den Ergebnissen von Walker et al. (2012) vergleichbar, die reines Magnesium in Lewis Ratten subkutan implantierten. Zu den frühen Untersuchungszeitpunkten führte die gering oxidierte Oberfläche der polierten Mg-Implantate zu einer erhöhten Geschwindigkeit der Korrosionsreaktion. Mit der Ausbildung einer Schutzschicht aus Magnesiumhydroxid auf der gesamten Metalloberfläche verlangsamte und stabilisierte sich die

initial höhere *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit nach etwa zwei Wochen (Miura et al., 2016; Willbold et al., 2011).

Die Ausprägung von kleinen Gasbläschen in der Implantatumgebung korrelierte mit der *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der Mg-Implantate. Wie von verschiedenen Studien beschrieben, nahmen die Gasansammlungen mit zunehmender Implantationsdauer an beiden Implantatlokalisationen ab (Willbold et al., 2013; Witte et al., 2005; Witte et al., 2007).

Insgesamt korrodierten die subkutan und intramuskulär implantierten Mg-Implantate mit einer niedrigen *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit, die zu einer klinisch kaum relevanten Gasansammlung führte und das Wohlbefinden der Versuchstiere nicht beeinträchtigte.

6. Schlussfolgerungen

Die etablierte durchflusszytometrische Analyse stellte ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der Kinetik der systemischen sowie der lokalen Immunantwort in den ersten vier Wochen nach Implantation von Mg, PEEK und PS im Rattenmodell dar. Die Durchflusszytometrie von Blut, Milz und Fremdkörperkapsel erlaubte in Ergänzung zu herkömmlichen Verfahren eine objektive, schnelle, quantitative sowie multiparametrische Analyse der vorkommenden Leukozytenpopulationen auf Einzelzellebene.

In der vorliegenden Arbeit konnten mithilfe der Durchflusszytometrie erstmals die Leukozyten im Gewebe der Fremdkörperkapsel nach Implantation verschiedener Biomaterialien charakterisiert werden. Zudem wurden erstmals die zeitlichen Verläufe der Leukozytenpopulationen während der FBR auf bioresorbierbares reines Magnesium im Rattenmodell erfasst und detailliert dargestellt. Im Vergleich zu den permanenten Implantatmaterialien zeigte sich hierbei für die Mg-Implantate keine verstärkte lokale Immunantwort. Somit konnte für die beobachtete niedrige *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit der Mg-Implantate ein Einfluss der Korrosion auf die Stärke der FBR ausgeschlossen werden. Insgesamt riefen die drei Implantatmaterialien eine vergleichbare, milde lokale Immunantwort im untersuchten Zeitraum hervor.

Die analysierten Zellpopulationen im Blut befanden sich nach Implantation von PEEK, PS und Mg über den gesamten Untersuchungszeitraum jeweils innerhalb des studieninternen Referenzbereiches. Folglich konnte anhand der hämatologischen Parameter eine subakute systemische Toxizität für alle drei Implantatmaterialien ausgeschlossen werden. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Milz standen hiermit im Einklang.

Zusammenfassend legte die durchflusszytometrische Beurteilung der lokalen und systemischen Effekte nach Implantation eine gute Biokompatibilität der drei untersuchten Biomaterialien nahe. Das erlangte Wissen über die zellulären Mechanismen der FBR auf reines Magnesium kann als Basis für die Weiterentwicklung und Evaluierung magnesiumbasierter, bioresorbierbarer Implantate dienen.

Mit der etablierten durchflusszytometrischen Methodik wurden folgende Besonderheiten einzelner Zellpopulationen in Blut, Milz und Fremdkörperkapsel der Ratte erstmals beschrieben:

- Bereits am dritten postoperativen Tag ließen sich mehrkernige Makrophagen in der Fremdkörperkapsel von PEEK nachweisen.
- Der Anteil der NK-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl im Blut war während der gesamten Implantationsdauer von PEEK, PS und Mg verringert.
- Während der akuten Entzündungsreaktion der FBR wurden Monozyten/Makrophagen mit zytotoxischem Phänotyp (CD4+CD8a+) in der Fremdkörperkapsel aufgefunden.
- Am ersten und dritten postoperativen Tag nach subkutaner Implantation von Mg zeigte sich der prozentuale Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zu PEEK und PS signifikant erhöht.

Aufgrund der subkutanen Implantatmigration und der nachfolgenden Kontamination der Fremdkörperkapsel mit lymphatischem Gewebe ist für die durchflusszytometrische Untersuchung der Fremdkörperkapsel die intramuskuläre gegenüber der subkutanen Implantation für eine bessere Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu bevorzugen.

Die Aussagekraft der durchflusszytometrischen Untersuchung der lokalen Immunantwort ist aufgrund der fehlenden Beurteilung der histopathologischen Veränderungen des Gewebes in der Implantatumgebung limitiert. Um die lokale Gewebeantwort umfassend bewerten zu können, ist eine histopathologische Untersuchung der Fremdkörperkapsel weiterhin unerlässlich. Allerdings kann die etablierte durchflusszytometrische Analyse der Fremdkörperkapsel, wenn sie für ein schnelles *In-vivo*-Screening der lokalen Effekte nach Implantation neuartiger Biomaterialien im Weichgewebe eingesetzt wird, eine vielversprechende Alternative zur zeitaufwendigen histopathologischen Beurteilung darstellen.

7. Zusammenfassung

Vergleich der Fremdkörperantwort auf permanente Implantate und bioresorbierbare reine Magnesiumimplantate mittels Durchflusszytometrie im Rattenmodell

Das Ziel dieser Arbeit war die durchflusszytometrische Untersuchung der Fremdkörperantwort (FBR) nach Implantation von reinem Magnesium (Mg) im Vergleich zu den permanenten Biomaterialien Polyetheretherketon (PEEK) und Polystyrol (PS). Es sollte erstmals die FBR auf reines Magnesium im zeitlichen Verlauf beschrieben und detailliert dargestellt werden, wobei der Einfluss der *In-vivo*-Korrosion auf die lokale Immunantwort zu berücksichtigen war. Hierfür wurden die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Analyse der Fremdkörperkapsel im Tiermodell Ratte etabliert. Zusätzlich sollten systemische Effekte nach Implantation der Materialien mittels Durchflusszytometrie in Blut und Milz untersucht werden.

In 108 weibliche Lewis Ratten wurden unter Allgemeinanästhesie jeweils vier zylindrische Implantate (Durchmesser 8 mm, Höhe 2 mm) eines Materials (PEEK, PS, Mg) nach einer präoperativen Blutentnahme implantiert. Dabei erhielt jedes Tier zwei subkutane und zwei intramuskuläre Implantate. Am 1., 3., 7., 14., 21. und 28. postoperativen Tag erfolgte unter erneuter Allgemeinanästhesie eine finale Blutentnahme mit anschließender Euthanasie der Tiere (n = 6 je Material und Zeitpunkt). Danach wurden die Milz sowie die Implantate mit der umgebenden Fremdkörperkapsel entnommen. Zusätzlich wurden Gewebeproben aus der unmittelbaren Umgebung der Fremdkörperkapseln zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) asserviert. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden aus Milz, Fremdkörperkapsel sowie den präoperativen und finalen Blutproben vitale Einzelzellsuspensionen gewonnen und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Es wurde jeweils ein spezifisches Antikörper-Panel für Blut/Milz und Fremdkörperkapsel etabliert und verwendet. Die Validierung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mittels Zellsortierung, Zytozentrifugation und histologischer Färbung. Für die Mg-Implantate wurde nach Entfernen der Korrosionsprodukte die *In-vivo*-Korrosionsgeschwindigkeit anhand des Masseverlustes bestimmt. Die statistische Analyse der Zeitpunkt- und Materialgruppenvergleiche in Blut, Milz und Fremdkörperkapsel umfasste eine zweifaktorielle Varianzanalyse, paarweise Vergleiche und eine Bonferroni-Holm-Prozedur.

Mithilfe der etablierten durchflusszytometrischen Analyse konnten die charakteristischen Leukozytenpopulationen der FBR in der Fremdkörperkapsel identifiziert und quantifiziert werden. Es zeigte sich der typische zeitliche Verlauf der FBR für alle drei Biomaterialien mit einer initialen Dominanz von neutrophilen Granulozyten begleitet von einer zunehmenden Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen in die Implantatumgebung. Während der chronischen Entzündungsreaktion und der Fremdkörperreaktion dominierten ein- und mehrkernige Makrophagen sowie T-Lymphozyten in der Fremdkörperkapsel. Signifikante Unterschiede zwischen Mg und den permanenten Polymeren wurden ausschließlich nach subkutaner Implantation und nur für folgende Zellpopulationen aufgefunden: erhöhter Anteil der CD4-negativen Monozyten/Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl (Tag 1 und 3), erhöhter Anteil der Mastzellen/NK-Zellen an den lebenden Leukozyten (Tag 7 und 14) sowie verringerter Anteil der späten ein- und mehrkernigen Makrophagen an der Gesamtleukozytenzahl (Tag 14 und 28). Die analysierten Zellpopulationen in den finalen Blutproben befanden

sich nach Implantation von PEEK, PS und Mg über den gesamten Untersuchungszeitraum jeweils innerhalb des studieninternen Referenzbereiches (präoperative Blutproben). Die Materialgruppenvergleiche der Blutproben ergaben keine Unterschiede. In der Milz zeigten sich für die untersuchten Leukozytenpopulationen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und den Implantatmaterialien. Während der ersten vier Wochen nach Implantation korrodierte Mg *in vivo* mit einer niedrigen Korrosionsgeschwindigkeit begleitet von einer klinisch nicht relevanten Gasansammlung an der Implantationsstelle. Eine bakterielle Kontamination der Kapselproben wurde durch die RTQ-PCR ausgeschlossen.

Zusammenfassend riefen die drei Implantatmaterialien PEEK, PS und Mg eine vergleichbare, milde lokale Immunantwort im untersuchten Zeitraum an beiden Implantatlokalisationen hervor. Die subkutan aufgefundenen materialspezifischen Effekte der Mg-Implantate besaßen nur eine geringe Relevanz. Eine systemische Immunantwort infolge der Implantation konnte ausgeschlossen werden. Folglich hatte die *In-vivo*-Korrosion der Mg-Implantate im Vergleich zu PEEK und PS keinen verstärkenden Einfluss auf die FBR und verursachte keine systemische Immunantwort. Insgesamt legte die durchflusszytometrische Beurteilung der lokalen und systemischen Effekte nach Implantation eine gute Biokompatibilität von PEEK, PS und Mg nahe. Hierbei stellte die etablierte durchflusszytometrische Analyse ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der Kinetik der systemischen und lokalen Immunantwort in den ersten vier Wochen nach Implantation von Mg, PEEK und PS im Rattenmodell dar.

8. Summary

Comparison of the foreign body response to permanent implants and bioresorbable pure magnesium implants using flow cytometry in a rat model

The objective of the study was the flow cytometric analysis of the foreign body response (FBR) after implantation of pure magnesium (Mg) compared to the permanent biomaterials polyetheretherketone (PEEK) and polystyrene (PS). For the first time, the FBR to pure magnesium implants ought to be described in detail over time, considering the impact of the *in vivo* corrosion on the local immune response. For this purpose, the processing and the flow cytometric analysis of the foreign body capsule in the rat animal model were established. In addition, systemic effects were examined in blood and spleen after implantation of the biomaterials using flow cytometry.

Under general anesthesia, 108 female Lewis rats were included to implant four cylindrical implants (diameter 8 mm, height 2 mm) of a material (PEEK, PS, Mg) after taking a preoperative blood sample. In each animal two implants were placed subcutaneously and two implants intramuscularly. On day 1, 3, 7, 14, 21 and 28 following implantation, under general anesthesia, a final blood sampling with subsequent euthanasia of the animals took place (n = 6 per material and time). The spleen and the implants were removed afterwards with the surrounding foreign body capsule. In addition, tissue samples from the immediate vicinity of the foreign body capsules were taken to exclude bacterial contamination by quantitative real-time polymerase chain reaction (RTQ-PCR). For the flow cytometric analysis, vital single-cell suspensions were obtained from spleen, foreign body capsule as well as from the preoperative and final blood samples and then stained with fluorochrome labeled antibodies. In each case, a specific antibody panel for blood/spleen and foreign body capsule analysis was established and used. The validation of the flow cytometric analysis was performed by cell sorting, cytocentrifugation and histological staining. For the Mg implants, the *in vivo* corrosion rate was calculated using the weight loss method after removal of the corrosion products. Statistical analysis of time and material group comparisons in blood, spleen and foreign body capsule included a two-way analysis of variance, pairwise comparisons and a Bonferroni-Holm method.

Using the established flow cytometric analysis, the characteristic leukocyte populations of the FBR in the foreign body capsule could be identified and quantified. The typical time course of the FBR was shown for all three biomaterials with an initial peak of neutrophils accompanied by an increasing recruitment of monocytes/macrophages into the implant environment. In the chronic inflammatory response and the foreign body reaction, mononuclear and multinuclear macrophages as well as T cells were dominant in the foreign body capsule. Significant differences between Mg and the permanent polymers were found exclusively after subcutaneous implantation and only for the following cell populations: increased proportion of CD4-negative monocytes/macrophages of total leukocyte count (day 1 and 3), increased proportion of mast cells/NK cells of living leukocytes (day 7 and 14) and reduced proportion of late mononuclear and polynuclear macrophages of total leukocyte count (day 14 and 28). After implantation of PEEK, PS and Mg, the analyzed cell populations in the final blood samples were within the generated reference range of the preoperative blood samples throughout the course of the study. The material group comparisons of the blood samples did not show significant differences. In the spleen, there were no substantial

differences over time and between implant materials for the examined leukocyte populations. Within the first four weeks after implantation, Mg corroded *in vivo* with a low corrosion rate accompanied by a clinically irrelevant gas accumulation at the implant site. Bacterial contamination of capsule samples was excluded by RTQ-PCR.

In summary, the three implant materials showed a comparable, mild local immune response throughout the course of the study at both implant sites. The subcutaneously discovered material-specific effects of the Mg implants had only limited relevance. A systemic immune response due to implantation could be ruled out. Consequently, the *in vivo* corrosion of the Mg implants did not exert a potent influence on the FBR compared to PEEK and PS and did not cause a systemic immune response. Overall, the flow cytometric assessment of local and systemic effects after implantation suggested a good biocompatibility of PEEK, PS, and Mg. The established flow cytometric analysis proved to be a suitable tool to study the kinetics of systemic and local immune responses in the first four weeks after implantation of Mg, PEEK, and PS in the rat model.

9. Literaturverzeichnis

- 90/385/EWG (1990) „Richtlinie des Rates vom 20. Juni 1990 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über aktive implantierbare medizinische Geräte“, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L189:17–36.
- Abbott, A. (2004) „Laboratory animals: the Renaissance rat“, *Nature* 428(6982): 464–466.
- Agarwal, S., Curtin, J., Duffy, B. und Jaiswal, S. (2016) „Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications“, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 68: 948–963.
- Ahmed, S. A. und Talal, N. (1990) „Sex hormones and the immune system – Part 2. Animal data“, *Baillieres Clin Rheumatol* 4(1): 13–31.
- Ahuja, V., Miller, S. E. und Howell, D. N. (1995) „Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43“, *Cell Immunol* 163(1): 59–69.
- Amini, A. R., Wallace, J. S. und Nukavarapu, S. P. (2011) „Short-term and long-term effects of orthopedic biodegradable implants“, *J Long Term Eff Med Implants* 21(2): 93–122.
- An, Y. H., Woolf, S. K. und Friedman, R. J. (2000) „Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices“, *Biomaterials* 21(24): 2635–2652.
- Anderson, J. M. (1988) „Inflammatory response to implants“, *ASAIO transactions* 34(2): 101–107.
- Anderson, J. M. (1993) „Chapter 4 Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices“, *Cardiovascular Pathology* 2(3): 33–41.
- Anderson, J. M. (2000) „Multinucleated giant cells“, *Current opinion in hematology* 7(1): 40–47.
- Anderson, J. M. (2001) „Biological Responses to Materials“, *Annual Review of Materials Research* 31(1): 81–110.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A. und Chang, D. T. (2008) „Foreign body reaction to biomaterials“, *Seminars in immunology* 20(2): 86–100.
- Anderson, J. M. und McNally, A. K. (2011) „Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions“, *Semin Immunopathol* 33(3): 221–233.
- Andrews, E. (1917) „Absorbable metal clips as substitutes for ligatures and deep sutures in wound closure“, *Journal of the American Medical Association* LXIX(4): 278–281.
- Arora, H., Nafria, A. und Kanase, A. (2011) „Rabbits as Animal Models in Contemporary Implant Biomaterial Research“, *World Journal of Dentistry* 2(2): 129–134.
- Arzneimittelgesetz - Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (2017) „Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist“.
- ASTM F2026 - 02 (abgelöst) „Standard Specification for Polyetheretherketone (PEEK) Polymers for Surgical Implant Applications“, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2002, DOI: 10.1520/F2026-02, <http://www.astm.org/>.
- ASTM G31 - 72(2004) (abgelöst) „Standard Practice for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals“, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2004, DOI: 10.1520/G0031-72R04, <http://www.astm.org/>.
- Avedesian, M. M. und Baker, H. (1999): „Cleaning and Finishing“ in Avedesian, M. M. und Baker, H., *ASM Specialty Handbook: Magnesium and Magnesium Alloys*, ASM International: 138–162.
- Avula, M. N., Rao, A. N., McGill, L. D., Grainger, D. W. und Solzbacher, F. (2014) „Foreign body response to subcutaneous biomaterial implants in a mast cell-deficient Kit(w-Sh) murine model“, *Acta biomaterialia* 10(5): 1856–1863.
- Awojoodu, A. O., Ogle, M. E., Sefcik, L. S., Bowers, D. T., Martin, K., Brayman, K. L., Lynch, K. R., Peirce-Cottler, S. M. und Botchwey, E. (2013) „Sphingosine 1-phosphate receptor 3 regulates recruitment of anti-inflammatory monocytes to microvessels during implant arteriogenesis“, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(34): 13785.
- Baba, T., Ishizu, A., Iwasaki, S., Suzuki, A., Tomaru, U., Ikeda, H., Yoshiki, T. und Kasahara, M. (2006) „CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype“, *Blood* 107(5): 2004–2012.
- Bailly, Y. und Duprat, P. (1990): „Normal Blood Cell Values, Rat“ in Jones, T. C., Ward, J. M., Mohr, U. und Hunt, R. D., *Hemopoietic System*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 27–38.
- Baker, H. J., Lindsey, J. R. und Weisbroth, S. H. (2006): „Appendix 1 - Selected Normative Data“ in Suckow, M. A., Weisbroth, S. H. und Franklin, C. L., *The Laboratory Rat (Second Edition)*, Academic Press, Burlington: 883–884.

- Bakker, D., van Blitterswijk, C. A., Hesselink, S. C., Grote, J. J. und Daems, W. T. (1988) „Effect of implantation site on phagocyte/polymer interaction and fibrous capsule formation“, *Biomaterials* 9(1): 14–23.
- Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998) „Dendritic cells and the control of immunity“, *Nature* 392(6673): 245–252.
- Barclay, A. N. (1981) „The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues“, *Immunology* 42(4): 593–600.
- Barnett-Vanes, A., Sharrock, A., Birrell, M. A. und Rankin, S. (2016) „A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation“, *PloS one* 11(1): e0142520.
- Bassett, E. G., Baker, J. R., Baker, P. A. und Myers, D. B. (1976) „Comparison of collagenase activity in eosinophil and neutrophil fractions from rat peritoneal exudates“, *Aust J Exp Biol Med Sci* 54(5): 459–465.
- Beland, S., Desy, O., Vallin, P., Basoni, C. und De Serres, S. A. (2015) „Innate immunity in solid organ transplantation: an update and therapeutic opportunities“, *Expert review of clinical immunology* 11(3): 377–389.
- Bellingan, G. J., Caldwell, H., Howie, S. E., Dransfield, I. und Haslett, C. (1996) „In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157(6): 2577–2585.
- Bergsma, J. E., Rozema, F. R., Bos, R. R. M., Boering, G., Bruijn, W. C. d. und Pennings, A. J. (1995) „Biocompatibility study of as-polymerized poly(L-lactide) in rats using a cage implant system“, *Journal of biomedical materials research* 29(2): 173–179.
- Bio-Rad (2017) „Cell frequency - flow cytometry“, Bio-Rad Laboratories, Inc., 2017, abgerufen am 01.03.2018, <https://static.bio-rad-antibodies.com/2017/flow/flow-cytometry-cell-frequency.pdf>.
- BMEL (2017) „Daten zur Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2016“, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), 22.12.2017, abgerufen am 03.01.2018, https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/Versuchstierdaten2016.pdf?__blob=publicationFile.
- Boddaert, J., Bielen, K., 's Jongers, B., Manocha, E., Yperzeele, L., Cras, P., Pirici, D. und Kumar-Singh, S. (2018) „CD8 signaling in microglia/macrophage M1 polarization in a rat model of cerebral ischemia“, *PloS one* 13(1): e0186937.
- Boeck, G. (2001) „Current status of flow cytometry in cell and molecular biology“, *Int Rev Cytol* 204: 239–298.
- Bontrager, J., Mahapatro, A. und Gomes, A. S. (2014) „Microscopic bio-corrosion evaluations of magnesium surfaces in static and dynamic conditions“, *Journal of Microscopy* 255(2): 104–115.
- Brandt, C. J., Kammer, D., Fiebeler, A. und Klinge, U. (2011) „Beneficial effects of hydrocortisone or spironolactone coating on foreign body response to mesh biomaterial in a mouse model“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 99(3): 335–343.
- Brash, J. L. und ten Hove, P. (1984) „Effect of plasma dilution on adsorption of fibrinogen to solid surfaces“, *Thrombosis and haemostasis* 51(3): 326–330.
- Bratlie, K. M., Dang, T. T., Lyle, S., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Langer, R. und Anderson, D. G. (2010) „Rapid biocompatibility analysis of materials via in vivo fluorescence imaging of mouse models“, *PloS one* 5(4): e10032.
- Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W. und Williams, A. F. (1980) „Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies“, *Eur J Immunol* 10(8): 609–615.
- Brodbeck, W. G., Macewan, M., Colton, E., Meyerson, H. und Anderson, J. M. (2005) „Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 74(2): 222–229.
- Brown, B. N. und Badylak, S. F. (2013) „Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host–biomaterial interactions“, *Acta biomaterialia* 9(2): 4948–4955.
- Burkholder, T. H., Linton, G., Hoyt Jr, R. F. und Young, R. (2012): „Chapter 18 - The Rabbit as an Experimental Model“ in, *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Academic Press, Boston: 529–560.
- Butler, K., Benghuzzi, H. und Puckett, A. (2001) „Cytological Evaluation of the Tissue-Implant Reaction Associated with S/C and I/P Implantation of ALCAP and HA Bioceramics in vivo“, *Pathology - Research and Practice* 197(1): 29–39.
- Caldwell, C. W. und Taylor, H. M. (1986) „A rapid, no-wash technic for immunophenotypic analysis by flow cytometry“, *Am J Clin Pathol* 86(5): 600–607.

- Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G. und Beltramo, M. (2002) „Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain“, *Stroke* 33(2): 586–592.
- Cantrell, D. A., Robins, R. A., Brooks, C. G. und Baldwin, R. W. (1982) „Phenotype of rat natural killer cells defined by monoclonal antibodies marking rat lymphocyte subsets“, *Immunology* 45(1): 97–103.
- Caraher, E. M., Parenteau, M., Gruber, H. und Scott, F. W. (2000) „Flow cytometric analysis of intracellular IFN-gamma, IL-4 and IL-10 in CD3(+)/4(+) T-cells from rat spleen“, *J Immunol Methods* 244(1-2): 29–40.
- Castellani, C., Lindtner, R. A., Hausbrandt, P., Tschegg, E., Stanzl-Tschegg, S. E., Zanoni, G., Beck, S. und Weinberg, A. M. (2011) „Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control“, *Acta biomaterialia* 7(1): 432–440.
- Catelas, I., Huk, O. L., Petit, A., Zukor, D. J., Marchand, R. und Yahia, L. (1998) „Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition“, *Journal of biomedical materials research* 41(4): 600–607.
- Chang, D. T., Colton, E., Matsuda, T. und Anderson, J. M. (2009) „Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 91(4): 1210–1220.
- Chao, T. C., Van Alten, P. J., Greager, J. A. und Walter, R. J. (1995) „Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages“, *Cell Immunol* 160(1): 43–49.
- Chen, G., Chen, S. und Chen, X. (2013a) „Role of complement and perspectives for intervention in transplantation“, *Immunobiology* 218(5): 817–827.
- Chen, K., Dai, J. und Zhang, X. (2015) „Improvement of corrosion resistance of magnesium alloys for biomedical applications“ In *Corrosion Reviews*, 101.
- Chen, S., Tan, L., Zhang, B., Xia, Y., Xu, K. und Yang, K. (2017) „In Vivo Study on Degradation Behavior and Histologic Response of Pure Magnesium in Muscles“, *J. Mater. Sci. Technol.* 33(5): 469–474.
- Chen, Y., Gao, Q., Wan, H., Yi, J., Wei, Y. und Liu, P. (2013b) „Surface modification and biocompatible improvement of polystyrene film by Ar, O₂ and Ar+O₂ plasma“, *Applied Surface Science* 265(Supplement C): 452–457.
- Colvin, R. B. und Smith, R. N. (2005) „Antibody-mediated organ-allograft rejection“, *Nature reviews. Immunology* 5(10): 807–817.
- Cornell, L. D., Smith, R. N. und Colvin, R. B. (2008) „Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance“, *Annual review of pathology* 3: 189–220.
- Dalu, A., Blaydes, B. S., Lomax, L. G. und Delclos, K. B. (2000) „A comparison of the inflammatory response to a polydimethylsiloxane implant in male and female Balb/c mice“, *Biomaterials* 21(19): 1947–1957.
- Davidson, M. K., Lindsey, J. R. und Davis, J. K. (1987) „Requirements and selection of an animal model“, *Israel journal of medical sciences* 23(6): 551–555.
- DeFife, K. M., Jenney, C. R., McNally, A. K., Colton, E. und Anderson, J. M. (1997) „Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158(7): 3385–3390.
- DIN EN ISO 8044:2015-12 „Korrosion von Metallen und Legierungen - Grundbegriffe“, Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 10993-1:2017-04 (Entwurf) „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems“, Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 10993-2:2006-10 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 2: Tierschutzbestimmungen“, Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 10993-6:2009-08 (Dokument zurückgezogen) „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantationen“, Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 10993-11:2009-08 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 11: Prüfungen auf systemische Toxizität“, Beuth Verlag, Berlin.
- Dolen, Y., Gunaydin, G., Esendagli, G. und Guc, D. (2015) „Granulocytic subset of myeloid derived suppressor cells in rats with mammary carcinoma“, *Cell Immunol* 295(1): 29–35.
- Dörger, M., Münzing, S., Allmeling, A. M., Messmer, K. und Krombach, F. (2001) „Phenotypic and functional differences between rat alveolar, pleural, and peritoneal macrophages“, *Exp Lung Res* 27(1): 65–76.

- Dörner, K., Deufel, T., Dörner, R., Haschke-Becher, E., Heppner, H. J., Kiehntopf, M., Klingmüller, D., Löffler, H., Lütjohann, D., Madlener, K., Pötzsch, B. und Sommer, R. (2009) *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Drynda, A., Seibt, J., Hassel, T., Bach, F. W. und Peuster, M. (2013) „Biocompatibility of fluoride-coated magnesium-calcium alloys with optimized degradation kinetics in a subcutaneous mouse model“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 101(1): 33–43.
- Endres, S., Landgraff, M., Kratz, M. und Wilke, A. (2004) „Biokompatibilitätstestung verschiedener Biomaterialien in Abhängigkeit vom Immunstatus“, *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 142(3): 358–365.
- Erdmann, N., Bondarenko, A., Hewicker-Trautwein, M., Angrisani, N., Reifenrath, J., Lucas, A. und Meyer-Lindenberg, A. (2010) „Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L in vivo: a comparative study in rabbits“, *Biomed Eng Online* 9: 63.
- Fabre, T., Bertrand-Barat, J., Freyburger, G., Rivel, J., Dupuy, B., Durandeau, A. und Baquey, C. (1998) „Quantification of the inflammatory response in exudates to three polymers implanted in vivo“, *Journal of biomedical materials research* 39(4): 637–641.
- Fadok, V., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Y, Westcott, J. und Henson, P. M. (1998) *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.*
- Fasching, G., Kurz, R. und Wendler, M. (1988) *Einfluß von Operationen auf Entzündungsparameter.*
- Fecho, K. und Lysle, D. T. (2002) „Morphine-induced enhancement in the granulocyte response to thioglycollate administration in the rat“, *Inflammation* 26(6): 259–271.
- Filli, L., Luechinger, R., Frauenfelder, T., Beck, S., Guggenberger, R., Farshad-Amacker, N. und Andreisek, G. (2015) „Metal-induced artifacts in computed tomography and magnetic resonance imaging: comparison of a biodegradable magnesium alloy versus titanium and stainless steel controls“, *Skeletal radiology* 44(6): 849–856.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. und Simon, J. C. (2011) „Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials“, *Biomaterials* 32(28): 6692–6709.
- Freire, M. O. und Van Dyke, T. E. (2013) „Natural resolution of inflammation“, *Periodontol 2000* 63(1): 149–164.
- Geissmann, F., Jung, S. und Littman, D. R. (2003) „Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties“, *Immunity* 19(1): 71–82.
- Ghanaati, S. (2012) „Non-cross-linked porcine-based collagen I–III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: A paradigm shift“, *Acta biomaterialia* 8(8): 3061–3072.
- Givan, A. L. (2001): Chapter 1 „The Past as Prologue“ in Givan, A. L., *Flow Cytometry: First Principles*, John Wiley and Sons, Inc., New York: 1–9.
- Gordon, S. (2003) „Alternative activation of macrophages“, *Nature reviews. Immunology* 3(1): 23–35.
- Gordon, S. und Plüddemann, A. (2017) „Tissue macrophages: heterogeneity and functions“, *BMC Biology* 15(1): 53.
- Grau, V., Scriba, A., Stehling, O. und Steiniger, B. (2000) „Monocytes in the rat“, *Immunobiology* 202(1): 94–103.
- Green, J. R. (1984) „Generation of cytotoxic T cells in the rat mixed lymphocyte reaction is blocked by monoclonal antibody MRC OX-8“, *Immunology* 52(2): 253–260.
- Gretzer, C., Emanuelsson, L., Liljensten, E. und Thomsen, P. (2006) „The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials“, *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 17(6): 669–687.
- Grooteman, M. P., Nube, M. J., van Limbeek, J., Schoorl, M. und van Houte, A. J. (1996) „Lymphocyte subsets in dialyser eluates: a new parameter of bioincompatibility?“, *Nephrol Dial Transplant* 11(6): 1073–1078.
- Guiot, L. P. und Déjardin, L. M. (2011) „Prospective Evaluation of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in 36 Nonarticular Tibial Fractures in Dogs and Cats“, *Veterinary Surgery* 40(2): 171–182.
- GV-SOLAS (2009) (abgelöst) „Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren“, Gesellschaft für Versuchstierkunde, Marburg.
- GV-SOLAS (2010) (abgelöst) „Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren“, Gesellschaft für Versuchstierkunde, Marburg.
- Harlan (2010) „Lewis Rat Female: Hematology and Clinical Chemistry“, Indianapolis: Harlan Laboratories Inc.
- Hartwig, A. (2001) „Role of magnesium in genomic stability“, *Mutation research* 475(1-2): 113–121.

- Haude, M., Erbel, R., Erne, P., Verheye, S., Degen, H., Bose, D., Vermeersch, P., Wijnbergen, I., Weissman, N., Prati, F., Waksman, R. und Koolen, J. (2013) „Safety and performance of the drug-eluting absorbable metal scaffold (DREAMS) in patients with de-novo coronary lesions: 12 month results of the prospective, multicentre, first-in-man BIOSOLVE-I trial“, *Lancet (London, England)* 381(9869): 836–844.
- Helmus, M. N., Gibbons, D. F. und Cebon, D. (2008) „Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices“, *Toxicologic pathology* 36(1): 70–80.
- Helton, K. L., Ratner, B. D. und Wisniewski, N. A. (2011) „Biomechanics of the sensor-tissue interface-effects of motion, pressure, and design on sensor performance and the foreign body response-part I: theoretical framework“, *J Diabetes Sci Technol* 5(3): 632–646.
- Hench, L. L. und Wilson, J. (2013): Chapter 1.2 „Types of bioceramics-tissue interfaces“ in Hench, L. L., *An Introduction to Bioceramics - Second Edition*, Imperial College Press, London: 3–5.
- Henson, P. M. (1971) „The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 107(6): 1547–1557.
- Henson, P. M. (1980) „Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells. Parke-Davis Award Lecture“, *The American journal of pathology* 101(3): 494–511.
- Hernandez-Pando, R., Bornstein, Q. L., Aguilar Leon, D., Orozco, E. H., Madrigal, V. K. und Martinez Cordero, E. (2000) „Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells“, *Immunology* 100(3): 352–358.
- Higgins, D. M., Basaraba, R. J., Hohnbaum, A. C., Lee, E. J., Grainger, D. W. und Gonzalez-Juarrero, M. (2009) „Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials“, *The American journal of pathology* 175(1): 161–170.
- Hirji, N., Lin, T. J. und Befus, A. D. (1997) „A novel CD8 molecule expressed by alveolar and peritoneal macrophages stimulates nitric oxide production“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158(4): 1833–1840.
- Hirji, N. S., Lin, T. J., Gilchrist, M., Nault, G., Nohara, O., Grill, B. J., Belosevic, M., Stenton, G. R., Schreiber, A. D. und Befus, A. D. (1999) „Novel CD8 molecule on macrophages and mast cells: expression, function and signaling“, *Int Arch Allergy Immunol* 118(2-4): 180–182.
- Honma, T. und Hamasaki, T. (1996) „Ultrastructure of multinucleated giant cell apoptosis in foreign-body granuloma“, *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 428(3): 165–176.
- Horbett, T. A. (2013): Chapter II.1.2 „Adsorbed Proteins on Biomaterials“ in Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., *Biomaterials Science 3rd Edition*, Elsevier Inc., Oxford: 394–408.
- Hunt, J. A., Flanagan, B. F., McLaughlin, P. J., Strickland, I. und Williams, D. F. (1996) „Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production“, *Journal of biomedical materials research* 31(1): 139–144.
- Hurschler, C., Windhagen, H., Correa, T. und Weizbauer, A. (2013) „Neue Materialien für eine bessere Patientenversorgung“, *Trauma und Berufskrankheit* 15(4): 259–265.
- Iannaccone, P. M. und Jacob, H. J. (2009) „Rats!“, *Disease models & mechanisms* 2(5-6): 206–210.
- Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Toyoda, K., Kobayashi, E., Doi, H., Yoneyama, T. und Hamanaka, H. (2002) „Tissue Reactions and Sensitivity to Iron-Chromium Alloys“, *MATERIALS TRANSACTIONS* 43(12): 3065–3071.
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Hohn, S. und Krauspe, R. (2005) „The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur“, *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* 50(4): 107–110.
- Jay, S. M., Skokos, E. A., Zeng, J., Knox, K. und Kyriakides, T. R. (2010) „Macrophage fusion leading to foreign body giant cell formation persists under phagocytic stimulation by microspheres in vitro and in vivo in mouse models“, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93A(1): 189–199.
- Jefferies, W. A., Green, J. R. und Williams, A. F. (1985) „Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages“, *The Journal of experimental medicine* 162(1): 117–127.
- Jenney, C. R. und Anderson, J. M. (2000) „Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior“, *Journal of biomedical materials research* 49(4): 435–447.
- Jennissen, H. (2000) „Verträglichkeit groß geschrieben: Neue Wege zur Bioverträglichkeit von Materialien durch gezielte Oberflächenmodifikation“, *Essener Unikate: Berichte aus Forschung und Lehre* (13): 78–93.
- Jimenez, E., Sacedon, R., Vicente, A., Hernandez-Lopez, C., Zapata, A. G. und Varas, A. (2002) „Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells

- that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168(10): 5005–5013.
- Jockisch, K. A., Brown, S. A., Bauer, T. W. und Merritt, K. (1992) „Biological response to chopped-carbon-fiber-reinforced peek“, *Journal of biomedical materials research* 26(2): 133–146.
- Jones, J. A., Chang, D. T., Meyerson, H., Colton, E., Kwon, I. K., Matsuda, T. und Anderson, J. M. (2007) „Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 83(3): 585–596.
- Kantor, A. und Roederer, M. (1996): Chapter 49 „FACS Analysis of Leukocytes“ in Weir, D., Herzenberg, L., Blackwell, C. and Herzenberg, L., *Weir's handbook of experimental immunology*, Blackwell Science, Cambridge: 49.41–49.13.
- Kastellorizios, M., Tipnis, N. und Burgess, D. J. (2015) „Foreign Body Reaction to Subcutaneous Implants“, *Advances in experimental medicine and biology* 865: 93–108.
- Kenny, E., Mason, D., Pombo, A. und Ramirez, F. (2000) „Phenotypic analysis of peripheral CD4+ CD8+ T cells in the rat“, *Immunology* 101(2): 178–184.
- Keselowsky, B. G. und Lewis, J. S. (2017) „Dendritic cells in the host response to implanted materials“, *Seminars in immunology* 29: 33–40.
- Khouw, I. M., van Wachem, P. B., van der Worp, R. J., van den Berg, T. K., de Leij, L. F. und van Luyn, M. J. (2000a) „Systemic anti-IFN-gamma treatment and role of macrophage subsets in the foreign body reaction to dermal sheep collagen in rats“, *Journal of biomedical materials research* 49(3): 297–304.
- Khouw, I. M., van Wachem, P. B., Molema, G., Plantinga, J. A., de Leij, L. F. und van Luyn, M. J. (2000b) „The foreign body reaction to a biodegradable biomaterial differs between rats and mice“, *Journal of biomedical materials research* 52(3): 439–446.
- Kidd, K. R., Dal Ponte, D. B., Kellar, R. S. und Williams, S. K. (2002) „A comparative evaluation of the tissue responses associated with polymeric implants in the rat and mouse“, *Journal of biomedical materials research* 59(4): 682–689.
- Kim, H. M., Shin, H. Y. und Lee, E. H. (1998) „Morphological alterations in rat peritoneal mast cells by stem cell factor“, *Immunology* 94(2): 242–246.
- Kim, J., Dadsetan, M., Ameenuddin, S., Windebank, A. J., Yaszemski, M. J. und Lu, L. (2010) „In vivo biodegradation and biocompatibility of PEG/sebacic acid-based hydrogels using a cage implant system“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 95(1): 191–197.
- Kim, M. S., Kim, S. H., Lee, H. J. und Kim, H. M. (2004) „Expression and function of CD8 alpha/beta chains on rat and human mast cells“, *Biol Pharm Bull* 27(3): 399–403.
- Kim, Y. K., Yeo, H. H. und Lim, S. C. (1997) „Tissue response to titanium plates: a transmitted electron microscopic study“, *J Oral Maxillofac Surg* 55(4): 322–326.
- Kirk, J. T., McNally, A. K. und Anderson, J. M. (2010) „Polymorphonuclear leukocyte inhibition of monocytes/macrophages in the foreign body reaction“, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94A(3): 683–687.
- Kirkland, N. T., Birbilis, N. und Staiger, M. P. (2012) „Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: a critical review of current methodologies and their limitations“, *Acta biomaterialia* 8(3): 925–936.
- Klein, S. L. und Flanagan, K. L. (2016) „Sex differences in immune responses“, *Nature reviews. Immunology* 16(10): 626–638.
- Kloc, M. und Ghobrial, R. M. (2014) „Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success“, *Burns & trauma* 2(1): 3–10.
- Klonz, A., Wonigeit, K., Pabst, R. und Westermann, J. (1996) „The Marginal Blood Pool of the Rat Contains not only Granulocytes, but also Lymphocytes, NK-Cells and Monocytes: a Second Intravascular Compartment, its Cellular Composition, Adhesion Molecule Expression and Interaction with the Peripheral Blood Pool“, *Scandinavian Journal of Immunology* 44(5): 461–469.
- Kolaczowska, E. und Kubes, P. (2013) „Neutrophil recruitment and function in health and inflammation“, *Nature reviews. Immunology* 13(3): 159–175.
- Kraft, W., Dürr, U. M., Fürll, M., Bostedt, H. und Heinritzi, K. (2005): 10. Kapitel „Hämatologie“ in Kraft, W. and Dürr, U. M., *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer GmbH, Stuttgart: 49–92.
- Kuhlmann, J., Bartsch, I., Willbold, E., Schuchardt, S., Holz, O., Hort, N., Hoche, D., Heineman, W. R. und Witte, F. (2013) „Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants“, *Acta biomaterialia* 9(10): 8714–8721.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L. und Cotran, R. S. (2005): Chapter 2 „Acute and Chronic Inflammation“ in Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L. and Cotran, R. S., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Elsevier Saunders: 47–86.
- Kumar, V. und Sharma, A. (2010) „Neutrophils: Cinderella of innate immune system“, *Int Immunopharmacol* 10(11): 1325–1334.
- Kurtz, S. M. und Devine, J. N. (2007) „PEEK Biomaterials in Trauma, Orthopedic, and Spinal Implants“, *Biomaterials* 28(32): 4845–4869.
- Ladics, G. S. und Loveless, S. E. (1994) „Cell Surface Marker Analysis of Splenic Lymphocyte Populations of the CD Rat for Use in Immunotoxicological Studies“, *Toxicology Methods* 4(2): 77–91.
- Lévesque, J., Dubé, D., Fiset, M. und Mantovani, D. (2004) „Materials and Properties for Coronary Stents“, *Advanced Materials and Processes* 162(9): 45–48.
- Liebich, H.-G., Böck, P., Budras, K.-D., Maierl, J. und Reese, S. (2004) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, Schattauer GmbH, Stuttgart.
- Lin, T. J., Hirji, N., Nohara, O., Stenton, G. R., Gilchrist, M. und Befus, A. D. (1998) „Mast cells express novel CD8 molecules that selectively modulate mediator secretion“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(11): 6265–6272.
- Lindblad-Toh, K. (2004) „Genome sequencing: three's company“, *Nature* 428(6982): 475–476.
- Liu, C., Xin, Y., Tian, X. und Chu, P. K. (2007) „Degradation susceptibility of surgical magnesium alloy in artificial biological fluid containing albumin“, *Journal of Materials Research* 22(7): 1806–1814.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method“, *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–408.
- Londono, R. und Badylak, S. F. (2015): Chapter 1 „Factors Which Affect the Host Response to Biomaterials“ in Badylak, S. F., *Host Response to Biomaterials*, Elsevier Inc., Oxford: 1–12.
- Lucke, S., Hoene, A., Walschus, U., Kob, A., Pissarek, J. W. und Schlosser, M. (2015) „Acute and chronic local inflammatory reaction after implantation of different extracellular porcine dermis collagen matrices in rats“, *Biomed Res Int* 2015: 938059.
- Luttikhuisen, D. T., Harmsen, M. C. und Van Luyn, M. J. (2006) „Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction“, *Tissue engineering* 12(7): 1955–1970.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. und Takashiba, S. (2003) „Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria“, *FEMS immunology and medical microbiology* 39(1): 81–86.
- Maguire, M. E. und Cowan, J. A. (2002) „Magnesium chemistry and biochemistry“, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 15(3): 203–210.
- Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K. und Raspa, M. (2014) „FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units“, *Lab Anim* 48(3): 178–192.
- Maiborodin, I. V., Shevela, A. I., Morozov, V. V., Novikova, Y. V., Matveeva, V. A., Drovosekov, M. N. und Barannik, M. I. (2013) „Reaction of the rat tissues to implantation of polyhydroxyalkanoate films and ultrafine fibers“, *Bull Exp Biol Med* 154(3): 379–384.
- Major, M. R., Wong, V. W., Nelson, E. R., Longaker, M. T. und Gurtner, G. C. (2015) „The foreign body response: at the interface of surgery and bioengineering“, *Plast Reconstr Surg* 135(5): 1489–1498.
- Marchant, R., Hiltner, A., Hamlin, C., Rabinovitch, A., Slobodkin, R. und Anderson, J. M. (1983) „In vivo biocompatibility studies. I. The cage implant system and a biodegradable hydrogel“, *Journal of biomedical materials research* 17(2): 301–325.
- Marchant, R. E., Miller, K. M. und Anderson, J. M. (1984) „In vivo biocompatibility studies. V. In vivo leukocyte interactions with Biomer“, *Journal of biomedical materials research* 18(9): 1169–1190.
- Marchant, R. E. (1989) „The cage implant system for determining in vivo biocompatibility of medical device materials“, *Fundam Appl Toxicol* 13(2): 217–227.
- Martin, K. R., Ohayon, D. und Witko-Sarsat, V. (2015) „Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation“, *Swiss Med Wkly* 145: w14056.

- Mayer, B. und Muche, R. (2013) „Die limitierte Aussagekraft formaler Fallzahlplanung im Rahmen von Tierversuchen der medizinischen Grundlagenforschung“, *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 41(6): 367–374.
- McNally, A. K. und Anderson, J. M. (1995) „Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells“, *The American journal of pathology* 147(5): 1487–1499.
- McNally, A. K., Jones, J. A., Macewan, S. R., Colton, E. und Anderson, J. M. (2008) „Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 86(2): 535–543.
- McNamara, A. und Williams, D. F. (1981) „The response to the intramuscular implantation of pure metals“, *Biomaterials* 2(1): 33–40.
- Metcalf, D. D., Baram, D. und Mekori, Y. A. (1997) „Mast cells“, *Physiol Rev* 77(4): 1033–1079.
- Meyer-Lindenberg, A., Thomann, M., Krause, A., Bormann, D., von Rechenberg, B. und Windhagen, H. (2010) „Untersuchungen zum Einsatz einer Magnesiumbasislegierung als neues resorbierbares Implantatmaterial für die Osteosynthese“, *Kleintierpraxis* 55(7): 349–363.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. und Hill, A. M. (2000) „M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(12): 6166–6173.
- Mischke, R. (2005) *Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin*, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover.
- Misra, V. K. und Draper, D. E. (1998) „On the role of magnesium ions in RNA stability“, *Biopolymers* 48(2-3): 113–135.
- Mitchell, R. N. (2013): Chapter II.2.3 „Innate and Adaptive Immunity: The Immune Response to Foreign Materials“ in Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., *Biomaterials Science 3rd Edition*, Elsevier Inc., Oxford: 512–533.
- Miura, C., Shimizu, Y., Imai, Y., Mukai, T., Yamamoto, A., Sano, Y., Ikeo, N., Isozaki, S., Takahashi, T., Oikawa, M., Kumamoto, H. und Tachi, M. (2016) „In vivo corrosion behaviour of magnesium alloy in association with surrounding tissue response in rats“, *Biomedical materials (Bristol, England)* 11(2): 025001.
- Möhnle, P. und Goetz, A. E. (2001) „Physiologische Effekte, Pharmakologie und Indikationen zur Gabe von Magnesium“, *Der Anaesthetist* 5/2001: 377–391.
- Morris, D. L. und Komocsar, W. J. (1997) „Immunophenotyping analysis of peripheral blood, splenic, and thymic lymphocytes in male and female rats“, *J Pharmacol Toxicol Methods* 37(1): 37–46.
- Mosser, D. M. und Edwards, J. P. (2008) „Exploring the full spectrum of macrophage activation“, *Nature reviews. Immunology* 8(12): 958–969.
- Mulder, R., Banete, A. und Basta, S. (2014) „Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states“, *Immunobiology* 219(10): 737–745.
- Müller-Färber, J. (2003) „Die Metallentfernung in der Unfallchirurgie“, *Der Unfallchirurg* 106(8): 653–670.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. und Janeway, C. (2012) *Janeway's immunobiology*, Garland Science, New York.
- Muschler, G. F., Raut, V. P., Patterson, T. E., Wenke, J. C. und Hollinger, J. O. (2010) „The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine“, *Tissue engineering. Part B, Reviews* 16(1): 123–145.
- Myrissa, A., Agha, N. A., Lu, Y., Martinelli, E., Eichler, J., Szakács, G., Kleinhans, C., Willumeit-Römer, R., Schäfer, U. und Weinberg, A.-M. (2016) „In vitro and in vivo comparison of binary Mg alloys and pure Mg“, *Materials Science and Engineering: C* 61: 865–874.
- Nassif, N. und Ghayad, I. (2013) „Corrosion Protection and Surface Treatment of Magnesium Alloys Used for Orthopedic Applications“, *Advances in Materials Science and Engineering* 2013: 10.
- Nicolls, M. R., Aversa, G. G., Pearce, N. W., Spinelli, A., Berger, M. F., Gurley, K. E. und Hall, B. M. (1993) „Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody“, *Transplantation* 55(3): 459–468.
- Niemeyer, M., Windhagen, H., Meyer-Lindenberg, A., Witte, F., Switzer, E., Kaese, V., Fabian, T., Heublein, B. und Rohde, R. (2001) „Magnesiumlegierungen als degradabler Werkstoff für medizinische Anwendungen“ In *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 238.
- Niinomi, M. (2002) „Recent metallic materials for biomedical applications“, *Metallurgical and Materials Transactions A* 33(3): 477.
- Noviana, D., Estuningsih, S., Paramitha, D., Nur Utami, M., Dwi Utami, N., Fakhrol Ulum, M. und Hermawan, H. (2012) „In vivo study of iron based material foreign bodies in mice (Mus

- musculus albinus)“, *The 7TH International Conference On Biomedical Engineering And Medical Application (ICBEMA) Proceedings*: 91–94.
- Nuss, K. M., Auer, J. A., Boos, A. und von Rechenberg, B. (2006) „An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones“, *BMC musculoskeletal disorders* 7: 67.
- Nuss, K. M. R. und von Rechenberg, B. (2008) „Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics“, *The Open Orthopaedics Journal* 2: 66–78.
- Nüsse, O. (2011) „Biochemistry of the Phagosome: The Challenge to Study a Transient Organelle“, *TheScientificWorldJOURNAL* 11: 18.
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K. und Ghahary, A. (2013) „Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing“, *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2(5): 215–224.
- Paramitha, D., Noviana, D., Estuningsih, S., Ulum, M. F., Nasution, A. K. und Hermawan, H. (2015) „Peripheral white blood cells profile of biodegradable metal implant in mice animal model“, *AIP Conference Proceedings* 1677(1): 070022.
- Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Nobie, B. und Cohen, R. E. (2003) „Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes“, *Journal of periodontal research* 38(5): 458–464.
- Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E. und Pearce, S. G. (2007) „Animal models for implant biomaterial research in bone: a review“, *European cells & materials* 13: 1–10.
- Petillo, O., Peluso, G., Ambrosio, L., Nicolais, L., Kao, W. J. und Anderson, J. M. (1994) „In vivo induction of macrophage Ia antigen (MHC class II) expression by biomedical polymers in the cage implant system“, *Journal of biomedical materials research* 28(5): 635–646.
- Peuster, M., Fink, C., Wohlsein, P., Bruegmann, M., Gunther, A., Kaese, V., Niemeyer, M., Haferkamp, H. und Schnakenburg, C. (2003) „Degradation of tungsten coils implanted into the subclavian artery of New Zealand white rabbits is not associated with local or systemic toxicity“, *Biomaterials* 24(3): 393–399.
- Pihlajamaki, H. K., Salminen, S. T., Tynnenen, O., Bostman, O. M. und Laitinen, O. (2010) „Tissue restoration after implantation of polyglycolide, polydioxanone, polylevulactide, and metallic pins in cortical bone: an experimental study in rabbits“, *Calcified tissue international* 87(1): 90–98.
- Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Savarino, L., Stea, S. und Tarabusi, C. (1988) „Results of histological grading on 100 cases of hip prosthesis failure“, *Biomaterials* 9(4): 314–318.
- Poinern, G. E. J., Brundavanam, S. und Fawcett, D. (2012) „Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties, Surface Modifications and Potential as a Biodegradable Orthopaedic Implant“, *American Journal of Biomedical Engineering* Vol. 2 (No. 6): 218–240.
- Rajabi, T. (2014) *Entwicklung eines mikrofluidischen Zweikammer-Chipsystems mit integrierter Sensorik fuer die Anwendung in der Tumorforschung*, Karlsruher Institut für Technologie.
- Rand, T. H., Cruikshank, W. W., Center, D. M. und Weller, P. F. (1991) „CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration“, *The Journal of experimental medicine* 173(6): 1521–1528.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. und Muller, W. A. (1999) „Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo“, *Immunity* 11(6): 753–761.
- Rapetto, C. und Leoncini, M. (2017) „Magmaris: a new generation metallic sirolimus-eluting fully bioresorbable scaffold: present status and future perspectives“, *Journal of Thoracic Disease* 9(Suppl 9): 903–913.
- Reifenrath, J., Marten, A. K., Angrisani, N., Eifler, R. und Weizbauer, A. (2015) „In vitro and in vivo corrosion of the novel magnesium alloy Mg–La–Nd–Zr: influence of the measurement technique and in vivo implant location“, *Biomedical Materials* 10(4): 045021.
- Remes, A. und Williams, D. F. (1992) „Immune response in biocompatibility“, *Biomaterials* 13(11): 731–743.
- Rhodes, N. P., Hunt, J. A. und Williams, D. F. (1994) „Quantification of the host response to implanted polymers in vivo by flow cytometry“, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(9): 666–670.
- Richmond, J. (2008) „Animal welfare and ISO – the International Organisation for Standardization“, *AATEX 14(Special Issue)*: 723–726.
- Richter, H. A., Kaden, P. und Mittermayer, C. (1988) „Vergleich der Bioverträglichkeit von Polypropylen und Polystyrol“ In *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 173.
- RKI (2007) „Prävention postoperativer Infektionen im Operationsgebiet: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut.“, *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 50(3): 377–393.

- Robinson, A. P., White, T. M. und Mason, D. W. (1986) „Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3“, *Immunology* 57(2): 239–247.
- Rodriguez, A., Voskerician, G., Meyerson, H., MacEwan, S. R. und Anderson, J. M. (2008) „T cell subset distributions following primary and secondary implantation at subcutaneous biomaterial implant sites“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 85(2): 556–565.
- Rodriguez, A., Macewan, S. R., Meyerson, H., Kirk, J. T. und Anderson, J. M. (2009) „The foreign body reaction in T-cell-deficient mice“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 90(1): 106–113.
- Rokkanen, P. U., Bostman, O., Hirvensalo, E., Makela, E. A., Partio, E. K., Patiala, H., Vainionpaa, S. I., Vihtonen, K. und Tormala, P. (2000) „Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology“, *Biomaterials* 21(24): 2607–2613.
- Rosengren, A., Danielsen, N. und Bjursten, L. M. (1997) „Inflammatory reaction dependence on implant localization in rat soft tissue models“, *Biomaterials* 18(14): 979–987.
- Rössig, C., Angrisani, N., Helmecke, P., Besdo, S., Seitz, J. M., Welke, B., Fedchenko, N., Kock, H. und Reifenrath, J. (2015) „In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model“, *Acta biomaterialia* 25: 369–383.
- Roth, I., Schumacher, S., Basler, T., Baumert, K., Seitz, J.-M., Evertz, F., Müller, P. P., Bäumer, W. und Kietzmann, M. (2015) „Magnesium corrosion particles do not interfere with the immune function of primary human and murine macrophages“, *Progress in Biomaterials* 4(1): 21–30.
- Rothenberg, M. E. und Hogan, S. P. (2006) „The eosinophil“, *Annu Rev Immunol* 24: 147–174.
- Russel, W. M. S. und Burch, R. L. (1959): Chapter 4.4 „The Removal of Inhumanity: The Three R's“ in Russel, W. M. S. and Burch, R. L., *The principles of humane experimental technique*, Methuen, London.
- Salahshoor, M. und Guo, Y. (2012) „Biodegradable Orthopedic Magnesium-Calcium (MgCa) Alloys, Processing, and Corrosion Performance“, *Materials (Basel, Switzerland)* 5(1): 135–155.
- Sanchez, A. H. M., Luthringer, B. J. C., Feyerabend, F. und Willumeit, R. (2014) *Mg and Mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? - A Review*.
- Santos, T. C., Marques, A. P., Horing, B., Martins, A. R., Tuzlakoglu, K., Castro, A. G., van Griensven, M. und Reis, R. L. (2010) „In vivo short-term and long-term host reaction to starch-based scaffolds“, *Acta biomaterialia* 6(11): 4314–4326.
- Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. und Lewenstam, A. (2000) „Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects“, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 294(1-2): 1–26.
- Sasaki, T., Sasaki-Irie, J. und Penninger, J. M. (2001) „New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45“, *Int J Biochem Cell Biol* 33(11): 1041–1046.
- Sastri, V. R. (2014): „6 - Commodity Thermoplastics: Polyvinyl Chloride, Polyolefins, and Polystyrene“ in, *Plastics in Medical Devices (Second Edition)*, William Andrew Publishing, Oxford: 73–120.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. und Cassatella, M. A. (2000) „The neutrophil as a cellular source of chemokines“, *Immunol Rev* 177: 195–203.
- Schermer, S. (1958): „Blut“ in Cohrs, P., Jaffé, R. and Meessen, H., *Pathologie der Laboratoriumstiere*, Springer-Verlag, Berlin: 176–234.
- Schimandle, J. H. und Boden, S. D. (1994) „Spine update. The use of animal models to study spinal fusion“, *Spine* 19(17): 1998–2006.
- Schultz, G., Rotatori, D. S. und Clark, W. (1991) „EGF and TGF-alpha in wound healing and repair“, *J Cell Biochem* 45(4): 346–352.
- Schwitalla, A., Spintig, T., Kallage, I., Wagner, R. und Müller, W.-D. (2014) „Polyetheretherketon (PEEK) – ein vielversprechender Werkstoff für die Zukunft“, *umwelt medizin gesellschaft* 27(4): 255–261.
- Scriba, A., Schneider, M., Grau, V., van der Meide, P. H. und Steiniger, B. (1997) „Rat monocytes up-regulate NKR-P1A and down-modulate CD4 and CD43 during activation in vivo: monocyte subpopulations in normal and IFN-gamma-treated rats“, *Journal of Leukocyte Biology* 62(6): 741–752.
- Seal, C. K., Vince, K. und Hodgson, M. A. (2009) „Biodegradable surgical implants based on magnesium alloys – A review of current research“, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 4(1): 012011.
- Seitz, J. M., Eifler, R., Bach, F. W. und Maier, H. J. (2014) „Magnesium degradation products: Effects on tissue and human metabolism“, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102(10): 3744–3753.

- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z. und Bowlin, G. L. (2017) „An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration“, *Regen Biomater* 4(1): 55–68.
- Shapiro, H. M. (2003) *Practical flow cytometry*, Wiley-Liss, New York.
- Sheng, L., Yu, Q., Xie, F. und Li, Q. (2014) „Foreign body response induced by tissue expander implantation“, *Mol Med Rep* 9(3): 872–876.
- Shieh, S. J., Varkey, P., Chen, P. Y., Chang, S. Y. und Huang, L. L. (2014) „Counting CD4(+) and CD8(+) T cells in the spleen: a novel in vivo method for assessing biomaterial immunotoxicity“, *Regen Biomater* 1(1): 11–16.
- Shlomchik, W. D. (2007) „Graft-versus-host disease“, *Nature reviews. Immunology* 7(5): 340–352.
- Shlopov, B. V. und Hasty, K. A. (1998) „Collagenase expression by normal human eosinophils“, *J Leukoc Biol* 63(4): 451–455.
- Slack, S. M., Bohnert, J. L. und Horbett, T. A. (1987) „The effects of surface chemistry and coagulation factors on fibrinogen adsorption from plasma“, *Annals of the New York Academy of Sciences* 516: 223–243.
- Smerup, M., Pedersen, T. F., Nyboe, C., Funder, J. A., Christensen, T. D., Nielsen, S. L., Hjortdal, V. und Hasenkam, J. M. (2004) „A long-term porcine model for evaluation of prosthetic heart valves“, *The heart surgery forum* 7(4): E259–264.
- Smith, J. A. (1994) „Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword“, *J Leukoc Biol* 56(6): 672–686.
- Song, G. (2005) „Recent Progress in Corrosion and Protection of Magnesium Alloys“, *Advanced Engineering Materials* 7(7): 563–586.
- Song, G. und Song, S. (2007) „A Possible Biodegradable Magnesium Implant Material“, *Advanced Engineering Materials* 9(4): 298–302.
- Song, G. L. und Atrens, A. (1999) „Corrosion Mechanisms of Magnesium Alloys“, *Advanced Engineering Materials* 1(1): 11–33.
- Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J. und Dias, G. (2006) „Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review“, *Biomaterials* 27(9): 1728–1734.
- Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1973) „Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution“, *The Journal of experimental medicine* 137(5): 1142–1162.
- Sumner, D. R. (2015) „Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement“, *Journal of biomechanics* 48(5): 797–800.
- Sunderland, C. A., McMaster, W. R. und Williams, A. F. (1979) „Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes“, *Eur J Immunol* 9(2): 155–159.
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R. und Pittet, M. J. (2009) „Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites“, *Science* 325(5940): 612–616.
- Tang, L. und Eaton, J. W. (1993) „Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials“, *The Journal of experimental medicine* 178(6): 2147–2156.
- Tang, L., Jennings, T. A. und Eaton, J. W. (1998) „Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(15): 8841–8846.
- Terstappen, L. W., Meiners, H. und Loken, M. R. (1989) „A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations“, *J Immunol Methods* 123(1): 103–112.
- Thevenot, P. T., Baker, D. W., Weng, H., Sun, M. W. und Tang, L. (2011) „The pivotal role of fibrocytes and mast cells in mediating fibrotic reactions to biomaterials“, *Biomaterials* 32(33): 8394–8403.
- Thull, R., Trautner, K. und Karle, E. J. (1992) „Modell zur immunologischen Prüfung von Biomaterialien - Testing of Biomaterials“ In *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 162.
- Thull, R. (1994) „Naturwissenschaftliche Aspekte von Werkstoffen in der Medizin“, *Naturwissenschaften* 81(11): 481–488.
- Tizard, I. R. (2013) *Veterinary immunology*, Elsevier/Saunders, St. Louis, Mo.
- Todd, R., Donoff, B. R., Chiang, T., Chou, M. Y., Elovic, A., Gallagher, G. T. und Wong, D. T. (1991) „The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds“, *The American journal of pathology* 138(6): 1307–1313.

- Toth, J. M. (2011): Chapter 7 „Biocompatibility of Polyaryletheretherketone Polymers“ in Kurtz, S. M., *PEEK Biomaterials Handbook*, Elsevier Inc., Oxford: 81–92.
- Trautmann, A., Toksoy, A., Engelhardt, E., Bröcker, E. B. und Gillitzer, R. (2000) „Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo“, *The Journal of Pathology* 190(1): 100–106.
- Vaisman, B., Motiei, M., Nyska, A. und Domb, A. J. (2010) „Biocompatibility and safety evaluation of a ricinoleic acid-based poly(ester-anhydride) copolymer after implantation in rats“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 92(2): 419–431.
- van den Brandt, J., Wang, D., Kwon, S. H., Heinkelein, M. und Reichardt, H. M. (2004) „Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo“, *Genesis (New York, N. Y. : 2000)* 39(2): 94–99.
- van Goor, H., Harms, G., Gerrits, P. O., Kroese, F. G., Poppema, S. und Grond, J. (1988) „Immunohistochemical antigen demonstration in plastic-embedded lymphoid tissue“, *J Histochem Cytochem* 36(1): 115–120.
- van Luyn, M. J., Plantinga, J. A., Brouwer, L. A., Khouw, I. M., de Leij, L. F. und van Wachem, P. B. (2001) „Repetitive subcutaneous implantation of different types of (biodegradable) biomaterials alters the foreign body reaction“, *Biomaterials* 22(11): 1385–1391.
- van Wachem, P. B., van Luyn, M. J., Olde Damink, L. H., Dijkstra, P. J., Feijen, J. und Nieuwenhuis, P. (1994) „Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen“, *Journal of biomedical materials research* 28(3): 353–363.
- Vasilijic, S., Savic, D., Vasilev, S., Vučević, D., Gasic, S., Majstorovic, I., Jankovic, S. und Colic, M. (2005) „Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation“, *Cell Immunol* 233(2): 148–157.
- VDI 5701:2016-09 (Entwurf) „Biomaterialien in der Medizin - Klassifikation, Anforderungen und Anwendungen“, Beuth Verlag, Berlin.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. und Ugolini, S. (2008) „Functions of natural killer cells“, *Nat Immunol* 9(5): 503–510.
- Vroman, L. und Adams, A. L. (1969) „Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces“, *Surface Science* 16(Supplement C): 438–446.
- Waizy, H., Seitz, J.-M., Reifenrath, J., Weizbauer, A., Bach, F.-W., Meyer-Lindenberg, A., Denkena, B. und Windhagen, H. (2013) „Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications“, *Journal of Materials Science* 48(1): 39–50.
- Waizy, H., Diekmann, J., Weizbauer, A., Reifenrath, J., Bartsch, I., Neubert, V., Schavan, R. und Windhagen, H. (2014) „In vivo study of a biodegradable orthopedic screw (MgYREZr-alloy) in a rabbit model for up to 12 months“, *Journal of biomaterials applications* 28(5): 667–675.
- Waksman, R., Pakala, R., Kuchulakanti, P. K., Baffour, R., Hellinga, D., Seabron, R., Tio, F. O., Wittchow, E., Hartwig, S., Harder, C., Rohde, R., Heublein, B., Andreae, A., Waldmann, K. H. und Haverich, A. (2006) „Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries“, *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 68(4): 607–617; discussion 618–609.
- Walker, J., Shadanbaz, S., Kirkland, N. T., Stace, E., Woodfield, T., Staiger, M. P. und Dias, G. J. (2012) „Magnesium alloys: predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing“, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 100(4): 1134–1141.
- Walker, J., Shadanbaz, S., Woodfield, T. B., Staiger, M. P. und Dias, G. J. (2014) „The in vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility of Mg alloys“, *Biomedical materials (Bristol, England)* 9(1): 015006.
- Wallgren, A. C., Karlsson-Parra, A. und Korsgren, O. (1995) „The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4+ macrophage and not a T lymphocyte“, *Transplantation* 60(6): 594–601.
- Wancket, L. M. (2015) „Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses“, *Veterinary pathology* 52(5): 842–850.
- Wang, X. J., Han, G., Owens, P., Siddiqui, Y. und Li, A. G. (2006) „Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing“, *J Investig Dermatol Symp Proc* 11(1): 112–117.
- Wang, Y., Vaddiraju, S., Gu, B., Papadimitrakopoulos, F. und Burgess, D. J. (2015) „Foreign Body Reaction to Implantable Biosensors: Effects of Tissue Trauma and Implant Size“, *Journal of Diabetes Science and Technology* 9(5): 966–977.
- White, R. A., Mason, D. W., Williams, A. F., Galfre, G. und Milstein, C. (1978) „T-lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody“, *The Journal of experimental medicine* 148(3): 664–673.

- Willbold, E., Kaya, A. A., Kaya, R. A., Beckmann, F. und Witte, F. (2011) „Corrosion of magnesium alloy AZ31 screws is dependent on the implantation site“, *Materials Science and Engineering: B* 176(20): 1835–1840.
- Willbold, E., Kalla, K., Bartsch, I., Bobe, K., Brauneis, M., Remennik, S., Shechtman, D., Nellesen, J., Tillmann, W., Vogt, C. und Witte, F. (2013) „Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal“, *Acta biomaterialia* 9(10): 8509–8517.
- Willbold, E., Weizbauer, A., Loos, A., Seitz, J.-M., Angrisani, N., Windhagen, H. und Reifenrath, J. (2017) „Magnesium alloys: A stony pathway from intensive research to clinical reality. Different test methods and approval-related considerations“, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105(1): 329–347.
- Williams, D. F., McNamara, A. und Turner, R. M. (1987) „Potential of polyetheretherketone (PEEK) and carbon-fibre-reinforced PEEK in medical applications“, *Journal of Materials Science Letters* 6(2): 188–190.
- Williams, G. M., Hume, D. M., Hudson, R. P., Jr., Morris, P. J., Kano, K. und Milgrom, F. (1968) „"Hyperacute" renal-homograft rejection in man“, *The New England journal of medicine* 279(12): 611–618.
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. und Percy, M. J. (2005) „Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review“, *Tissue engineering* 11(1-2): 1–18.
- Windhagen, H., Radtke, K., Weizbauer, A., Diekmann, J., Noll, Y., Kreimeyer, U., Schavan, R., Stukenborg-Colsman, C. und Waizy, H. (2013) „Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study“, *BioMedical Engineering OnLine* 12: 62–62.
- Wisniewski, N., Rajamand, N., Adamsson, U., Lins, P. E., Reichert, W. M., Klitzman, B. und Ungerstedt, U. (2002) „Analyte flux through chronically implanted subcutaneous polyamide membranes differs in humans and rats“, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(6): E1316–1323.
- Witte, F., Kaese, V., Haferkamp, H., Switzer, E., Meyer-Lindenberg, A., Wirth, C. J. und Windhagen, H. (2005) „In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response“, *Biomaterials* 26(17): 3557–3563.
- Witte, F., Ulrich, H., Rudert, M. und Willbold, E. (2007) „Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 81(3): 748–756.
- Witte, F., Hort, N., Vogt, C., Cohen, S., Kainer, K. U., Willumeit, R. und Feyerabend, F. (2008a) „Degradable biomaterials based on magnesium corrosion“, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 12(5): 63–72.
- Witte, F., Abeln, I., Switzer, E., Kaese, V., Meyer-Lindenberg, A. und Windhagen, H. (2008b) „Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 86(4): 1041–1047.
- Witte, F. (2010) „The history of biodegradable magnesium implants: a review“, *Acta biomaterialia* 6(5): 1680–1692.
- Wong, D. T., Donoff, R. B., Yang, J., Song, B. Z., Matossian, K., Nagura, N., Elovic, A., McBride, J., Gallagher, G., Todd, R. und et al. (1993) „Sequential expression of transforming growth factors alpha and beta 1 by eosinophils during cutaneous wound healing in the hamster“, *The American journal of pathology* 143(1): 130–142.
- Xia, Z. und Triffitt, J. T. (2006) „A review on macrophage responses to biomaterials“, *Biomedical materials (Bristol, England)* 1(1): R1–9.
- Xin, Y., Hu, T. und Chu, P. K. (2011) „In vitro studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: a review“, *Acta biomaterialia* 7(4): 1452–1459.
- Xu, L., Yu, G., Zhang, E., Pan, F. und Yang, K. (2007) „In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 83(3): 703–711.
- Xue, D., Yun, Y., Tan, Z., Dong, Z. und Schulz, M. J. (2012) „In Vivo and In Vitro Degradation Behavior of Magnesium Alloys as Biomaterials“, *Journal of Materials Science & Technology* 28(3): 261–267.
- Yang, L. und Zhang, E. (2009) „Biocorrosion behavior of magnesium alloy in different simulated fluids for biomedical application“, *Materials Science and Engineering: C* 29(5): 1691–1696.
- Yokoyama, M., Nakahashi, T., Nishimura, T., Maeda, M., Inoue, S., Kataoka, K. und Sakurai, Y. (1986) „Adhesion behavior of rat lymphocytes to poly(ether)-poly(amino acid) block and graft copolymers“, *Journal of biomedical materials research* 20(7): 867–878.

- Yousif, M. und Qasem, S. (2016): Chapter 3 „Tissue Processing and Staining for Histological Analyses“ in Albanna, M. Z. and Holmes, J. H., *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier Inc.: 49–59.
- Yrliđ, U., Jenkins, C. D. und MacPherson, G. G. (2006) „Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176(7): 4155–4162.
- Ysebaert, D. K., De Greef, K. E., Vercauteren, S. R., Ghielli, M., Verpooten, G. A., Eyskens, E. J. und De Broe, M. E. (2000) „Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury“, *Nephrol Dial Transplant* 15(10): 1562–1574.
- Zainal Abidin, N. I., Rolfe, B., Owen, H., Malisano, J., Martin, D., Hofstetter, J., Uggowitzer, P. J. und Atrens, A. (2013) „The in vivo and in vitro corrosion of high-purity magnesium and magnesium alloys WZ21 and AZ91“, *Corrosion Science* 75: 354–366.
- Zdolsek, J., Eaton, J. W. und Tang, L. (2007) „Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans“, *Journal of translational medicine* 5: 31.
- Zhang, E., Xu, L., Yu, G., Pan, F. und Yang, K. (2009) „In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation“, *Journal of biomedical materials research. Part A* 90(3): 882–893.
- Zhang, S., Zhang, X., Zhao, C., Li, J., Song, Y., Xie, C., Tao, H., Zhang, Y., He, Y., Jiang, Y. und Bian, Y. (2010) „Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial“, *Acta biomaterialia* 6(2): 626–640.
- Zheng, F., Lin, Y., Verbeken, E., Claerhout, F., Fastrez, M., De Ridder, D. und Deprest, J. (2004) „Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model“, *Am J Obstet Gynecol* 191(6): 1961–1970.
- Zheng, Y. F., Gu, X. N. und Witte, F. (2014) „Biodegradable metals“, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 77(Supplement C): 1–34.
- Zysk, S. P., Gebhard, H. H., Kalteis, T., Schmitt-Sody, M., Jansson, V., Messmer, K. und Veihelmann, A. (2005) „Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo“, *Clinical orthopaedics and related research* (433): 258–264.

10. Anhang

10.1 Materialien

Tab. A1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10X RBC Lysis Buffer (Multi-species)	eBioscience (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Aqua dest.	Charité – Universitätsmedizin Berlin
Argon 5.0	Linde AG
Chlorophorm-d	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)
Chrom(VI)-oxid-Lösung 20 % zur Analyse	Bernd Kraft GmbH
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH
DAPI	AnaSpec Inc.
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (D5025)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)
DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1X) (ohne Calcium, ohne Magnesium)	Gibco® (Thermo Fisher Scientific Inc.)
<i>Escherichia coli</i> (Stamm TG1)	Lucigen Corporation
Ethanol 100 %	Merck KGaA
FBS Superior	Biochrom GmbH (Merck KGaA)
Flow Cytometry Staining Buffer (FACS-Puffer)	eBioscience (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Glykogen (RNA Qualität)	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Haema-Schnellfärbesatz (Diff-Quick)	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH
HEPES (H4034)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Hyaluronidase from bovine testes (Type IV-S) (H3884)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)
Immersionsöl	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit, 2x konzentriert	Roche Diagnostics GmbH
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG
Natriumpyruvat (A4859)	AppliChem GmbH
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
RNase AWAY®	Molecular BioProducts Inc.
Sauerstoff	Linde AG

Chemikalie	Hersteller
Sterilium® classic pure Händedesinfektionsmittel	BODE Chemie GmbH (Paul Hartmann AG)
TRIZOL® Reagenz	Ambion® (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Trypanblau (Trypan Blue Solution)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA)

Tab. A2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
C-Chip Einweg-Zählkammer (Neubauer improved Zählkammer)	Biochrom GmbH (Merck KGaA)
Cytoträger, 1 Kreis, beschichtet	Tharmac GmbH
DNA LoBindTube 1,5 ml	Eppendorf AG
DNA Low Binding Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co.
EASY Cellfunnel® Single mit weißer Filterkarte	Tharmac GmbH
Einmal-Pasteurpipette 3,5 ml	Sarstedt AG & Co.
Einmal-Sicherheitskalpell 21	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Spritze 2-teilig (2 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Untersuchungs-Handschuhe	B. Braun Melsungen AG
Konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon® (Corning Incorporated)
Lithium-Heparin Blutröhrchen 2 ml	BD (Beckton Dickinson)
Lithium-Heparin Mikro-Probengefäß 1,3 ml	Sarstedt AG & Co.
Microseal® 'B' Klebefolie	Bio-Rad Laboratories
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
PCR 96-well Mikroplatte	Axygen® (Corning Incorporated)
Rundboden-Röhrchen 5 ml, mit in der Kappe integriertem Zellsieb (35 µm)	Falcon® (Corning Incorporated)
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf AG
Serologische Pipette (10 ml, 25 ml)	Falcon® (Corning Incorporated)
Zellkulturschale (35x10 mm, 100x20 mm)	Falcon® (Corning Incorporated)
Zellsieb (40 µm, 100 µm)	Falcon® (Corning Incorporated)

Tab. A3: Hergestellte Puffer

Puffer	
Phosphatpuffer	2 % FBS in DPBS
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 % „10X RBC Lysis Buffer (Multi-species)“ in Aqua dest.
Kollagenase-Puffer	DPBS/2 %FBS + 2,3 U/mg Collagenase P + 2,0 mg/ml Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (≥ 4000 KU/ml) + 0,24 g/ml HEPES + 2,5 mg/ml Hyaluronidase from bovine testes (Type IV-S) + 11,5 mg/ml Natriumpyruvat

Tab. A4: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Durchflusszytometer	MACSQuant Analyzer 10 Software Version 2.4.1229.1 und 2.6.1517.13814	Miltenyi Biotec GmbH
Elektronische Analyse- und Präzisionswaage	Typ S-64 (Ablesbarkeit d = 0,1 mg)	Denver Instrument GmbH (Sartorius AG)/BeWa-tec
Exsikkator		Carl Roth GmbH + Co. KG
Gefrierschrank (-80 °C)		Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Glovebox		GS Glovebox Systemtechnik GmbH
Homogenisator (Crush-Kit)		Centrum Wissenschaftliche Werkstätten (CVK, Charité – Universitätsmedizin Berlin)
Inkubator	Heracell 150	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Kühl- und Gefrierschrank	CU 3503	Liebherr
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Lichtmikroskop mit Kamera	Leica DMRB Zeiss AxioCam MRc	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Carl Zeiss Microscopy GmbH
Nanophotometer	NanoPhotometer® P360	Implen GmbH
Pipette 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH
Thermocycler	LightCycler® 480 II	Roche Diagnostics GmbH
Thermocycler	Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc.
Zellsortiergerät	BD FACSAria II SORP	BD Biosciences
Zentrifuge	Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter Life Sciences

Gerät	Typ	Hersteller
Zytozentrifuge	Shandon Cytospin® 4 Zyt-zentrifuge	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Tab. A5: Tierexperimentelle Materialien und Geräte

Material / Gerät	Hersteller
Abdecktuch SK 2-lagig 75x90 cm	Charité – Universitätsmedizin Berlin (Hubei Haige Medical Instrument Co.)
Anatomische Pinzette	Aesculap AG (B. Braun Melsungen AG)
Einmal-OP-Handschuhe	Ansell Healthcare LLC
Einweg-OP-Haube	Farstar medical GmbH
Einweg-OP-Maske	Paul Hartmann AG
Einmal-Sicherheitsskalpell 21	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Spritze 2-teilig (2 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun Melsungen AG
Feindosierungsspritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG
Infrarot-Wärmestrahlergerät	Albert Kerbl GmbH
Mullkompressen Set (10x10 cm)	Charité – Universitätsmedizin Berlin (Hubei Haige Medical Instrument Co.)
Nadelhalter	Aesculap AG (B. Braun Melsungen AG)
Nahtmaterial (Vicryl 5-0)	Ethicon Deutschland (Johnson & Johnson Medical GmbH)
Narkosebox	Centrum Wissenschaftliche Werkstätten (CVK, Charité – Universitätsmedizin Berlin)
Narkosegerät (Sulla 808)	Drägerwerk AG & Co. KGaA
Narkosemaske (Tiermaske)	Centrum Wissenschaftliche Werkstätten (CVK, Charité – Universitätsmedizin Berlin)
Pinzette (Plastik)	VITLAB GmbH
Präparierschere	Aesculap AG (B. Braun Melsungen AG)
Präzisionswaage (PCB 1000)	Kern & Sohn GmbH
Schermaschine (GT410 Vega)	Aesculap AG (B. Braun Melsungen AG)
Sterican® Einmal-Standardkanüle (20G x 1 ½, 22G x 1 ¼, 24G x 1)	B. Braun Melsungen AG
Vapor 19.3 für Isofluran	Drägerwerk AG & Co. KGaA
Vlieskompressen	Charité – Universitätsmedizin Berlin (Hubei Haige Medical Instrument Co.)
Wärmematte	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH
Wundhaken	Aesculap AG (B. Braun Melsungen AG)

Tab. A6: Verwendete Computerprogramme

Software	Hersteller
AxioVision (Version 4.8.2)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
EndNote X8.2	Thomson Reuters
FlowJo (Version 9.7.6)	FlowJo LLC
LightCycler® 480 Software (Version 1.5.1)	Roche Diagnostics GmbH
Lighthouse 6	Adobe Systems
MACSQuantify Software (Version 2.4 und 2.6)	Miltenyi Biotec GmbH
Microsoft® Excel 2016 (Version 16.0)	Microsoft
Microsoft® Word 2016 (Version 16.0)	Microsoft
Photoshop Elements 15	Adobe Systems
SPSS Statistics (Version 22.0)	IBM

Tab. A7: Hergestellte Aliquots

Aliquots	
Deoxyribonuclease	200 µl Aliquots aus 4,7 mg Deoxyribonuclease in 2,35 ml NaCl
HEPES	100 µl Aliquots aus 0,715 g HEPES in 3 ml H ₂ O
Hyaluronidase	100 µl Aliquots aus 0,01 g Hyaluronidase in 4 ml DPBS
Natriumpyruvat	100 µl Aliquots aus 0,0575 g Natriumpyruvat in 5 ml DPBS

Tab. A8: Verwendete Isotyp-Kontrollen

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Mouse IgG1 K Isotype Control eFluor 450	P3.6.2.8.1	Mouse IgG1, kappa	1:50	eBioscience
Mouse IgG2a K Isotype Control PerCP-eFluor 710	eBM2a	Mouse IgG2a, kappa	1:400	eBioscience
Mouse IgG1 K Isotype Control PE-Cyanine7	P3.6.2.8.1	Mouse IgG1, kappa	1:400	eBioscience
Mouse IgM Isotype Control FITC	eMM15	Mouse IgM, kappa	1:200	eBioscience
Mouse IgG2a K Isotype Control PE	eBM2a	Mouse IgG2a, kappa	1:10 bzw. 1:200	eBioscience
Rat IgG2b K Isotype Control APC-eFluor 780	eB149/10H5	Rat IgG2b, kappa	1:50	eBioscience

10.2 Postoperative Überwachungsbögen

Überwachungsbogen für Doktoranden

Merkmale:	Isolation / Augentränen / Körperhaltung / Piloerektion / Lahmheit	
	Jedes Merkmal wird in den ersten drei postoperativen Tagen einzeln beurteilt und mit 0 bis 3 Punkten bewertet.	
	Die einzelnen Punkte werden addiert. Ab einem Punktwert von 4 erfolgt die Einleitung medikamentöser Therapie, bei 8 oder mehr erfolgt der Abbruch durch sofortige Euthanasie.	
	Der Allgemeinzustand wird beschreibend bewertet (gut, leicht reduziert, deutlich reduziert, schlecht).	
Punktevergabe:	Ausprägung	Punkte
	nicht vorhanden	0
	leicht	1
	mittel	2
	schwer	3
allgemeine Abbruchkriterien:	deutlich reduzierter Allgemeinzustand (Somnolenz), eingesunkene Augen, Dyspnoe, Seitenlage, offene Wunden, Gewichtsverlust größer 20 %, Muskelatrophie	
zusätzlich Erfassung von:	Trinkmenge, Körpermasse 1x/Woche, Medikation, Besonderheiten	

Überwachungsbogen für Tierpfleger

Score für die Tiermodelle aus dem Tierversuch:
„Biokompatibilität magnesiumbasierter Implantatmaterialien“

Der im Anschluss aufgeführte Score für dieses Versuchsvorhaben wurde in Zusammenarbeit mit der Tierschutzbeauftragten der Tierexperimentellen Abteilung am Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin erarbeitet.

Überwachung der Tiere:

Die Tiere werden postoperativ unter ständiger Beobachtung gehalten, bis sie vollständig aufgewacht sind. Erst jetzt werden sie wieder in den Stall verbracht.

Es finden in den ersten drei postoperativen Tagen täglich und anschließend mindestens wöchentlich Kontrollen durch einen Tierarzt statt. Weiterhin werden die Tiere vom Tierpflegepersonal der Versuchstiereinrichtung der Charité beobachtet. Das Tierpflegepersonal ist ausgebildet und in der Lage, die Tiere bei Erreichen der Abbruchkriterien schmerzlos zu töten. Die Tierpfleger kontrollieren die Tiere mehrmals täglich und können in dieser Zeit immer einen Tierarzt erreichen. Neben Herrn Michael Meißler, der als Tierarzt in der tierexperimentellen Einrichtung verantwortlich ist, stehen in diesem Projekt Frau Tanja Schmidt und Frau Katharina Schmidt-Bleek als Tierärzte und Ansprechpartner zur Verfügung. Ihre Kontaktdaten werden auf den Score-Sheets im Tierhaltungsraum verzeichnet sein.

Anweisungen:

Score –: ohne besonderen Befund

Score A: bei täglicher Visite besprechen/ Rücksprache Tierpfleger und Tierarzt

Score B: Tierpfleger muss sofort den Tierarzt benachrichtigen. Nach Beurteilung der pathophysiologischen und klinischen Ausbildung der Symptome wird der Tierarzt *lege artis* handeln, wenn eine Leidensminderung und die Aufrechterhaltung der wissenschaftlichen Aussagekraft möglich sind.

Intervention: Nach Diagnosefindung wird anhand der Symptome entschieden: Schmerz = Analgesie, Infektion = Antibiose, Kreislauf = Infusionstherapie

Score C: Sinnvolle Fortführung des Versuches ist nicht gegeben, ein Therapieerfolg ist fraglich und nur unter extremer Belastung für das Tier verwirklichtbar. Hier hat die sofortige Euthanasie des betroffenen Tieres zu erfolgen.

Spezielle Haltungs- und Pflegemaßnahmen sind bei normalem Versuchsablauf nicht vorgesehen. Die Tierärzte können kurzfristig notwendige Haltungs- und Pflegemaßnahmen vornehmen und die Gewichtskontrolle bei auffälligen Tieren in täglichen Intervallen anordnen.

Kritische Zeitpunkte bestehen für das Tier direkt postoperativ. Während dieser Zeit sind sie unter tierärztlicher Beobachtung.

Symptome	Score
Ohne besonderen Befund	–
verminderte Fellpflege	A
verklebte Augen bzw. Nase	A
Piloerektion	A
Fell struppig	A
Tier vermeidet Bewegung	B
Lahmheit	B
Entlastung einer Gliedmaße im Stand	B
gekrümmte Körperhaltung	B

Symptome	Score
Tier isoliert sich	B
Apathie	B
Verminderte Futteraufnahme, Gewichtsverlust 5–15 %	B
Benagen der Wunde	B
Sekretion aus Wunde	B
deutliche Wundschwellung	B
Gasbildung unter der Haut	B
Nahtdehiszenz ohne klaffende Wunde	B
Allgemeinzustand deutlich reduziert (Somnolenz)	C
Augen eingesunken	C
Dyspnoe	C
Seitenlage	C
Offene Wundverhältnisse, klaffende Wunde	C
Kachexie (Gewichtsverlust >20 %, keine Fettdepots mehr vorhanden, Hervortreten der Beckenknochen, Einsinken der Augäpfel)	C
Muskelatrophie	C

Abbruchkriterien: Beim Eintreten von Symptomen der Score-Kategorie C ist das Tier sofort zu euthanasieren.

Bei Auftreten von mehreren Symptomen der Score-Kategorie A oder einem Symptom der Score-Kategorie B sofortige Verständigung des Tierarztes.

10.3 Plausibilitätskriterien

Für die Auswertbarkeit der Proben mussten folgende Plausibilitätskriterien vollständig erfüllt werden:

- ausreichende Menge an Probenmaterial,
- ausreichende Anzahl vitaler Zellen,
- durchflusszytometrische Trennbarkeit der Zellpopulationen,
- korrekte durchflusszytometrische Färbung.

10.4 Ausgeschlossene Proben

Tab. A9: Ausgeschlossene Proben

Tier	Implantatmaterial	Zeitpunkt	Probenmaterial	Ausschlusskriterium
6	PS	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
7	PEEK	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
8	PEEK	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
10	PEEK	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
14	PEEK	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
22	PS	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
23	PEEK	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
58	Mg	OP	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
9	PEEK	3	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
14	PEEK	3	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
97	Mg	3	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
27	PS	7	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
85	Mg	14	Blut	unzureichende Menge Probenmaterial (Koagulation)
11	PEEK	7	Milz	unzureichende Zahl vitaler Zellen (Probleme bei der Probenaufarbeitung)
145	PEEK	1	Kapsel s.c.	statistischer Ausreißer
151	PS	1	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
120	Mg	1	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
117	Mg	3	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
118	Mg	3	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
25	PS	7	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
28	PS	7	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
20	Mg	21	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
62	PEEK	28	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
33	PS	28	Kapsel s.c.	Kontamination mit lymphatischem Gewebe
135	Mg	3	Kapsel i.m.	statistischer Ausreißer
14	PEEK	3	Kapsel i.m.	unzureichende Zahl vitaler Zellen (Probleme bei der Probengewinnung und -aufarbeitung)
5	PS	14	Kapsel i.m.	unzureichende Zahl vitaler Zellen (Probleme bei der Probengewinnung und -aufarbeitung)

PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, OP = präoperative Probe, s.c. = subkutan, i.m. = intramuskulär

10.5 Signifikanztabellen

Tab. A10: Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse im Blut: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 18), Stichprobenumfang siehe Tab. 12

Vergleich der Zeitpunkte		Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 28
PEEK	lebende Leukozyten / μ l Vollblut	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺	0,01	0,004	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48med ¹	0,01	0,009	0,041
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
PS	lebende Leukozyten / μ l Vollblut	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48med ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	0,009
Mg	lebende Leukozyten / μ l Vollblut	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	0,015	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48med ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	0,004	0,002	0,015
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A11: Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse im Blut: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 18), Stichprobenumfang siehe Tab. 12

Vergleich der Materialien		PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg
Tag 1	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	0,015
Tag 3	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.

Vergleich der Materialien		PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg
Tag 7	CD3+CD8a ⁺	n. s.	0,002	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 14	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 21	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 28	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A12: Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Milz: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 19), Stichprobenumfang siehe Tab. 13

Vergleich der Zeitpunkte		Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 28
PEEK	lebende Leukozyten / Milz	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	0,004	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	0,002	0,004	0,002
	CD3-CD11bc+HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	0,009
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
PS	lebende Leukozyten / Milz	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	0,002
	CD3+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	0,009	0,015	0,002
	CD3-CD11bc+HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	0,004

Vergleich der Zeitpunkte		Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 28
Mg	lebende Leukozyten / Milz	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3+CD8a ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48low ¹	0,015	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc+HIS48high ¹	0,002	0,002	0,004
	CD3-CD11bc+HIS48 ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-CD11bc-HIS48 ⁻¹	0,002	0,009	0,002

¹ % an lebenden Leukozyten, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A13: Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Milz: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 19), Stichprobenumfang siehe Tab. 13

Vergleich der Materialien		PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg
Tag 1	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 3	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 7	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 14	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	0,004
Tag 21	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 28	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A14: Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der subkutanen Fremdkörperkapsel: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 20), Stichprobenumfang siehe Tab. 14

Vergleich der Zeitpunkte		Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 14	Tag 1 / 28	Tag 3 / 7	Tag 7 / 28
PEEK	lebende Leukozyten / Kapsel s.c.	n. s.	0,004	0,009	0,008	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ⁺¹	0,004	0,004	0,004	0,008	n. s.	n. s.
	CD3+CD8a ⁺¹	0,009	0,004	0,004	0,008	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,004	0,004	0,004	0,008	0,041	0,004
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	0,004	0,008	n. s.	0,009
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	0,009	n. s.	0,008	n. s.	0,004
	CD3-HIS48+CD4 ⁺¹	n. s.	0,004	0,004	0,008	0,002	0,004
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²	0,004	0,004	0,004	0,008	0,002	0,017
	CD3-HIS48+CD4+HIS36 ⁺²	n. s.	0,004	0,004	0,008	0,002	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹	0,004	0,004	0,004	0,008	0,002	0,004

Vergleich der Zeitpunkte	Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 14	Tag 1 / 28	Tag 3 / 7	Tag 7 / 28
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	n. s.	n. s.	0,004	0,008	0,015	0,004
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	0,004	0,004	0,004	0,008	n. s.	0,017
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	0,004	0,004	0,004	0,008	n. s.	n. s.
lebende Leukozyten / Kapsel s.c.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CD3+CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,004	0,016	0,004	0,008	n. s.	0,016
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	0,004	0,008	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	0,004	0,008	n. s.	n. s.
PS CD3-HIS48+CD4 ¹	0,017	0,032	0,004	0,008	0,01	0,016
CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	0,004	0,016	0,004	0,008	0,01	n. s.
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ²	n. s.	n. s.	0,009	0,008	0,01	n. s.
CD3-HIS48dimCD4 ¹	0,004	0,016	0,004	0,008	0,01	n. s.
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	n. s.	n. s.	0,004	0,008	0,01	0,016
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.	0,008	n. s.	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
lebende Leukozyten / Kapsel s.c.	n. s.	n. s.	0,004	0,004	n. s.	0,002
CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	0,009	0,004	n. s.	0,002
CD3+CD8a ¹	n. s.	0,009	n. s.	0,004	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,016	0,004	0,004	0,004	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	0,004	0,004	n. s.	0,01	n. s.
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	0,004	0,004	n. s.	n. s.
Mg CD3-HIS48+CD4 ¹	0,016	0,004	0,004	0,009	0,01	n. s.
CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	n. s.	0,004	0,004	0,004	0,01	n. s.
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ²	n. s.	0,004	0,004	0,004	0,01	n. s.
CD3-HIS48dimCD4 ¹	0,016	0,004	0,004	0,004	0,01	0,041
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,016	n. s.	0,004	0,004	0,01	0,002
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	0,004	n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	0,016	0,004	0,004	n. s.	0,01	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	0,004	n. s.	n. s.	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant (p > 0,05)

Tab. A15: Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der subkutanen Fremdkörperkapsel: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 20), Stichprobenumfang siehe Tab. 14

Vergleich der Materialien	PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg	
Tag 1	CD3+CD4 ⁺	n. s.	0,008	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	0,008	0,008
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	0,016	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺	n. s.	0,008	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻	n. s.	0,008	n. s.
Tag 3	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	0,041	0,019	0,01
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺	0,004	n. s.	0,019
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺	n. s.	0,01	0,01
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺	n. s.	0,01	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 7	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺	0,01	n. s.	0,01
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺	n. s.	n. s.	0,01
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 14	CD3+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺	n. s.	0,009	0,015
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺	0,015	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺	0,026	0,002	0,002
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻	n. s.	n. s.	0,009

Vergleich der Materialien		PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg
Tag 21	CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	0,017	0,009
	CD3-HIS48+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 28	CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	n. s.	0,004	0,009
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	0,016	n. s.	n. s.

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A16: Zeitpunktvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der intramuskulären Fremdkörperkapsel: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 21), Stichprobenumfang siehe Tab. 15

Vergleich der Zeitpunkte		Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 14	Tag 1 / 28	Tag 3 / 7	Tag 7 / 28
PEEK	lebende Leukozyten / Kapsel i.m.	n. s.	0,002	0,002	0,002	n. s.	n. s.
	CD3+CD4 ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	n. s.	n. s.
	CD3+CD8a ¹	0,009	0,002	0,002	0,002	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	0,002	0,002	n. s.	0,002
	CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	0,009	0,002	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ¹	0,004	n. s.	0,002	0,009	0,004	0,015
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
	CD3-HIS48+CD4+HIS36 ²	n. s.	0,004	0,002	0,002	n. s.	0,002
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	0,004	0,002	n. s.	0,002
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	0,002	0,002	0,002	n. s.	0,002
	PS	lebende Leukozyten / Kapsel i.m.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Vergleich der Zeitpunkte	Tag 1 / 3	Tag 1 / 7	Tag 1 / 14	Tag 1 / 28	Tag 3 / 7	Tag 7 / 28
CD3+CD4 ¹	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	n. s.
CD3+CD8a ¹	n. s.	0,002	0,004	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	0,004	0,002	n. s.	0,002
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	0,002	0,004	n. s.	0,002	0,002
CD3-HIS48+CD4 ¹	0,002	n. s.	0,004	0,002	0,002	0,002
CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	n. s.	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ²	n. s.	0,002	0,004	0,002	0,002	0,009
CD3-HIS48dimCD4 ¹	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,002	n. s.	0,004	0,002	0,002	0,002
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.	0,002	n. s.	0,002
CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	0,002	0,002	0,004	0,002	n. s.	0,015
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	0,002	0,004	0,002	0,015	n. s.
lebende Leukozyten / Kapsel i.m.	n. s.	0,009	0,002	0,002	0,009	n. s.
CD3+CD4 ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
CD3+CD8a ¹	0,009	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48+CD4dimSSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Mg CD3-HIS48+CD4 ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	n. s.	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002
CD3-HIS48+CD4+HIS36 ²	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48dimCD4 ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,004	n. s.	0,002	0,002	0,004	0,002
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.	0,009	0,004	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	0,004	0,002	0,004	0,002

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. A17: Materialgruppenvergleiche der durchflusszytometrischen Ergebnisse der intramuskulären Fremdkörperkapsel: p-Werte und Signifikanzen der Post-hoc-Tests (Mann-Whitney-U-Test) nach Bonferroni-Holm-Prozedur bei gegebener Signifikanz auf Faktorebene (Tab. 21), Stichprobenumfang siehe Tab. 15

Vergleich der Materialien	PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg	
Tag 1	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	
	CD3+CD8a ⁺¹	n. s.	n. s.	
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	n. s.	0,004
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	0,015
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²	n. s.	0,002	0,009
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹	n. s.	0,002	0,002
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺³	0,002	0,009	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺¹	0,015	0,002	0,009
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	0,002	0,002
	Tag 3	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.
CD3+CD8a ⁺¹		n. s.	n. s.	
CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹		n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹		n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48+CD4 ⁺¹		0,009	n. s.	0,004
CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²		n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹		n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺³		0,004	n. s.	0,004
CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺³		n. s.	0,008	0,004
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺¹		n. s.	n. s.	n. s.
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.	
Tag 7	CD3+CD4 ⁺¹	n. s.	n. s.	
	CD3+CD8a ⁺¹	n. s.	n. s.	
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	0,002	0,002
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ⁺¹	n. s.	0,002	0,002
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ⁺²	0,002	0,002	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ⁺¹	n. s.	0,004	0,002
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ⁺³	0,009	0,009	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ⁺³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁺¹	n. s.	n. s.	0,009
CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	0,002	n. s.	

Vergleich der Materialien	PEEK / PS	PEEK / Mg	PS / Mg	
Tag 14	CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	
	CD3+CD8a ¹	n. s.	n. s.	
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	0,015	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	0,009
Tag 21	CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	
	CD3+CD8a ¹	n. s.	n. s.	
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	n. s.	0,002
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	0,009	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	0,015	n. s.	0,002
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,009	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	n. s.	n. s.
Tag 28	CD3+CD4 ¹	n. s.	n. s.	
	CD3+CD8a ¹	n. s.	n. s.	
	CD3-HIS48+CD4-SSChigh ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4-SSClow ¹	0,009	n. s.	0,002
	CD3-HIS48+CD4 ¹	0,015	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48+CD4+CD8a ²	n. s.	n. s.	0,004
	CD3-HIS48dimCD4 ¹	n. s.	n. s.	n. s.
	CD3-HIS48dimCD4+CD8a ³	0,004	n. s.	0,002
	CD3-HIS48dimCD4+HIS36 ³	n. s.	0,009	0,004
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ¹	n. s.	0,015	0,004
	CD3-HIS48-CD4-CD8a ⁻¹	n. s.	0,002	0,004

¹ % an lebenden Leukozyten, ² % an CD3-HIS48+CD4+, ³ % an CD3-HIS48dimCD4+, PEEK = Polyetheretherketon, PS = Polystyrol, Mg = reines Magnesium, n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

11. Publikationsverzeichnis

Schmidt, T., Jungmann, M.-C., Krummsdorf, S., Schreiber, A., Kronbach, Z.; Klemann, C., Witte, F. (2018) „Flow cytometric assessment of systemic immune response to PEEK and magnesium implants in rats“, eingereicht bei *Acta Biomaterialia*, (im Peer-Review-Verfahren)

Schmidt T., Heinze, M.-C., Krummsdorf, S., Kronbach, Z., Kleemann, C., Witte, F. (2016) „Charakterisierung der Fremdkörperantwort auf permanente und magnesiumbasierte, biodegradable Implantate mittels Durchflusszytometrie“, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 25.–28.10.2016, Berlin, Meeting Abstract, DOI: 10.3205/16dkou499

Schmidt T., Heinze, M.-C., Krummsdorf, S., Kronbach, Z., Geiling, M. und Witte, F. (2016) „Flow cytometry: A new tool to analyze the foreign body response to biodegradable and permanent implants in rats“, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress 17.–22.05.2016, Montréal, Canada, DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.01650

Heinze, M.-C., Schmidt, T., Krummsdorf, S., Geiling, M., Kronbach, Z. und Witte, F. (2015) „FACS based analysis of the early inflammatory reaction to biodegradable and not biodegradable implanted materials in rats“, 7th Biodegradable Metals Conference 23.–28.08.2015, Carovigno, Italy, eCM Meeting Abstracts 2015, Collection 6:96

Heinze, M.-C., Schmidt, T., Kronbach, Z., Krummsdorf, S., Geiling, M. und Witte, F. (2015) „Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) as a tool to quantify the immune cell response to intramuscular implanted materials in rats“, Postervorstellung, JWI Retreat Berlin, 17.07.2015

12. Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von September 2014 bis Januar 2016 in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Witte für die Überlassung dieses sehr interessanten wissenschaftlichen Themas und die freundliche Betreuung in fachlicher und persönlicher Hinsicht.

Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold danke ich herzlichst für die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, das Vertrauen, ihren motivierenden Zuspruch und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Frau Dr. Tanja Schmidt für die gemeinsame Durchführung der Implantationen und die intensive Betreuung während der Tierversuche.

Meinen Mitpromovierenden Susann Krummsdorf, Marcel Geiling und Anzelika Schreiber danke ich für die perfekte Teamarbeit bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche sowie bei der Betreuung der Versuchstiere.

Auch danke ich Zienab Kronbach und Claudia Beutler für die stetige Hilfsbereitschaft im Labor und die Unterstützung bei den RTQ-PCR Untersuchungen.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der FACS-Core-Unit des BCRT für die Einführung und Hilfestellungen bei der Arbeit mit dem Durchflusszytometer und die Durchführung der Zellsortierungen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie für die großartige Unterstützung in allen Bereichen vor allem bei der Kinderbetreuung während des Schreibens der Arbeit.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Michel Jungmann, der mich während der gesamten Zeit seelisch, moralisch und fachlich hervorragend unterstützt hat.

Und ein ganz spezieller Dank gilt meiner Tochter Johanna, die ihrer Mama zum Glück nur wenige schlaflose Nächte bereitete.

13. Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 05.04.2019

Marie-Christin Jungmann