Aus dem Institut der Biochemie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Einfluss der Korrosion

von

biodegradablen Metallen

auf die Fremdkörperantwort

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susann Krummsdorf

Tierärztin

aus

Rostock

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4029

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Frank Witte
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Robert Klopfleisch

Deskriptoren: rats, animal models, magnesium, foreign bodies, implantation, alloys, immune response, T lymphocytes, macrophages, granulocytes, leukocytes

Tag der Promotion: 19.02.2018

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

© 2018 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-417-3 1. Auflage 2018

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
2. Literaturteil	
2.1 Die Fremdkörperreak	tion3
2.1.1 Besonderheiten o	der Fremdkörperantwort bei der Ratte5
2.1.2 Einfluss der Obe	flächenbeschaffenheit von Biomaterialien auf die FBR6
2.1.2.1 Einfluss von	Oberflächeneigenschaften auf Makrophagen6
2.2 Physiologie zellulärer	Eigenschaften der Ratte und deren Einfluss auf die FBR7
2.2.1 Merkmale der Ly	mphozyten7
2.2.2 Merkmale der Ma	akrophagen8
2.2.3 Merkmale der Mo	onozyten10
2.2.4 Merkmale der Gr	anulozyten11
2.2.5 Merkmale der Ma	astzellen12
2.2.6 Merkmale der Na	türlichen Killerzellen12
2.2.7 Merkmale der De	ndritischen Zellen12
2.3 Eigenschaften der Im	plantationsmaterialien13
2.3.1 Magnesium als B	iomaterial13

		2.3.1.	.1 Biokompatibilität	14
		2.3.1.2	.2 Zytotoxizität	15
	2.	3.2	Gadolinium	16
		2.3.2.	.1 Biokompatibilität	16
		2.3.2.2	.2 Zytotoxizität	17
	2.4	Die Du	urchflusszytometrie	17
3	М	aterial	l	20
	3.1	Lab	borgeräte	20
	3.2	Ver	rbrauchsmaterialien	20
	3.3	Rea	agenzien	20
	3.4	Anti	tikörper	20
	3.5	lsot	typen	21
	3.6	Her	rgestellte Lösungen	22
	3.7	Soft	ftware und Datenbanken	23
4	М	ethode	len	24
	4.1	Etal	ablierung	24
	4.	1.1	Titration der Antikörper	24
	4.	1.2	Kompensation	24
	4.	1.3	FMO (Fluoreszenz Minus One)	25
	4.	1.4	Isotypkontrollen	27
	4.2	Ver	rsuchsdurchführung	28

	4.2.1	Auswahl und Bezug der Tiere
1	4.2.2	Einteilung der Gruppen
	4.2.3	Beschaffenheit der Implantate
	4.2.4	Operationsmethodik
	4.2.5	Finalisierung
4.:	3 Pro	benaufarbeitung
	4.3.1	Aufarbeitung von Vollblut
	4.3.1.	1 Herstellung der FACS-Färbung
	4.3.1.	2 Gatingstrategie der Blutproben
	4.3.2	Aufarbeitung der Kapsel31
	4.3.2.	1 Gatingstrategie der Kapselproben
	4.3.2.	2 Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse
1	4.3.3	Zellsortierung und Zytozentrifugation zur Identifikation der Zellpopulationen33
1	4.3.4	Ablösen der Korrosionsprodukte zur Bestimmung der Korrosionsrate
	4.3.5	In vitro Studien zur Bestimmung der Korrosionsrate im Bioreaktor
,	4.3.6	Rauigkeitsmessungen der Implantate durch mechanische Profilometrie38
1	4.3.7	Oberflächenanalyse mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)
,	4.3.8	quantitative Real-Time PCR
	4.3.8.	1 Isolierung der RNA
	4.3.8.2	2 Reverse Transkription
	4.3.8.3	3 RT - PCR

		4.3.8.4	4 Relative Quantifizierung	37
	4.3	3.9	Statistische Auswertung	38
	4.4	Die	Arbeit anderer Doktoranden an der Forschungsreihe	39
5	Erge	bnisse	9	40
	5.1	Erge	ebnisse der Durchflusszytometrie	40
	5.1	1.1	Blut-Leukozyten	40
	5.′	1.2	Kapsel-Leukozyten	45
		5.1.2.	1 Kapsel subkutan	45
		5.1.2.2	2 Kapsel intramuskulär	52
	5.2	Zell	Isortierung & Zytospin	57
	5.3	Bes	stimmung der Korrosionsrate	61
	5.3	3.1	Bestimmung der Korrosionsrate in vivo	61
	5.3	3.2	Bestimmung der Korrosionsrate in vitro	61
	6.2	2.3	Vergleichbarkeit der In-Vivo- und In-Vitro-Korrosionsdaten	62
	6.3	Erge	ebnisse der Profilometrie	63
	6.4	Ras	sterelektronenmikroskopische Ergebnisse	64
	6.4	4.1	Vor der Implantation	64
		6.4.1.	1 MgGd10	64
		6.4.1.2	2 MgGd5	64
		6.4.1.3	3 MgFe	65
	6.4	4.2	Nach der Implantation	65

	6	6.4.2.1	MgGd10	65
	6	6.4.2.2	MgGd5	66
	6	6.4.2.3	MgFe	67
6	.5	Quantita	tive RT-PCR	69
7	Dis	kussion		70
7	.1	Akzepta	nz und Integration des Implantates während der FBR	70
7	.2	Das Par	adigma von M1- und M2- Makrophagen	71
7	.3	Mikrosko	opische Eigenschaften der Makrophagensubpopulationen	73
7	.4	Einfluss	der T-Zellen auf die FBR	73
7	.5	Die Duro	chflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung der FBR	74
7	.6	Die Perf	usionsrate als maßgebliche Beeinflussung der FBR	74
7	.7	Ausschl	uss einer bakteriellen Kontamination in Kapselproben	75
7 K	.8 Iorro	Diskussi sionsgeso	on des Einflusses von Oberflächeneigenschaften chwindigkeit der eingesetzten Materialien auf die FBR	und der 75
7	.9	Abschlie	ßende Betrachtung	76
8	Zus	sammenfa	assung	78
9	Su	mmary		79
10	L	.iteraturve	rzeichnis	80
11	A	Anhang		92
12	F	Publikatior	ien	106
13	٢	Danksagu	ng	107
14	S	Selbststän	digkeitserklärung	108

Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of Differentiation
FBGCs	Fremdkörperriesenzellen
FBR	Fremdkörperreaktion (foreign body reaction)
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
G	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie- stimulierender Faktor
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IM	intramuskulär
Кд	Kilogramm
KG	Körpergewicht

L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
M1	M1-Makrophagen
M2	M2-Makrophagen
Mg	Milligramm
MgFe	eisenverunreinigtes Magnesium
MgGd15	Magnesium-Gadolinium 15%
MgGd10	Magnesium-Gadolinium 10%
MgGd5	Magnesium-Gadolinium 5%
MI	Milliliter
mM	Millimolar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SC	subkutan
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
TNF-α	Tumornekrosefaktor
U	Enzymeinheit (Unit)
Σ	Standardabweichung
μΜ	Mikromol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1:	Schematische	Darstellung	der	Entstehung	des	Vorwärts-	und
Seitwärtsstre	eulich	ntes (FSC, SSC).	-					18

Abbildung 2: Gating des betreffenden Bereiches im Scatter (links), Titrationskurven für die Konzentration des Antikörpers CD3 PE von 1:50, 1:100 und 1:200......24

Abbildung 3: Darstellung der Dotplots von *fullstains* der Kapsel (links) im Vergleich zu den FMO – Kontrollen der Antikörper CD3 PE (oben) und CD4 PerCP eFluor 710 (unten)......27

Abbildung 4: Gatingbereich der Zielpopulation (links) und Histogramm der Isotypkontrolle (IC, rot) im Vergleich zur Einzelfärbung (SS, blau) des Antikörpers CD45 eFluor 450 (rechts)....28

Abbildung 5: Gatingstrategie der Blutproben
Abbildung 6: Gatingstrategie der Kapselproben für T-Zellen
Abbildung 7: Gatingstrategie der Kapselproben für Nicht-T-Zellen
Abbildung 8: Aufbau des Bioreaktorsystems
Abbildung 9: Boxplot der lebenden Leukozyten in <i>Counts</i> /Kapsel x 10 ⁶ und der CD3+ Population41
Abbildung 10: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population42
Abbildung 11: Boxplot der CD4+CD8+ und CD3- Population42
Abbildung 12: Boxplot der CD11bc+HIS48- und CD11bc-HIS48- Population43
Abbildung 13: Boxplot der CD11bc+HIS48low und CD11bc+HIS48medCD4-CD8- Population
Abbildung 14: Boxplot der CD11bc+HIS48hi Population44
Abbildung 15: Verlaufsdiagramm der Mittelwerte des Anteils der Neutrophilen Granulozyten, CD3+ Zellen, M1- und M2-Makrophagen an lebenden Leukozyten (LL) aller Materialien über die Zeit in der Kapsel SC
Abbildung 16: Boxplot der lebenden Leukozyten in <i>Counts</i> /Kapsel x 10 ⁶ und CD3+ Population SC47
Abbildung 17: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population SC48

Abbildung 18: Boxplot der CD3- und Monozyten SC
Abbildung 19: Boxplot der Neutrophilen- und Eosinophilen Granulozyten SC50
Abbildung 20: Boxplot der M1- und M2-Makrophagen SC51
Abbildung 21: Boxplot der CD68-CD163+ Population SC51
Abbildung 22: Verlaufsdiagramm der Mittelwerte des Anteils der Neutrophilen Granulozyten, CD3+ Zellen, M1- und M2-Makrophagen an lebenden Leukozyten (LL) aller Materialien über die Zeit in der Kapsel IM
Abbildung 23: Boxplot der lebenden Leukozyten in <i>Counts</i> /Kapsel x 10 ⁶ und der CD3+ Population IM
Abbildung 24: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population IM
Abbildung 25: Boxplot der CD3- Population und der Monozyten IM54
Abbildung 26: Boxplot der Neutrophilen- und Eosinophilen Granulozyten IM55
Abbildung 27: Boxplot der M1- und M2-Makrophagen IM56
Abbildung 28: Boxplot der CD68-CD163+ Population IM56
Abbildung 29: Darstellung der mikroskopischen Bilder von T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten im FSC/SSC Gate60
Abbildung 30: Darstellung der mikroskopischen Bilder der Eosinophilen Granulozyten, CD68- CD163+ Makrophagen, M1- und M2-Makrophagen im FSC/SSC Gate
Abbildung 31: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der Korrosionsraten <i>in vivo</i> 61
Abbildung 32: Ergebnisse der Korrosionsraten mit Standardabweichung in vitro62
Abbildung 33 : REM - MgGd10 vor der Implantation64
Abbildung 34: REM - MgGd5 vor der Implantation65
Abbildung 35: REM - MgFe vor der Implantation65
Abbildung 36: REM – MgGd10 nach der Implantation66

bbildung 37: REM - MgGd5 nach de	r Implantation	67
----------------------------------	----------------	----

Abbildung 39: Vergleich der Mittelwerte der relativen Expression bakterieller mRNA69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Isotypen	21
Tabelle 3: Liste der hergestellten Lösungen	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Softwareprogramme	23
Tabelle 5: Übersicht der Zusammensetzung der Fluoreszenz Minus One Mehrfachfärbun für das Kapselpanel	igen 25
Tabelle 6: Programmbeschreibung Light Cycler 480	37
Tabelle 7: Darstellung der verwendeten Primersequenzen	38
Tabelle 8: Makroskopische Merkmale der Zellen innerhalb der Gates	58
Tabelle 9: Darstellung der Korrosionsdaten in vivo und in vitro im Vergleich	63
Tabelle 10: Darstellung der Mittenrauigkeit (R_a) und der Standardabweichungen vor und n der Implantation der Materialien	iach 63
Tabelle 11: Liste der verwendeten Laborgeräte	92
Tabelle 12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	94
Tabelle 13: Liste der verwendeten Reagenzien	98

1. Einleitung

Die intrakorporale Implantation eines Biomaterials bewirkt die Einleitung einer Entzündungsreaktion [1]. Die Fremdkörperreaktion (FBR) ist die Endphase der Entzündungsund Wundheilungsvorgänge [2] und wird charakterisiert durch die Präsenz von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen auf der Oberfläche eines Implantates [3].

Biodegradierbare Metalle haben die Denkweise über Biomaterialien nachhaltig verändert. Der steigende Bedarf für den chirurgisch-orthopädischen Einsatz bedingt die Aufmerksamkeit in der Forschung hinsichtlich der Sicherheit der eingesetzten Materialien. Im Tiermodell werden die mechanische Stabilität, Biokompatibilität und die Resorbierbarkeit der Werkstoffe überprüft. Für die medizinische Anwendung ist der Goldstandard nicht resorbierbarer Materialien Titan und rostfreier Stahl. Nachteil dieser nicht resorbierbaren Werkstoffe ist die Notwendigkeit eines zweiten Eingriffes zur operativen Entfernung des Implantates, was die Gefahren des Narkoserisikos, einer postoperativen Infektion und einer zusätzlichen Belastung des Patienten mit sich bringt. Des Weiteren besteht aufgrund der höheren Steifigkeit von Titan im Vergleich zum Knochen die Gefahr einer Heilungsverzögerung durch eine Belastungsabschirmung [4].

Magnesium besitzt vielversprechende Eigenschaften als Biomaterial: es weist eine hohe Festigkeit und Elastizität auf, verfügt über eine dem Knochen ähnliche Steifigkeit sowie über eine gute Biokompatibilität [5]. Magnesium ist in mannigfaltige physiologische Prozesse des Körpers eingebunden. Als reines Element bietet es jedoch nicht den optimalen Korrosionsschutz während der Knochenheilung [6]. Magnesiumlegierungen mit Selten-Erdelementen (RE) ermöglichen die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Materials sowie die Reduktion der Korrosionsgeschwindigkeit für einen optimalen medizinischen Gebrauch Zahlreiche Autoren haben Magnesium [7]. und Magnesiumlegierungen auf ihre Verwendbarkeit als Biomaterial geprüft [8]. Die Vorteile bestehen hierbei in der Unterstützung der Gewebsregeneration und -heilung durch die Materialdegradation bei gleichzeitigen Implantatersatzvorgängen durch das umgebende Gewebe.

Williams [9] definierte den Begriff der Biokompatibilität als "...die Fähigkeit eines Biomaterials die vorgesehene Funktion mit der erwünschten Integration in dem Organismus auszuführen, ohne in Diesem unerwünschte lokale oder systemische Effekte auszulösen." Demnach sollte ein Werkstoff idealerweise in einem biologischen System mit einer gewünschten Degradationsrate degradieren, nicht toxisch sein und keine gegenteiligen Effekte auf Makromoleküle und zelluläre Komponenten entwickeln [6]. Alle Materialien, die in lebendes Gewebe implantiert werden, bewirken eine Antwort des Organismus, welche die ersten Schritte der Gewebsreparatur reflektieren. Modernes Design von Biomaterialien ist ausgerichtet auf die Nutzung der Immunantwort für die Verbesserung der Integration des Implantates und auf die Verhinderung einer chronischen Entzündungsreaktion mit möglichem Funktionsausfall [10]. Die zelluläre Antwort auf die Implantation eines Fremdkörpers unterliegt komplexen Vorgängen. Die zeitlichen Abläufe einer FBR auf Biomaterialien wurden bereits 1988 von Anderson beschrieben. Demnach gliedert sich die FBR in die Gewebsschädigung, in die akute und chronische Entzündung, gefolgt von der Bildung von Granulationsgewebe und der eigentlichen Fremdkörperreaktion, welche zellulär geprägt ist von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen. Die letzte Phase umfasst die fibröse Kapselbildung [11].

Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Studie die Darstellung der Fremdkörperreaktion auf drei verschiedene Materialien (MgGd10, MgGd5, MgFe) im Rattenmodell mittels eines eigens

entwickeltem Panel der Durchflusszytometrie. Hauptaugenmerk ist die quantitative Beschreibung der beteiligten Zellpopulationen: T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen in Abhängigkeit von der Zeit. Des Weiteren werden Fragestellungen zu vergleichenden Beobachtungen zum Degradationsverhalten der verschiedenen Legierungen und mögliche Verknüpfungen über Auswirkungen auf den Organismus diskutiert. Der zelluläre Hintergrund und die Grundlagen der FBR werden im nachfolgenden Literaturteil dargelegt. Magnesiumlegierungen sind bekannt für deren exzellente mechanische Eigenschaften und für eine gute Akzeptanz der Korrosionsprodukte, die über physiologische Puffersysteme den metabolischen Prozessen zugeführt werden können. Tiefergehende Kenntnisse über die zeitlichen, zellulären Mechanismen und potentielle Rückschlüsse auf funktionelle, regulatorische Zusammenhänge ermöglichen besseres Verständnis ein der Fremdkörperreaktion.

Hierzu wurden folgende Fragen in der vorliegenden Arbeit adressiert:

1. Gibt es eine über das Blut nachweisbare systemische Veränderung durch die Fremdkörperreaktion nach Implantation von Magnesiummaterialien?

2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Korrosionsrate und dem Auftreten von Leukozyten und besteht hier eine Abhängigkeit vom Implantationsort?

3. Gibt es einen charakteristischen Verlauf der Fremdkörperreaktion auf Magnesiumimplantate und kann man Unterschiede zwischen den Implantationsorten subkutan und intramuskulär beobachten?

2. Literaturteil

2.1 Die Fremdkörperreaktion

Die biologische Antwort auf implantierte Biomaterialien besteht aus einer komplexen Serie von Ereignissen, welche eine Vielzahl von biochemischen Vorgängen umfassen [12]. Durch die chirurgische Prozedur der Einbringung eines Medizinproduktes wird das umliegende Gewebe oder Organ in seiner Homöostase gestört und eine zelluläre Kaskade der Wundheilung eingeleitet. Die Antwort auf die Gewebsverletzung ist von multiplen Faktoren abhängig: Ausmaß der Verletzung, Verlust fundamentaler Membranstrukturen, Blut-Material-Interaktion, Bildung einer provisorischen Matrix, Ausmaß der zellulären Nekrose und Stärke der entzündlichen Antwort [13].

Die initiale entzündliche Antwort des Körpers, ausgelöst durch die Gewebsverletzung, ist geprägt von der Blut-Material-Interaktion. Die Bildung eines Thrombus führt zur Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Koagulationssystems, Komplement, fibrinolytischem System, Kinin-generierenden System und der Blutplättchen [2]. Die Gewebsverletzung bedingt Veränderungen im Blutfluss und der Permeabilität von Blutgefäßen für Zellen und Makromoleküle [1]. Flüssigkeiten, Proteine und Blutzellen treten aus dem Blutgefäßsystem aus. Dieser Vorgang wird als Exsudation bezeichnet [13]. In der initialen Phase der FBR wird die Oberfläche des Biomaterials mit körpereigenen Proteinen (Albumin, Fibrinogen, Fibronektin, Komplement, Vitronektin, y-Globulin) beschichtet. Typ, Konzentration und der Proteine an die Implantatoberfläche sind abhängig von der Anpassung Oberflächenbeschaffenheit, bestimmen die Adhäsionseigenschaften und die Gewebsreaktion [14]. Die Proteinkaskade infolge der Proteinadsorption und -desorption scheint einem dynamischen Phänomen zu folgen, welches als Vroman Effekt bekannt ist. Zunächst lagern sich kleine Proteine aufgrund des schnellen Transportes zur Materialoberfläche an, diese werden folglich von größeren Proteinen mit höherer Affinität ersetzt [15]. Die komplexe Struktur der provisorischen Matrix bietet das Substrat für die Adhäsion und Migration von Zellen. Mitogene, Chemoattraktoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren werden ausgehend von der provisorischen Matrix sezemiert um den nachfolgenden Wundheilungsprozess zu steuern [13]. Die FBR umfasst Material-abhängige und Material-unabhängige Vorgänge. Materialunabhängig sind die Aggregation von Thrombozyten, die Aktivierung des umliegenden Gewebes und die Freigabe von Zytokinen. Fibrinogen wird durch Thrombin zu Fibrin hydrolisiert. Material-abhängige Vorgänge betreffen die Aktivierung des Komplementsystems über die Bindung von Antikörpern am Biomaterial und der Bildung von Fibrinogen. Fibrinogen fördert die Leukozytenadhäsion und fungiert als vorübergehende Matrix für die Leukozytenextravasation [1]. Mastzellen vermitteln die akute Entzündungsreaktion durch die Freisetzung von Histamin, pro-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-13) und Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wodurch phagozytotische Zellen durch die endotheliale Barriere migrieren können. Die Phase der akuten Entzündung wird dominiert von Neutrophilen-, Eosinophilen- (weniger als 10 %) und Basophilen Granulozyten (1%), die durch chemotaktische Faktoren innerhalb von Minuten bis Tagen nach der Gewebsverletzung aus den Blutgefäßen einwandern [16]. Neutrophile Granulozyten werden durch von Thrombozyten und endothelialen Zellen freigegebenen Chemoattraktoren zur Implantatoberfläche geleitet [10]. Die Dauer der akuten Entzündungsphase ist abhängig vom Grad der Gewebsverletzung und übersteigt in der Regel die Länge einer Woche nicht. Hauptrolle der Neutrophilen Granulozyten in der frühen Phase der FBR ist die Phagozytose von Mikroorganismen und körperfremden Materialien [3]. Neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebensdauer (Stunden bis Tage) und entschwinden dem Exsudat schneller als Makrophagen. In Studien konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der höchsten Konzentration der Granulozyten auch Monozyten und Makrophagen in hoher Zahl vorhanden sind [11].

Das Scheitern der Phagozytose durch Neutrophile Granulozyten leitet die chronische Entzündung durch Extravasation und Migration von Monozyten und Makrophagen ein. Die Interaktion und Bindung der Monozyten und Makrophagen erfolgt über die Blut-Proteinmodifizierte Materialoberfläche. Die Anheftuna der Zellen findet über die Oberflächenrezeptoren der verschiedenen Plasma- und extrazellulären Matrixproteine statt. Die chronische Entzündungsphase ist weniger einheitlich als die akute Phase und wird neben Monozyten und Makrophagen geprägt von Lymphozyten und Plasmazellen. Fibroblasten und endotheliale Zellen werden durch Makrophagen aktiviert und proliferieren um Bindegewebe zu bilden [17]. Makrophagen wurden als Hauptmediator einer Implantat-assoziierten FBR identifiziert [15] und repräsentieren die treibende Kraft der Aufrechterhaltung der Immunantwort [10]. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle für die Wundheilung und Gewebsregeneration. Neben der phagozytotischen Aktivität und der Freigabe von Enzymen für die Gewebsreorganisation steht die Differenzierung zu Makrophagen mit unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen im Vordergrund [2]. Man unterscheidet funktionell zwei verschiedene Subpopulationen: die klassisch aktivierten pro-inflammatorischen M1-Makrophagen sowie die alternativ aktivierten anti-inflammatorischen M2-Makrophagen [18]. Die Rekrutierung weiterer Makrophagen erfolgt über die Sekretion von PDGF, TNF-a, IL-6, G-CSF und GM-CSF [19]. Das Verhalten anderer Leukozyten (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) wie auch Zellen der Wundheilung (Fibroblasten, Keratinozyten) kann durch von Makrophagen sezernierte lösliche Mediatoren beeinflusst werden [2].

Im weiteren Verlauf der chronischen Entzündungsreaktion fusionieren die an das Biomaterial gebundenen Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen (FBGCs). An Biomaterialien gebundene FBGCs können 3-100 Zellkerne besitzen und bis zu einer Größe von einem Millimeter Durchmesser heranwachsen. Der Vorgang der Makrophagenfusion zu Fremdkörperriesenzellen ist abhängig von fusions-stimulierenden Faktoren und von den an der Materialoberfläche gebundenen Proteinen [20]. In vitro und in vivo konnte die induktive Eigenschaft von IL-4 und IL-13 auf die Makrophagenfusion identifiziert werden. Die Formation von FBGCs ist assoziiert mit einem phänotypischen Wechsel vom klassischen zum alternativen Aktivierungsstadium [10]. FBGCs verbleiben an der Oberfläche des Biomaterials für die Lebenszeit des Implantates [13]. Im Verlauf der FBR nimmt die Anzahl der zu FBGCs fusionierenden Makrophagen zu, während die allgemeine Zellzahl um das Implantat abnimmt. Ummantelung des Implantates mit großen, vielkernigen FBGCs Die ist ein Schutzmechanismus um den Fremdkörper vom Organismus zu isolieren [15]. Im Vergleich zu Makrophagen besitzen FBGCs ein schlechteres Vermögen zur Phagozytose, exprimieren jedoch eine höhere Kapazität für Lysosomen und der Aktivität von respiratorischen Enzymen. FBGCs sekretieren Chemokine und Zytokine um weitere Entzündungszellen oder Zellen der Wundheilung zu aktivieren [15].

Durch den Vorgang der Phagozytose der Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen entsteht ein spezifisches Milieu zwischen der Zellmembran und der Materialoberfläche. Durch die Freigabe von freien Radikalen, proteolytischen Enzymen und Sauerstoffradikalen wird eine hohe Anforderung an das Biomaterial gestellt. Die Adhäsion von Makrophagen und FBGCs führt zu einer reduzierten antibakteriellen Kapazität der anhaftenden Zellen [2]. Die FBR kann durch die Oberflächeneigenschaften, Form und die Relation von der Oberfläche zum Volumen eines Biomaterials kontrolliert werden [11]. Die Progression der Fremdkörperreaktion wird durch lösliche Mediatoren wie zum Beispiel Zytokine, Chemokine und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) reguliert, welche von Gewebszellen und den infiltrativen Immunzellen produziert werden [1].

Das ideale Ergebnis nach der Implantation eines Biomaterials ist die Wiederherstellung der normalen Gewebsarchitektur und –funktion durch die Wundheilung [17]. Die Endphase der Wundheilung stellt die **Fibrose** und **fibröse Kapselbildung** dar. Innerhalb eines Tages nach

Implantation beginnen Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen zu proliferieren und Granulationsgewebe zu bilden [16]. Histologisch erfolgt eine Neovaskularisation durch die Proliferation kleiner neuer Blutgefäße. Endotheliale Zellen proliferieren ausgehend von existierenden Blutgefäßen und synthetisieren Kollagen und Proteoglykane. In der frühen Phase der Granulationsgewebsbildung sind Proteoglykane vorherrschend, später ist es Kollagen Typ I und formt die fibröse Kapsel [13]. Unter dem Einfluss von TGF- β und PDGF, welche von Makrophagen sezerniert werden, differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese übernehmen die Funktion der Wundkontraktion und fungieren als aktive Produzenten von fibrotischem Gewebe [15]. Die fibröse Ummantelung des Implantats im Zuge der Granulationsgewebsbildung dient der Isolation des Implantates und der Fremdkörperreaktion von der lokalen Gewebsumgebung. Die Intensität der Fibrosierung und die Menge an Granulationsgewebe korreliert mit der Regenerationsfähigkeit des Gewebes sowie mit den Eigenschaften der Implantatoberfläche [13].

2.1.1 Besonderheiten der Fremdkörperantwort bei der Ratte

Ratten wurden bereits in den frühen Jahren des 19. Jahrhunderts als Modell für die menschliche Physiologie und Erkrankungen etabliert. Als Modell weist die Ratte einige Vorteile gegenüber der Maus und anderer Organismen auf. In einigen Bereichen stimmt die Physiologie der Ratte mit der des Menschen überein [21]. Um Forschungsergebnisse eines Modellorganismus auf die Humanmedizin zu übertragen, ist es nötig die Gene und mögliche krankheitsassoziierte Mutationen zu korrelieren [22]. Das Genom von Nagetieren weist eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der Anzahl, Ordnung und Sequenz zum Genom des Menschen auf. Ungefähr 90 % des Erbguts der Ratte stimmen mit dem des Menschen überein [22]. Des Weiteren eignen sich Ratten aufgrund der einfachen Haltung und Vermehrung hervorragend als Versuchstiere. Laut einer Statistik des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft aus dem Jahre 2015 wurden Ratten mit einem Prozentsatz von 11,65 % am zweithäufigsten für Tierversuche verwendet.

Fragestellungen zu Besonderheiten der zellulären Antwort auf einen Fremdkörper in der Ratte im Vergleich zur Maus sowie Unterschiede innerhalb von Rattenstämmen wurden bereits in Arbeitsgruppen thematisiert. Khouw, et al. [23] untersuchten in einer Studie den zellulären Unterschied im Ablauf der FBR zwischen verschiedenen Rattenstämmen (AO, BN, F344, LEW, PVG) und stellten den direkten Vergleich zur Maus an. Es wurde ein scheibenförmiges Biomaterial aus Hexamethylenediisocyanat, guervernetzt mit Hautkollagenen vom Schaf, mit einem Durchmesser von 8 mm, subkutan am Rücken für 7,14,21 und 28 Tage implantiert. Das umliegende Gewebe wurde lichtmikroskopisch (Immunfluoreszenz) sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Bildung von FBGCs und der Grad der Phagozytose vergleichbar bei allen Rattenstämmen (Strains) waren. Es gab Unterschiede hinsichtlich der Plasmazellformation um den Fremdkörper. T-Zellen bildeten sich ausgeprägter bei den F344 und LEW Strains, wobei bei den AO und PVG Ratten nur wenige T-Zellen zu beobachten waren. BN Ratten zeigten eine mittlere Präsenz der T-Zellen im Vergleich zu den anderen Strains. Die Mäuse zeigten eine limitierte Bildung von FBGCs, weniger Phagozytose und eine stärkere Fibroblastenformation im Vergleich zur Ratte. Bei Mäusen zeigte sich eine häufigere Kalzifizierung, die bei Ratten kaum beobachtet werden konnte. Luttikhuizen, et al. [24] untersuchte die zelluläre FBR vergleichend bei der Ratte und der Maus und ermittelten den Zytokin- und Chemokingehalt des umliegenden Gewebes. Der Ablauf der FBR wurde durch die Quantifizierung von PMN, Makrophagen, FBGCs und Blutgefäßen ermittelt. Bei der Ratte wurde eine signifikante Anzahl von PMN an Tag 1 und 2 festgestellt, die an den folgenden Standzeiten (5,10 und 21 Tage) schnell abfielen. Makophagen waren bis Tag 21 in hoher Zahl nachweisbar. Es konnte eine höhere Expression von IFN-y bei der Ratte im Vergleich zur Maus festgestellt werden, was mit einer gesteigerten Aktivierung von Makrophagen in Verbindung gebracht werden konnte. Es konnte bestätigt werden, dass das Fortschreiten der FBR bei der Maus in einer deutlich langsameren Geschwindigkeit abläuft [24].

2.1.2 Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit von Biomaterialien auf die FBR

Die Oberflächeneigenschaften eines Biomaterials spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der FBR [2]. Bereits im Jahr 1981 beobachteten Rich und Harris das Vermögen von Makrophagen vorwiegend auf rauen Oberflächen zu akkumulieren und zu hydrophoben Substraten zu migrieren. Dieses Phänomen wurde als "Rugophilia" bezeichnet [25]. In der akuten Phase besteht für die geometrische Beschaffenheit des Implantates ein hoher Einfluss auf die FBR. Die Geometrie eines Implantates wird durch die Makrostruktur, Oberflächentopografie und von den Eigenschaften der inneren Strukturen, wie zum Beispiel der Porosität und Porengröße charakterisiert [15]. Boss, et al. [26] kamen zu dem Ergebnis, dass die Biokompatibilität eines Implantates vermehrt durch die physikalischen Eigenschaften und die damit verbundene Beeinträchtigung des umliegenden Gewebes beeinflusst wird und weniger von der chemischen Zusammensetzung des Implantates. Eine Studie von Matlaga, et al. [27] verdeutlicht den Einfluss der Form eines Implantates auf die Antwort des Organismus. Hier konnte gezeigt werden, dass das höchste Ausmaß an Entzündungszellen und zellulärer Enzymaktivität bei dreieckigen Implantaten, gegenüber runden und fünfeckigen Implantaten, nachgewiesen werden konnte.

Die Oberflächentopografie hat Einfluss auf das Verhalten von Zellen hinsichtlich der Adhäsion. Morphologie, Migration, Orientierung und Differenzierung [28]. Eine zunehmende Rauigkeit von Implantaten resultiert in der Vergrößerung der Kontaktoberfläche und der verbesserten Möglichkeit der Absorption von Fibrinogen und Adhäsion von Thrombozyten. Thrombozyten sind über die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten an der Progression und Aktivierung der FBR beteiligt. Raue Oberflächen erhöhen über die Aktivierung von Thrombozyten die Dichte von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Dadurch gelangen Entzündungszellen und osteogene Zellen an die Fibrinmatrix und beeinflussen die Osteoinduktivität und Osteointegrität [15]. Wennerberg, et al. [29] und Madden, et al. [30] konnten in vivo ebenfalls eine schnellere Osteointegration und Angiogenese an rauen Oberflächen sowie eine reduzierte fibröse Kapselbildung an glatten Oberflächen zeigen. Zheng [31] erläuterte im Gegensatz dazu die möglichen negativen Eigenschaften von rauen Oberflächen: eine forcierte Entzündung bewirkt verschlechterte mechanische Eigenschaften und eine herabgesetzte Korrosionsresistenz. Eine glattere Oberfläche bewirkt dahingegen eine bessere Hämokompatibilität und eine verringerte Störung des Blutflusses. Diese Zusammenhänge verdeutlichen das Bestreben die Oberflächenrauigkeit innerhalb eines bestimmten Bereiches zu kontrollieren. Wennerberg [32] berichtet von einer optimalen Oberflächenstruktur von Implantaten bei einem Mittenrauwert (Ra) von 1 µm und einer gemittelten Rautiefe (Rz) von 11 µm. Die stärkste biomechanische Bindung kann bei einer Oberflächenrauigkeit (Ra) von etwa 1,5 µm erreicht werden [33]. Albrektsson, et al. [34] beschreiben eine verstärkte Antwort des Knochens innerhalb einer moderaten Oberflächenrauigkeit zwischen 1,0 und 2,0 µm mittlerer arithmetischer Höhe (Sa).

2.1.2.1 Einfluss von Oberflächeneigenschaften auf Makrophagen

Bereits in den frühen 1980er Jahren untersuchten Anderson, et al. [2] die Zytokinproduktion von adhärenten humanen Makrophagen auf biomedizinischen Polymeren als ein Indikator für die Aktivierung von Makrophagen und den Zusammenhang der Oberflächenchemie der Biomaterialien. Weitere *in vitro* Studien konnten zeigen, dass Makrophagen moduliert werden durch Oberflächeneigenschaften, wie die Materialoberflächenchemie und Oberflächentopografie (Yun, et al. [35], Xing, et al. [36], Sethi, et al. [37], Marques, et al. [38],

Refai, et al. [39]). Die Abhängigkeit der Zytokinexpression von der Oberflächenchemie eines Biomaterials konnte von Brodbeck, et al. [40] auch *in vivo* nachgewiesen werden.

In einer Studie von Barth, et al. [41] wurde die Genexpression und Sekretion von Zytokinen von RAW 264.7 Makrophagen untersucht, die auf Oberflächen unterschiedlicher Rauigkeit kultiviert wurden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass auf rauen Oberflächen vorwiegend Makrophagen vom M2-Phänotyp nachweisbar waren. Zudem konnte die vermehrte Sekretion der Makrophagen-Chemoattraktoren MIP-1a und MCP-1 nachgewiesen werden, während eine verringerte Sekretion der typischen M1-Chemokine beobachtet wurde. Somit besteht die Vermutung, dass eine höhere Sekretion von MIP-1a und MCP-1 involviert ist in der Phänomenentwicklung der "Rugophilia". Moon, et al. [42] konnten ebenfalls in vitro die Polarisierung von Makrophagen durch die Oberflächenrauigkeit zu einem M2-Phänotyp zeigen. In dieser Studie wurden die Effekte von rauen und glatten Oberflächen auf die Morphologie, Genexpression, Makrophagenfusion, Zyto- und Chemokinsekretion von RAW264.7 Makrophagen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine raue Oberfläche Veränderungen in der Zellform, der sekretierten Chemokine und löslichen Mediatoren hervorruft, die für die Makrophagenfusion zuständig sind. McWhorter, et al. [43] konnten in einer in vitro Studie die topografische Induktion der Zellform sowie eine durch die Zellform ausgelöste Polarisation von Makrophagen zu einem M1- oder M2-Phänotyp nachweisen.

Jeder Zelltyp wird unterschiedlich beeinflusst durch die individuelle Chemie der Materialoberfläche und Topografie. Die Oberfläche von Implantaten sollte zielgerichtet zur Unterstützung der Adhäsion und Funktion der entsprechenden Zellen entwickelt werden [44]. Somit hat der Produktionsprozess von Biomaterialien einen starken Einfluss auf die Oberfläche und beeinflusst das Korrosionsverhalten. In Kombination mit der Entwicklung spezifischer Legierungen und Oberflächenmodifikationen von Biomaterialien kann das Degradationsprofil dem individuellen Bedarf angepasst werden [45]. Oberflächenmodifikationen von bioinerten Materialien zielen auf die Verbesserung der Oberflächenbioaktivität und der Verhinderung der toxischen Freisetzung von Metallionen um die Zelladhäsion, Zellproliferation und Zelldifferenzierung positiv zu beeinflussen. Die Oberflächenbehandlung von Biomaterialien kann mechanisch, physikalisch oder chemisch erfolgen. Mechanische Oberflächenbehandlungen werden genutzt um eine gewünschte Oberflächenmorphologie und -eigenschaften zu schaffen und können somit ein effektiver Weg sein um die Eigenschaften von Legierungen zu verbessern [31].

2.2 Physiologie zellulärer Eigenschaften der Ratte und deren Einfluss auf die FBR

2.2.1 Merkmale der Lymphozyten

Ratten weisen ein lymphozytäres Blutbild auf, sodass die Population der Leukozyten der Ratte zu 65 - 85 % aus Lymphozyten besteht [46]. Lymphozyten entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark über Vorläuferzellen und differenzieren sich im Knochenmark zu B- und im Thymus zu T-Lymphozyten. Nach der Reifung gelangen sie über die Blutbahn ins lymphatische System. Mikroskopisch besitzen T-Zellen eine Größe von 7-11 µm (Campbell 2012).

B- und T- Zellen lassen sich der erworbenen "spezifischen" Immunantwort zuordnen. T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Erregern, der Transplantatabstoßung und bei der Bekämpfung von Tumoren. Die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen lysieren Zielzellen über die Erkennung von Antigenen in Assoziation mit MHC-I-Molekülen und stellen somit die wichtigste Antigen-spezifische zelluläre Abwehr gegen Virus-

infizierte Zellen dar. CD4+ T-Helferzellen sind an der Reifung von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen und an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt. T-Helferzellen sezernieren Zytokine, mit denen andere Immunzellen moduliert werden. B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen sind Antigenpräsentierende Zellen (APC), die extrazelluläre Pathogene aufnehmen, lysosomal verdauen und die Peptide über die MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren und somit T-Zellen aktivieren. Regulatorische T-Zellen vermitteln die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und dienen der Unterdrückung überschießender Immunreaktionen [47].

T-Zellen lassen sich, basierend auf dem Typ des heterodimer exprimierten Antigenrezeptors in $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilen [48]. Der Hauptanteil der T-Zellen sind $\alpha\beta$ -T-Zellen, die zusammengesetzt sind aus zwei Glykoproteinketten (α - und β - Ketten). $\gamma\delta$ -T-Zellen repräsentieren eine kleine Subpopulation von T-Zellen (5-10 %) [49].

Lymphozyten übernehmen eine kritische Rolle in der Fremdkörperantwort [2]. T-Zellen sind von maßgeblicher Bedeutung für die Aktivierung von Makrophagen und der Formation von Fremdkörperriesenzellen [16]. Makrophagen interagieren mit T-Helferzellen. Die T-Zellaktivierung erfolgt nach Antigenpräsentation der Makrophagen durch den MHC-II-Komplex. Makrophagen sezernieren IL-1, welches die Freigabe von Interferon-v durch die T-Zellen stimuliert. Interferon-v aktiviert Makrophagen MHC-II zu exprimieren und induziert die Phagozytose [50]. Über parakrin-mediierte Mechanismen steigern Lymphozyten die Makrophagenadhäsion und –fusion [51]. Die Makrophagen wiederum stimulieren die Lymphozyten zur Proliferation [2]. Die chemischen Eigenschaften eines Biomaterials bestimmen die Beteiligung von Lymphozyten [51].

Studien mit T-Zell defizienten Ratten haben gezeigt, dass ohne die Aktivität von T-Zellen die Antigenpräsentation und phagozytotische Aktivität über eine geringe Expression von MHC-II und geringe lysosomale Aktivität beeinträchtigt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Kollagen um das implantierte Material bei T-Zell defizienten Ratten gesteigert wird [50]. Eine Studie von Schmidt-Bleek, et al. [52] konnte eine Verbindung zwischen einer verlängerten Wundheilung und einer höheren Anzahl zytotoxischer T-Zellen herstellen. Die Verlängerung der pro-inflammatorischen Phase und somit die zeitliche Verzögerung des Makrophagen-Switch vom M1- zum M2-Phänotyp durch eine erhöhte Anzahl an zytotoxischen T-Zellen erfolgt in Verbindung mit der Sekretion von IFN-γ und der stimulierten Differenzierung von Monozyten zu M1-Makrophagen.

2.2.2 Merkmale der Makrophagen

Makrophagen sind eine funktionell und phänotypisch heterogene Zellpopulation [53]. Sie sind in der Lage vielseitig auf verschiedene Stimuli zu reagieren. Makrophagen exprimieren mannigfaltige Oberflächen- und intrazelluläre Rezeptoren, weisen endo- und phagozytische wie sekretorische Eigenschaften auf und können die eigenen Eigenschaften durch den Kontakt mit unterschiedlichen Zelltypen modulieren [2]. Die Vielseitigkeit von Makrophagen unterstreicht die Fähigkeit der Annahme verschiedener Phänotypen in Abhängigkeit ihrer Umgebung. Dies eröffnet die Möglichkeit der Modulierung der Antwort von Makrophagen auf verschiedene Biomaterialien. Ortständige (residente) Makrophagen sind phänotypisch und funktionell an die lokale Umgebung angepasst [55]. Aufgrund des Ursprungs begründeten Italiani, et al. [56] die Unterteilung von residenten Makrophagen in Makrophagen, die sich aus dem Ektoderm des Dottersackes oder der fetalen Leber entwickeln, ohne den Weg über die monozytären Vorläuferstadien zu nehmen und in Gewebsmakrophagen, die sich aus Monozyten differenzieren. Aus Monozyten differenzierte Gewebsmakrophagen wandern postnatal in das Gewebe ein oder werden während einer Entzündungsreaktion ins betroffene Gewebe rekrutiert.

Im Allgemeinen differenzieren sich Makrophagen in die klassisch aktivierten, proinflammatorischen M1-Makrophagen und in die alternativ aktivierten, anti-inflammatorischen M2-Makrophagen [57, 58]. M2-Makrophagen können weiter in M2a, M2b, M2c und M2d unterteilt werden [59]. Die M1-Makrophagen werden aktiviert durch IFN-y als Hauptstimulator, welches von NK-Zellen oder Th1-Lymphozyten sekretiert wird, zusammen mit LPS, TNF- α und GM-CSF [53]. M1-Makrophagen sind zuständig für die Abwehr von Mikroorganismen und Fremdkörpern und fördern die akute Entzündung. Sie weisen eine hohe phagozytotische Aktivität auf und sekretieren hohe Mengen an pro-inflammatorischen Akute-Phase-Zytokinen [60]. IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, Immunkomplexe, Adenosin, M-CSF und Glukokortikoide stimulieren alternativ aktivierte Makrophagen [60]. M2-Makrophagen sekretieren antiinflammatorische Faktoren um die akute Entzündung einzudämmen. Sie verfügen über eine hohe phagozytotische Aktivität, fördern den Gewebsumbau und die Fibrose. Die Polarisierung von M2-Makrophagen erfolgt hauptsächlich über die von den Th2-Lymphozyten sekretierten Zytokinen IL-4 und IL-13. Eine weitere Aufgabe ist die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und angiogener Faktoren [18, 57, 61]. Metabolisch bestehen Unterschiede zwischen M1- und M2- Makrophagen in der vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase. Diese hat Einfluss auf die mikrobizide Fähigkeit der M1-Makrophagen und ist assoziiert mit einer reduzierten Zellproliferation. M2-Makrophagen exprimieren Arginase 1 und 2, welche Arginin zu Ornithin synthetisieren und die Zellproliferation, Heilung und Fibrose fördert [60].

Makrophagen verbinden durch die Interaktion mit T-Zellen die angeborene Immunabwehr mit dem adaptiven Immunsystem. Sie erkennen Antigene von Pathogenen und können diese über MHC-II-Moleküle den T-Zellen präsentieren [62]. Makrophagen instruieren T-Zellen zu einem Typus der Immunantwort und nutzen diese zur Verstärkung ihrer Immunantwort. M1-Makrophagen dirigieren T-Zellen zur Produktion von Th-1 ähnlichen Zytokinen (IFN- γ). IFN- γ stimuliert zytotoxische T-Zellen zur weiteren Aktivierung von M1-Makrophagen. M2-Makrophagen stimulieren T-Zellen zur Produktion von Th-2 ähnlichen Zytokinen (II-4, TGF- β), dies bewirkt die Proliferation von B-Zellen, fördert die Antikörperproduktion und verstärkt die M2-Antwort [63].

Makrophagen besitzen eine Schlüsselrolle für die FBR durch die direkte Interaktion mit dem Biomaterial. Adhärente Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen unterlaufen einem phänotypischen Wechsel über die Zeit vom M1- zum M2-Phänotyp [2]. In der frühen Phase der FBR infiltrieren M1-Makrophagen das Biomaterial um den Wundheilungsprozess zu stimulieren. Es wird vermutet, dass die M1-Makrophagen aus der Infiltration und Differenzierung von Monozyten resultieren. M2-Makrophagen akkumulieren nach 3-4 Tagen nach der Implantation, während die Aktivität der M1-Makrophagen abnimmt. M2-Makrophagen akkumulieren über den direkten Übergang von M1 zu M2, durch Polarisierung von eingewanderten Makrophagen/Monozyten zu M2-Makrophagen oder der Proliferation von M2-Makrophagen. Es wird vermutet, dass die Akkumulation der M1- und M2-Makrophagen einen sehr komplexen Vorgang darstellt und teilweise überlappende Formen annimmt [64]. Zahlreiche Studien untersuchen die Antwort von M1- und M2-Makrophagen auf unterschiedliche Biomaterialien. Zunehmend stellt sich die Frage nach der Bedeutung des Makrophagentyps für die Phasen der FBR. Welcher Phänotyp ist wünschenswert für eine komplikationslose Integration eines Biomaterials im Organismus? Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden verschiedene Thesen aufgestellt. Klopfleisch [60] debattiert über die Möglichkeiten einer Dominanz der beiden Makrophagensubtypen. Er kommt zu dem Schluss, dass für den Ablauf einer FBR beide Subtypen essentiell sind und verdeutlicht die Wichtigkeit eines korrekten Verhältnisses von M1- zu M2-Makrophagen. Dies begründet er mit den funktionellen Eigenschaften der Makrophagen und stellt verschiede Hypothesen auf. M1-Makrophagen entfernen nekrotisches Gewebe und aktivieren Fibroblasten, Myofibroblasten und Epitheliale Zellen. Dies stellt einen wichtigen Aspekt für die Wundheilung und Regeneration dar. Eine Hemmung der M1-Makrophagen gipfelt in einer Unterbrechung der Entfernung von Zelltrümmern und die Persistenz von M1-Makrophagen führt zu einer chronischen Entzündung und verzögert die Wundheilung. Die M2-Makrophagen kontrollieren und unterbrechen die akute Entzündungsreaktion. Die Hemmung von M2 führt zu einer verlängerten akuten Entzündung. M2-Makrophagen sind zuständig für die Fibrosierung und Bildung von Bindegewebe. Eine Dominanz der M2 führt zu einer verstärkten fibrotischen Ummantelung des Biomaterials.

In der Ratte folgt man der Nomenklatur von CD68+CD163- M1-Makrophagen und CD68+CD163+ M2-Makrophagen [64]. Cote, et al. [64] konnten zeigen, dass zirkulierende CD11b+CD68+ Monozyten kein CD163 exprimieren. In dieser Studie wurde die Blockierung der Infiltration von Monozyten untersucht. Man nahm an, dass die M1- und M2-Akkumulation gehemmt werden würde. Entgegen den Erwartungen wurde die Akkumulation von M1 und M2 gesteigert. Die Autoren gehen davon aus, dass die Hauptquelle der M1-Makrophagen zirkulierende Monozyten sind, während M2-Makrophagen sich scheinbar aus residenten Makrophagen oder aus infiltrierten Vorläufern differenzieren.

Makrophagen können je nach Funktion eine sehr unterschiedliche Erscheinung annehmen. Sie besitzen eine unregelmäßige Form und können bis zu 20 µm und größer werden. Makrophagen besitzen einen Zellkern mit dichter Chromatinstruktur sowie ein Zytoplasma mit Granula oder Vakuolen. Morphologisch auffällig sind die pseudopodienartigen Fortsätze der Makrophagen.

2.2.3 Merkmale der Monozyten

Bei den Monozyten handelt es sich mit einer Größe von 12 bis 20 µm um die größten im Blut zirkulierenden Zellen des Immunsystems. Morphologisch besitzen Monozyten einen nierenförmigen Zellkern mit feiner Chromatinstruktur und einen schwach basophilen Zytoplasmasaum mit feinen Granula. Monozyten haben einen Anteil von 0 bis 5 % an den Gesamtleukozyten im peripheren Blut der Ratte [46]. Die Monozyten sind eine heterogene Gruppe und werden in Subpopulationen unterschiedlicher Größe, Zellkernmorphologie, Granularität und Funktionalität unterteilt [65]. Monozyten sind Vorläufer der in den Geweben lokalisierten Makrophagen. Durch pro-inflammatorische, metabolische und immunologische Stimuli erfolgt die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut in die Peripherie, wo sie sich zu Makrophagen und Dendritischen Zellen differenzieren um zur Abwehr, Gewebsregeneration und -reparatur beizutragen [65]. Funktionell besitzen Monozyten phagozytotische Aktivität und dienen der Antigenpräsentation. Monozyten differenzieren sich aus den myeloischen Stammzellen im Knochenmark, gelangen ins Blut und haben eine kurze Lebenszeit, bevor sie spontan durch Apoptose untergehen oder sich in Makrophagen mit längerer Lebenszeit differenzieren [66].

In der Ratte unterteilt man phänotypisch zwei verschiedene Subpopulationen von Monozyten: die klassischen Monozyten (CD43low, CD4-, 10-20 %) und die nicht-klassischen Monozyten (CD43high, CD4+, 80-90%), die anhand ihrer CD43 Expression selektiert werden können [67]. Hinweise auf funktionelle Unterschiede der beiden Subpopulationen liefert eine Studie von Grau, et al. [68]. Hier konnte gezeigt werden, dass ruhende Monozyten positiv für CD4 sind und einen kleinen Durchmesser aufweisen. Aktivierte Monozyten wiesen in dieser Studie einen größeren Durchmesser und eine reduzierte CD4-Expression auf. Gordon, et al. [65] komplimentieren die Unterteilung in entzündliche (CD43low, CD4+/-) und residente Monozyten (CD43high, CD4++) anhand der CD43 und CD4 Expression.

2.2.4 Merkmale der Granulozyten

Granulozyten gehören zu den Leukozyten und werden je nach Färbe- und funktionellem Verhalten unterteilt in Eosinophile-, Basophile- und Neutrophile Granulozyten.

Die polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (kurz PMN) bei der Ratte machen 9-34 % der Leukozyten im Blut aus [46]. PMN haben einen Durchmesser von 10-12 um, besitzen einen segmentierten Kern und ein schwach azidophiles Zytoplasma. Sie detektieren eingedrungene Mikroorgansimen und können schnell zum Entzündungsgeschehen migrieren. PMN enthalten Granula mit proteolytischen Enzymen, antibakteriellen Mediatoren und reaktivem Sauerstoff zur Bekämpfung und Phagozytose der eingedrungenen Mikroorganismen [69]. PMN werden während der Granulopoese aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet und gespeichert. Bei Bedarf können sie schnell ins Blut freigegeben und die Granulopoese gesteigert werden. Die Extravasation der PMN aus dem Blut ins Gewebe erfolgt nach Induktion einer Entzündung entsprechend eines chemotaktischen Gradienten [70].

Das Auftreten von PMN an der Implantatoberfläche markiert die akute Entzündungsreaktion der FBR. PMN werden durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) und Histamin, welche durch Mastzellen freigesetzt werden, stimuliert. Es erfolgt die Extravasation aus dem Blut. Chemokine weisen den PMN den Weg zur Implantatoberfläche. Die kurzlebigen PMN werden folgend durch Monozyten und Makrophagen ersetzt [15].

Eosinophile Granulozyten haben zu 0 - 6 % Anteil an den Gesamtleukozyten der Ratte [46]. Der 1879 von Paul Ehrlich eingeführte Begriff der Eosinophilen Granulozyten steht in Verbindung mit der Affinität zum Farbstoff Eosin. Eosinophile Granulozyten haben eine Größe von 12-17 μ m, einen segmentierten meist hantelförmigen Kern sowie zahlreiche intrazelluläre Granula. Funktionell sind sie an zahlreichen Entzündungsprozessen beteiligt: Erkrankungen ausgelöst durch Parasiten, Bakterien, Viren, Gewebsverletzungen, Tumoren und Allergien. Als Antwort auf verschiedene Stimuli werden Eosinophile Granulozyten aus dem Blutstrom rekrutiert und können die Immunantwort über verschiedene Mechanismen regulieren. Sie sekretieren eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18), TGF α/β , Chemokinen (RANTES, Eotaxin-1), Lipidmediatoren, Leukotriene und den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) und können somit die Zelladhäsion regulieren, die Blutgefäßpermeabilität sowie den zellulären Membrantransport beeinflussen. Eosinophile Granulozyten fungieren als Antigenpräsentierende Zellen [71]. Die Infiltration von Eosinophilen während der FBR wurde von mehreren Autoren beschrieben, die klinische Bedeutung sollte in zukünftigen Forschungen thematisiert werden [72].

Basophile Granulozyten sind die kleinste Subpopulation von 0 bis 1,5 % der im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten [46]. Die Differenzierung erfolgt im Knochenmark aus der hämatopoetischen Stammzelle. Sie verlassen das periphere Blut aufgrund chemotaktischer Stimuli. Die Gemeinsamkeit zu Mastzellen ist das Vorhandensein des hochaffinen IgE-Rezeptors $Fc_{\epsilon}RI$. Funktionell sind Basophile Granulozyten an der Förderung chronischallergischer Entzündungsvorgänge beteiligt, sie regulieren die Th2-Zellfunktion, vermitteln das Immunzellgedächtnis und fungieren als Antigenpräsentierende Zellen. Basophile Granulozyten setzen Histamin, Proteoglykane und proteolytische Enzyme frei. Sie sekretieren Lipidmediatoren und produzieren wichtige Zytokine und Chemokine [73].

2.2.5 Merkmale der Mastzellen

Mastzellen reifen aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und kommen in allen Geweben vor [74]. Sie werden durch chemotaktische Entzündungssignale zur Wunde rekrutiert. Das Überleben und die Differenzierung von Mastzellen stehen in Abhängigkeit zum Stammzellfaktor (SCF). Der Stammzellfaktor bindet am Tyrosinkinase-Rezeptor (CD117, c-KIT) und wird dadurch aktiviert. Die Interaktion von SCF und c-KIT bewirkt die Aktivierung und Degranulation der Mastzelle [75].

Während der FBR vermittelt die Degranulation von Histamin die akute Entzündungsreaktion. Mastzellen geben IL-4 und IL-13 frei, dies hat einen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß und den Grad der Fremdkörperreaktion [2]. Histamin führt zur Rekrutierung von phagozytotisch aktiven Zellen: Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. Mastzellen sind Initiatoren der Fremdkörperreaktion [76]. Die Fibrinakkumulation an der Implantatoberfläche spielt für die Mastzellaktivierung eine wichtige Rolle. Die Degranulation von Mastzellen bewirkt die Freisetzung von Histamin, Serotonin, Heparin, TNF- α und eine Reihe von Mastzell-Enzymen (Chymase, Tryptase, Esterase). Aktivierte Mastzellen und sezernieren Chemokine. Zytokine Lipidmediatoren. Die Produkte der Mastzelldegranulation und -sezernation können den Phänotyp von Entzündungs- und Immunregulatorischen Zellen verändern und die Migration von Zellen anregen [77]. In einer Studie von Orenstein, et al. [77] konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der Degranulation der Mastzelle die FBR bedeutend verringert, die chronische Entzündung reduziert und die Fibrosierung vermindert werden konnte.

2.2.6 Merkmale der Natürlichen Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine Subpopulation der Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität. Sie gehören dem angeborenen "unspezifischen" Immunsystem an. NK-Zellen dienen der Produktion von Zytokinen und Chemokinen und sind beteiligt an der Antwort und Abwehr von viralen Infektions- und Tumorerkrankungen. NK-Zellen zirkulieren im Blut und sind in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen zu finden [79]. Subpopulation der Natürlichen Killerzellen sind zytolytische Zellen ohne Antigen-spezifische Rezeptoren. NK-Zellen erkennen Tumorzellen mittels spezieller MHC-Moleküle und virusinfizierte Zellen über einen Fc-Rezeptor. Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt über IL-2, IL-12 und IFN-γ.

Die Bedeutung von NK-Zellen für die FBR bedarf weiterer Forschung. In einer Studie von van Luyn, et al. [80] konnten Natürliche Killerzellen und B-Zellen zu keinem Zeitpunkt in der Implantatumgebung während der FBR beobachtet werden. Eine Studie von Khouw, et al. [81] zeigte, dass NK-Zellen nur in geringem Maße während einer Fremdkörperreaktion im umliegenden Gewebe nachweisbar sind.

2.2.7 Merkmale der Dendritischen Zellen

Ausgelöst durch eine Gewebsverletzung werden Monozyten aus dem Blut rekrutiert. Die Mehrheit der Monozyten differenzieren in Makrophagen. Circa 25 % der Monozyten differenzieren in Dendritische Zellen [82]. Dendritische Zellen (DCs) gehören zu den Antigenpräsentierenden Zellen und befinden sich im peripheren Gewebe, in der Epidermis als Langerhans Zellen sowie in der Haut. Sie werden aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und entwickeln sich über lymphoide und myeloide Vorläuferzellen zu reifen Dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen stimulieren B- und T-Zellen. Sie fungieren als übergeordnete Modulatoren des Immunsystems [83]. DCs fördern die Immunität und die Toleranz. Sie können Antigene aufnehmen und diese T-Zellen über MHC-I- und MHC-II-Moleküle präsentieren [84]. DCs kontrollieren die Qualität der T-Zell-Antwort, da sie naive Lymphozyten zu T-Effektorzellen differenzieren [83]. Diese Antigen-spezifische adaptive Immunantwort ist bedeutend für die Resistenz gegenüber Infektionen und Tumoren. DCs vermitteln autoimmune Prozesse, indem sie regulatorische T-Zellen generieren, welche aktivierte T-Zellen unterdrücken können. DCs sind an antimikrobiellen Prozessen über die Produktion von Zytokinen (IL-12, Typ I und II Interferon) beteiligt. DCs aktivieren NK und NK-T-Zellen, welche ausgewählte Zielzellen zerstören und wichtige Zytokine produzieren können [84]. Fremde Antigene und entzündliche Stimuli bewirken einen Anstieg der Rekrutierung von DCs am Entzündungsprozess und fördern die Migration in die regionalen Lymphknoten, in denen die DCs endgültig reifen [82]. Vasilijic, et al. [82] untersuchten DCs während der FBR nach der subkutanen Implantation von Polyvinylschwämmen bei der Ratte. Hierbei konnte der Phänotyp von DCs als CD68+ und CD4+ nach 6 und 14 Tagen nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe konnte einen Anstieg der DCs zum Tag 10 mit nachfolgendem Absinken beobachten. Trinite, et al. [85] isolierten dendritische Zellen aus der Milz und analysierten deren Phänotyp. In dieser Studie konnte zu 10-15 % eine kleinere Subpopulation (CD4+, OX41+, CD5+, CD90 +) von einer größeren Subpopulation von 80-85 % (CD4-, OX41- und CD5-) unterschieden werden.

2.3 Eigenschaften der Implantationsmaterialien

2.3.1 Magnesium als Biomaterial

Magnesium stellt aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften, ähnlich wie die des Knochens, ein vielversprechendes resorbierbares Material für den chirurgisch-orthopädischen Einsatz dar [7]. Die Vorteile von Magnesium als biodegradabler Werkstoff sind die Kombination aus mechanischer Festigkeit und Dehnbarkeit sowie die Unschädlichkeit von Degradationsprodukten für den Organismus [5].

Magnesium ist ein essentieller Bestandteil der Nahrung, die empfohlene tägliche Zufuhr des Menschen beträgt 300 bis 400 mg [5]. Als Cofaktor ist Magnesium ein wichtiger Bestandteil biochemischer Prozesse [86]. Oral aufgenommen wird es zu circa einem Drittel als Ion (Mg²⁺) über den Dünndarm aus der Nahrung resorbiert und kann zum größten Teil über den Urin, in geringen Mengen über die Gallenblase oder über den Schweiß ausgeschieden werden. Magnesium dient der Stabilisierung von Membranen, unterstützt die neuromuskuläre Weiterleitung von Signalen und besitzt wichtige Funktionen im zentralen Nervensystem [4]. 99% des körpereigenen Magnesiums ist im Knochen, im Muskel und im Bindegewebe extrazellulär gespeichert, davon befinden sich 50-60% schnell verfügbar im Knochen [87]. Magnesium ist das vierthäufigste Kation im menschlichen Körper [88].

Die Limitation von reinem Magnesium als Implantatmaterial basiert auf der schnellen Bildung Wasserstoff Korrosionsprodukt Degradation und der von als [89]. Magnesiumlegierungen mit Metallen Seltener Erden bieten die Möglichkeit einer reduzierten Degradation und der Verbesserung von mechanischen Eigenschaften [90]. Vorteil gegenüber anderen biodegradablen Materialien, wie zum Beispiel Polymere, Keramik oder Bioglas, ist die höhere Zugfestigkeit. Effekte einer Belastungsabschirmung (stress - shielding), wie sie beim Einsatz von Titan und rostfreiem Stahl bekannt sind, können aufgrund der ähnlichen mechanischen Eigenschaften im Vergleich zum Knochen vermieden werden [91, 92]. Als Leichtmetall ermöglichen Magnesiumlegierungen eine Defektstabilisierung durch Lastaufnahme über 12-18 Wochen. Dies ist ein kalkulierbarer Zeitraum für die Knochenheilung und für den Ersatz und Verschluss des Defektes durch natürliches Gewebe [88]. Demnach

sollte die Degradationsrate der Magnesiumlegierungen entsprechend der Knochenheilung zeitlich angepasst werden [89]. Die sukzessive Auflösung des Materials erspart dem Patienten eine zweite Operation zur Entfernung des Implantates. Vielversprechend für den Patienten sind hierbei die verkürzte Erholungszeit und der reduzierte Stress durch Aussparung eines erneuten Traumas durch Explantation der Materialien. Medizinische Ressourcen können effizienter ausgeschöpft werden. Durch die verminderte Auslastung der Chirurgen kann die Behandlung weiterer Patienten gesteigert werden [15]. Magnesiumlegierungen verfügen unabhängig von ihrer Zusammensetzung über einen osteoproliferativen Effekt und stimulieren das Knochenwachstum über die Reduktion der Anzahl von Osteoklasten [93]. Die Ursache des gesteigerten Knochenwachstums ist laut einer Studie von Janning, et al. [93] das Hauptkorrosionsprodukt Magnesiumhydroxid. In Studien von Feyerabend, et al. [94] konnte eine vorteilhafte Wirkung auf den Knorpelstoffwechsel durch eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von Magnesium nachgewiesen werden.

2.3.1.1 Biokompatibilität

Die Biokompatibilität der Korrosionsprodukte von Magnesiumlegierungen ist abhängig von der Korrosionsrate und der damit verbundenen freigesetzten Menge der Degradationsprodukte [4].

Die chemische Reaktion des Degradationsprozesses ist in der Formel (1) zusammengefasst. In normaler Atmosphäre bildet sich eine Oxidschicht auf Magnesiummaterialien. In wässriger Lösung degradiert Magnesium über eine elektrochemische Reaktion, in der Magnesiumhydroxid und Wasserstoff entsteht (2) [8]. Auf dem Probenkörper entsteht durch das Magnesiumhydroxid ein Film, welcher folgend als Korrosionsschutz fungiert [95]. Ab einer Chloridkonzentration größer als 30 mmol/l reagiert Magnesiumhydroxid mit den Chloridionen zu hochlöslichem Magnesiumchlorid und Wasserstoff (3a, 3b). Steigt die Chloridkonzentration in der Umgebung auf über 150 mmol/l, führt dies zu einer sehr schnellen Degradation und wird als Lochkorrosion bezeichnet [5]. Die Korrosion von Magnesium ist relativ unempfindlich gegenüber der Sauerstoffkonzentration in der Lösung unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen [8].

(1) 2 Mg⁺ + 2 H₂O \rightarrow 2 Mg²⁺ + 2 OH⁻ + H₂

(2) Mg + 2 H₂O \rightarrow Mg(OH)₂ + H₂

(3a) Mg + 2 Cl⁻ \rightarrow MgCl₂

(3b) Mg(OH)₂ + 2 Cl⁻ \rightarrow MgCl₂ + H₂

Die Freisetzung von Hydroxidionen führt zu einem Anstieg des pH-Wertes im Gewebe [96]. Der arterielle pH-Wert im Blut des Menschen unterliegt einer strengen Regulation zwischen 7,37 und 7,44 [97]. Die physiologischen Puffersysteme (Bikarbonat-, Hämoglobin-, Proteinund Phosphatpuffer) sind in der Lage pH - Schwankungen durch die Exkretion von H⁺ über die die auszugleichen Niere und CO_2 über Lunge [4]. Die physiologischen Regulationsmechanismen arbeiten zuverlässig unter der Bedingung einer langsamen Korrosionsrate und der Freisetzung von geringen Mengen von Hydroxidionen [99]. Die Freisetzung von Wasserstoffgas in hohen Mengen führt zur Bildung von Gasblasen im Gewebe, dies kann zur Stenose von Blutgefäßen und zur Beeinträchtigung der Zellviabilität führen [4, 5, 100]. Gasblasen verursachen die Trennung der Gewebsschichten und führen zur

Verzögerung der Heilungsvorgänge [92]. Die lokale Alkalisierung in der Umgebung des Implantates kann das pH-abhängige, physiologische Gleichgewicht ungünstig beeinflussen und führt ab einem lokalen pH von 7,8 zu alkalischen Vergiftungserscheinungen [100]. In einer Studie von Kuhlmann, et al. [101] wurden haarlosen Mäusen Scheiben von Magnesiumlegierungen mit Metallen Seltener Erden subkutan implantiert und die Konzentration von Wasserstoff über einen Wasserstoffsensor und massenspektrometrischen Messungen bestimmt. Diese Untersuchungen von Kuhlmann, et al. [101] konnten zeigen, dass der Wasserstoff in einer Gasblase bereits nach einem Tag nur noch in geringer Konzentration nachweisbar ist und schnell über die Haut diffundiert sowie im umliegenden Fettgewebe akkumuliert. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass Wasserstoff über das umliegende Gewebe und benachbarte Blutgefäße gegen Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoffdioxid ausgetauscht wird. Klinische Forschungen belegen Wasserstoff als einen wichtigen physiologisch-regulatorischen Faktor mit antioxidativer, anti-inflammatorischer und antiapoptotischer Wirkung auf Zellen und Organe [102].

Die Freigabe der Metallionen während des Degradationsprozesses an der Implantatoberfläche erfolgt nicht linear, nicht homogen und multifaktoriell. Sie wird beeinträchtigt von den Materialeigenschaften wie zum Beispiel von Korngröße, Herstellungsprozess, Form, Größe, Oberfläche, Oberflächenrauigkeit und von biologischen Eigenschaften der Umgebung wie zum Beispiel pH, Fließgeschwindigkeit, Konzentration von Ionen, Konzentration biologischer Moleküle sowie von der Bildung von Gasblasen [103]. Dies bedingt, dass der Degradationsprozess und die Korrosionsrate örtlich und zeitlich unterschiedlich ausfallen können. Die Zusammensetzung der Magnesiumlegierungen unterliegt lokalen Veränderungen während des Degradationsprozesses aufgrund der Tatsache, dass einige Ionen schneller eliminiert werden können als andere. Die lokale Korrosion, die Freigabe von Metallionen und die Akkumulation von Korrosionsprodukten kann gleichzeitig an unterschiedlichen Regionen auftreten [6]. Eine mögliche toxische Wirkung durch die Menge der freigesetzten Metallionen auf die benachbarten Zellen ist somit abhängig vom Ort und der Zeit. Die Degradation von Magnesium hat einen direkten Einfluss auf die Zelladhäsion und -proliferation [96]. Mit dem Anstieg der Osmolarität in der Umgebung des Biomaterials durch den Zerfall des Metalls erfolgt eine schlechtere zelluläre Adhäsionskapazität und eine zunehmende Apoptose [104, 1051.

Die beschriebenen Vorgänge verdeutlichen die komplexe Wechselwirkung zwischen dem Biomaterial und dem biologischen System, in dem es sich befindet. Die Degradation und die Korrosionsprodukte induzieren eine lokale Entzündungsreaktion, die als Fremdkörperreaktion bezeichnet wird. Die freigesetzten Entzündungsmediatoren haben wiederum einen Einfluss auf die Degradation der Materialien [8]. Mannigfaltige Studien beschreiben eine gute Biokompatibilität und milde Fremdkörperreaktion durch degradierendes Magnesium [106]. Eine explosionsartige Freisetzung der Degradationsprodukte wird als problematisch angesehen [4]. Wissenschaftlichen Bemühungen gehen in Richtung einer langsamen, kalkulierbaren Degradation der Magnesiumlegierungen. Die Entwicklung von Beschichtungen und Oberflächenmodifikationen stehen in der Aufmerksamkeit der aktuellen Forschungen um die Degradationsrate zu reduzieren [92].

2.3.1.2 Zytotoxizität

Die Regulation der Homöostase von Magnesium erfolgt durch den Darm, die Knochen und die Niere [87]. Als essentielles Element im physiologischen System des menschlichen Körpers sind überschüssige Magnesiumkationen aufgrund der effizienten Ausscheidung über die Niere als harmlos einzustufen [86, 107]. Eine Hypermagnesiämie kann im Falle einer chronischen Nierenerkrankung und dem Versagen der kompensatorischen Mechanismen entstehen [108].

Zu Beginn einer Erhöhung der Serumkonzentration von Magnesium werden meist keine klinischen Anzeichen auffällig [109]. Durch die intravenöse Gabe können bei Serumkonzentrationen zwischen 2,5-5 mmol/l Übelkeit, Blutdruckabfall und Mattheit ausgelöst werden [110, 111]. Ab einer Serumkonzentration von mehr als 5-15 mmol/l ist mit einem kardiovaskulären Kollaps, Koma und respiratorischer Depression zu rechnen [110, 112, 113].

Feyerabend, et al. [90] untersuchten *in vitro* die Wirkung von Magnesiumchlorid in Konzentrationen von 1 mM bis 200 mM auf die Viabilität von humane Osteosarkomzelllinien (MG63), auf Zelllinien muriner Makrophagen (RAW 264.7) sowie auf humane perivaskuläre Nabelschnurzellen (HUCPV). Die mittlere letale Dosis von Magnesiumchlorid auf die genannten Zelllinien liegt zwischen 50 und 73 mM.

2.3.2 Gadolinium

Bei der Auswahl von Legierungspartnern für Magnesium spielt die pathophysiologische Eianuna des Legierungselementes eine entscheidende Rolle. da durch den Degradationsprozess eine Freisetzung von Metallionen in den Körper erfolgt. Die Magnesiumlegierungen mit Metallen Seltener Erden bieten den Vorteil einer verbesserten Korrosionsresistenz in Kombination mit ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften [5]. Sie werden als eine neue Klasse biodegradabler Implantatmaterialien beschrieben aufgrund der Tatsache, dass die derzeit genutzten Materialien hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften im Ungleichgewicht mit dem Knochen stehen und somit ein erhöhtes Risiko für eine unerwünschte Korrosion und der Abnutzung des Materials besteht [114]. Gadolinium gehört zu den Metallen Seltener Erden. Diese sind definiert als eine Gruppe aus 17 Elementen, die anhand ihrer Atomradien in leichte, mittlere und schwere Metalle eingeteilt werden. Gadolinium gehört zu den Metallen mit einem mittleren Atomradius [90]. Besonderes Interesse für die Metalle Seltener Erden besteht aufgrund antikarzinogener Eigenschaften für einen multifunktionellen Gebrauch als Implantatmaterial [115-118].

2.3.2.1 Biokompatibilität

Gadolinium wird in der Humanmedizin in komplexer Form (Gadopentetat-Dimeglumin) als Kontrastmittel für die MRT-Diagnostik genutzt. Als freies Gd³⁺ - Ion ist Gadolinium schwer löslich und kann aufgrund der Affinität zu Wasser und Hydroxidionen Phosphat- und Carbonatsalze bilden, die im Gewebe akkumulieren [6, 119]. Die freie Form der Gd³⁺-Ionen kann eine toxische Wirkung auf biologisches Gewebe haben.

Magnesiumlegierungen mit Gadolinium wurden bereits als gute Kandidaten für die medizinische Applikation beschrieben [90, 120, 121]. Gadoliniumkonzentrationen von bis zu 10 % verbesserun das Korrosionsverhalten. Bei Konzentrationen über 10 % erfolgt keine Verbesserung der Korrosionsresistenz [122]. In einer Studie von Hort, et al. [7] wurde das Korrosionsverhalten von MgGd5, MgGd10 und MgGd15 über die Gewichtsreduktion und Wasserstoffproduktion ermittelt. Bei MgGd15 konnte eine deutliche Steigerung der Korrosionsrate beobachtet werden. MgGd10 zeigte die geringste Korrosionsgeschwindigkeit. Eine schnelle Degradation resultiert in einer Erhöhung des pH und der Osmolarität in der Umgebung [96]. Bei Untersuchungen zum Degradationsverhalten von MgGd10 zeigte dies eine moderate und stabile Degradation über die Zeit mit geringen Veränderungen des pH und der Osmolarität. In dieser Studie von Cecchinato, et al. [96] konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz von Zellen und das Wachstum von humanen perivaskulären Zellen der Nabelschnur (HUCVP) auf MgGd10 mit einer moderaten Korrosionsrate besser erfolgte als bei Vergleichsmaterialien mit gesteigerter Korrosionsrate.

2.3.2.2 Zytotoxizität

Die Toxizität von Gadolinium kann durch chelatbildende Reagenzien deutlich reduziert werden [90]. Die mittlere letale Dosis von intraperitoneal appliziertem Gadoliniumchlorid beträgt 550 mg pro kg/KG bei der Ratte. Bei der dauerhaften oralen Zufuhr von Gadoliniumchlorid über 12 Wochen konnten keine Effekte auf das Wachstum oder das Blutbild von Ratten beobachtet werden [121]. Die mittlere letale Dosis als Endpunkt der Zytotoxizität reicht meist nicht aus um die toxikologischen Eigenschaften zu beschreiben. Die Frage nach synergistischen Effekten der freigegebenen Metallionen stellt sich. In einer Studie von Grillo, et al. [6] konnten keine synergistisch schädlichen Effekte durch die gleichzeitige Freigabe von Magnesium und Gadoliniumionen nachgewiesen werden. Zytotoxische Effekte von Gadoliniumchlorid ab einer lokalen Konzentration von $\ge 200 \ \mu$ M/ml wurden ermittelt. Genotoxische Effekte wurden ab einer Konzentration von $\ge 1600 \ \mu$ M beobachtet [6]. Die mittlere letale Dosis von Gadolinium auf Makrophagen und Osteoblasten-ähnliche Zellen liegt bei >1000 \ \muM. [90]

2.4 Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ist heute eines der leistungsfähigsten Werkzeuge zur Phänotypisierung des Immunsystems [123, 124]. Die Immunphänotypisierung dient der Identifizierung verschiedener Subpopulationen von Zellen über die Nutzung von Antikörpern, die Antigene auf einer Zelle detektieren. Mittels der Durchflusszytometrie können somit Immunzellen anhand ihrer Größe, Granularität, deren Oberflächeneigenschaften sowie intrazellulärer Merkmale unterschieden werden.

Eine Zellsuspension wird in einem Flüssigkeitsstrom mit konstanter Geschwindigkeit an einem Laser vorbeigeführt. Die Zellen werden durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert und durch den Laser in einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Das emittierte Licht wird von Detektoren aufgenommen, die durch vorgeschaltete Filter nur einen schmalen Bereich des Lichtes aufnehmen [125]. Über die Streuung des Lichtes werden Informationen über die Größe und Granularität der Zellen generiert. Das Laserlicht wird in 2 Richtungen gestreut: das nach vorn gestreute Licht (Forwardscatter, FSC) korreliert mit der Größe einer Zelle und das zur Seite gestreute Licht (Sidescatter, SSC) steht in Zusammenhang mit der Zellgranularität.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (FSC, SSC)

Zielsetzung der FACS-Analyse ist das Bestreben der zweifelsfreien Unterscheidung zwischen der Antigen–positiven und Antigen–negativen Populationen und exakten Messung der positiven Population von Zellen [126, 127]. Für die präzise Messung positiver Signale ist die Minimierung von Hintergrundsignalen notwendig. Hintergrundsignale können durch Autofluoreszenz, spektraler Überlappung und unerwünschter Antikörperbindung entstehen. Hintergrundsignale werden ebenso durch die Wahl der Antikörper, die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes, durch das Färbeprotokoll und der optimalen Konfiguration des FACS-Gerätes beeinflusst [128].

Die Entwicklung eines verlässlichen Mehrfarbenpanels ist zeitaufwendig und erfordert eine Reihe von Validierungsschritten [129]. Für diese Studie wurde der MACS Quant "Erato" von der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dieses Gerät ist befähigt 8 verschiedene Fluoreszenzparameter gleichzeitig zu messen und verfügt über 3 Laser (Blau 488 nm, Rot 633 nm, Violett 405 nm). Die Laser sollten vor jeder Messung durch den Einzug von Rainbow Beads (BD Biosciences) kalibriert werden. Aus den vielfältigen Möglichkeiten werden entsprechend der Konfiguration von Lasern und Detektoren des FACS-Gerätes Fluoreszenzfarbstoffe in der besten Kombination für das Experiment ausgewählt [124]. Die Helligkeit eines Fluoreszenzfarbstoffes wird nicht nur durch die Intensität der gefärbten positiven Zellen, sondern auch vom Hintergrund der negativen Zellen beeinflusst [124]. Die Entscheidung für ein Fluorochrom oder Konjugat ist abhängig vom Expressionslevel und vom Zelltyp, auf dem der Marker exprimiert ist [124]. Hierfür wird folgende Regel definiert: eine gering exprimierte Eigenschaft wird mit einem hellem Fluorochrom ausgestattet, hoch exprimierte Eigenschaften können durch schwache Fluorochrome markiert werden [124]. Umso mehr unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in einem Panel verwendet werden, umso höher ist das Risiko für Artefakte durch Kompensationsfehler und/oder Interaktionen der Reagenzien [124].

Eine Reihe von Werkzeugen zur Qualitätssicherung stehen zur Verfügung. Natürliche Zellkomponente können durch die Laser angeregt werden. Diese Tatsache ist als Autofluoreszenz bekannt [128]. Das Ausmaß der Autofluoreszenz wird beeinflusst durch den Zelltyp und die biologischen und physiologischen Eigenschaften einer Zelle [130]. So weisen

Granulozyten aufgrund ihrer hohen Granularität eine höhere Autofluoreszenz auf als Lymphozyten [131]. Die Autofluoreszenz kann durch die Messung einer ungefärbten Probe evaluiert werden, die mit denselben Einstellungen am Gerät gemessen wird [128]. Die spektrale Reichweite der Emission der meisten Fluoreszenzfarbstoffe ist so weit, dass die Emission einer einzelnen Farbe durch mehrere Detektoren gemessen wird. Diese Überlappung der Emissionsspektren in die verschiedenen Detektionsregionen führt zur Entstehung von Hintergrundsignalen und sollte durch eine Kompensation korrigiert werden [128]. Die Kompensation ist demnach ein Prozess der mathematischen Elimination spektraler Überlappungen verschiedener Fluorochrome [124].

Für die präzise Messung eines positiven Signals sollten unspezifische Bindungen durch Antikörper eliminiert werden. Eine unspezifische Antikörperbindung ist die Bindung eines Antikörpers an ein anderes Epitop, als für das es vorgesehen war. Fc-Rezeptoren können als Rezeptoren von Antigenen erkannt und auf unfixierten, lebenden Zellen wie zum Beispiel Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und T-Zell Subpopulationen exprimiert werden [132]. Die Blockierung des Fc-Rezeptors sollte mit anti-Fc-Rezeptor Antikörpern, gepoolten Immunglobulinen oder mit Serum erfolgen [128]. Unspezifische Antikörperbindungen werden des Weiteren durch die Optimierung der Antikörperkonzentration mittels Titrationsuntersuchungen eliminiert [133]. Titrationen dienen der Ermittlung des stärksten Signals der positiven Population und des schwächsten Signals der negativen Population [133]. Zur Bestimmung von unspezifischen Antikörperbindungen über den Fc-Rezeptor und/oder der unspezifischen Bindung an Fluorochrome werden Isotypkontrollen durchgeführt [134]. Isotypen sind Antikörper, die denselben Isotyp des Immunglobulins des spezifischen Antikörpers aufweisen und sind gegen ein Antigen gerichtet, welches sich nicht auf oder in den untersuchten Zellen befindet [135]. Der Isotyp sollte an dasselbe Fluorochrom gebunden sein wie der spezifische Antikörper [128]. Bei einem Versuchsaufbau von mehr als 4 Farben im Panel ist die Hauptquelle von Hintergrundsignalen bedingt durch die Überlappung der Fluoreszenz. Aus diesem Grund wurden FMO-Kontrollen entwickelt [127]. FMO-Kontrollen (Fluoreszenz Minus One) sind Proben, die mit allen Antikörpern des Mehrfarbenpanels markiert wurden außer einem [124, 136]. Bei Proben mit mehrfachmarkierten Subpopulationen dienen FMO-Kontrollen der Bestimmung der positiven Populationen innerhalb der ausgewählten Regionen (Gates) [128].

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von verschiedenen Immunzellen in einer Zellsuspension über die Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Gesammelte Daten werden durch zweidimensionale Punktdiagramme (DotPlots) dargestellt. Durch die fortwährende Auswahl von Analysefenstern (Gates) können die einzelnen Subpopulationen der Immunzellen voneinander differenziert werden.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Eine ausführliche Liste der verwendeten Laborgeräte befindet sich im Anhang.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Eine ausführliche Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang.

3.3 Reagenzien

Eine ausführliche Liste der verwendeten Reagenzien befindet sich im Anhang.

3.4 Antikörper

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörp

Bezeichnung	Klonalität	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
CD45 eFluor 450	OX1	Maus/lgG1,kappa	1:40	eBioscience®
CD3 APC	eBioG4.18	Maus/lgG3,kappa	1:200	eBioscience®
CD4 PerCP eFluor 710	OX35	Maus/ IgG2a,kappa	1:400	eBioscience®
CD8 PE-Cy7	OX8	Maus/lgG1,kappa	1:400	eBioscience®
HIS48 FITC	HIS48	Maus/IgM	1:200	eBioscience®
CD3 PE	eBioG4.18	Maus/lgG3,kappa	1:200	eBioscience®

CD11b/c PE	OX42	Maus/IgG2a,kappa	1:200	eBioscience®
CD68 APC Vio770	REA237	Mensch/lgG1	1:10	Miltenyi Biotec
CD163 AlexaFluor 647	ED2	Maus/IgG1	1:10	Serotec
DAPI			1:250	Anaspec
Fixable Viability Dye eFluor 506 (FVD)			1:1000	eBioscience®

3.5 Isotypen

Tabelle 2: Liste der verwendeten Isotypen

Bezeichnung	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
eFluor 450	Maus/lgG1,kappa	1:40	eBioscience®
PerCP eFluor 710	Maus/ IgG2a,kappa	1:400	eBioscience®
PE-Cy7	Maus/IgG1,kappa	1:400	eBioscience®
FITC	Maus/IgM	1:200	eBioscience®
PE	Maus/IgG2a,kappa	1:200	eBioscience®
---------------------------------	------------------	-------	-----------------
REA Control (I)- APC-Vio770™	Mensch/lgG1	1:10	Miltenyi Biotec
ED2 AlexaFluor 647	Maus/lgG1	1:10	Serotec

3.6 Hergestellte Lösungen

Tabelle 3. Liste der hergestellten Losungen	Tabelle	3: Liste	der herg	gestellten	Lösungen
---	---------	----------	----------	------------	----------

Lösung	Substanz	Konzentration	
Kollagenase – Puffer	Kollagenase P	2,3 U/mg	
	Hyaluronidase	2,5 mg/ml	
	HEPES	0,24 g/ml	
	Natrium-Pyruvat	11,5 mg/ml	
	Desoxyribonuklease	2 mg/ml	

3.7 Software und Datenbanken

Tabelle 4: Liste der Verwendeten Softwareprogramm	wendeten Softwareprogramme	Tabelle 4: Liste der v
---	----------------------------	------------------------

Programm	Hersteller
Flow Jo	Tree Star - Version 7.6.5
SPSS	IBM SPSS Statistics - Version 22
Excel	Microsoft - Version 2013
Word	Microsoft - Version 2013
AxioVision	Carl Zeiss AG - Version 4.8.2,
Endnote	Clarivate Analytics - Version X7

4 Methoden

4.1 Etablierung

4.1.1 Titration der Antikörper

Der erste Schritt der Etablierungsphase ist die Titration der Antikörper zur Identifikation der korrekten Antikörperkonzentration für optimale Färbeergebnisse. Die korrekte Antikörperkonzentration ermöglicht die maximale Messung des gewünschten Signals und die Minimierung von Hintergrundgeräuschen und unspezifischen Bindungen. Zu viel oder zu wenig Antikörper würde in einer Reduktion der Sensitivität der Fluoreszenzmessung resultieren. Alle verwendeten Antikörper wurden im Zielgewebe titriert. Die Zellpopulationen wurden, wie in der Versuchsdurchführung beschrieben, bis zu einer Blut- oder Kapselzellsuspension aufgearbeitet. Eine konstante Anzahl Zellen (1x10⁶ Zellen) wurde mit absteigender Menge an Konzentration von Antikörpern in einem einheitlichen Endvolumen von 100 µl PBS + 2% FCS gefärbt. Fetales Kälberserum (FCS) wurde zur Blockierung des Fc-Rezeptors genutzt. Die empfohlene Herstellerkonzentration des Antikörpers wurde als mittlere Konzentration festgelegt und jeweils der Antikörper in 2 bis 4 Schritten verdünnt. Die Färbung wurde unter konstanten Bedingungen bei 4°C, in Dunkelheit über 30 Minuten durchgeführt. Die Messung einer ausreichenden, konstanten Menge an Zellen am FACS-Gerät (10.000 Counts) ist essentiell für die Vergleichbarkeit und Interpretation der Titrationsergebnisse. Zur Darstellung der Titrationskurven wurde im Scatter die gesuchte Population gegatet und jede Verdünnungsstufe vergleichend in einem Histogramm mit einer ungefärbten Probe dargestellt (Abbildung 2). Die optimale Konzentration eines Antikörpers wurde über die eindeutige Trennung der positiven Population von der negativen Population ermittelt. Die Konzentration mit dem stärksten Signal der positiven Population und dem geringsten Signal der negativen Population wurde ausgewählt.



Abbildung 2: Gating des betreffenden Bereiches im Scatter (links), Titrationskurven für die Konzentration des Antikörpers CD3 PE von 1:50, 1:100 und 1:200

4.1.2 Kompensation

Nach der Titration der Antikörper folgte die Erstellung einer Kompensation. Unter der Kompensation versteht man die rechnerische Korrektur überlappender Absorptions- und Emissionsspektren zur Sicherstellung der Messung des Signals im gewünschten Kanal. Das verwendete FACS - Gerät MACSQuant "Erato" ist mit 3 Lasern ausgestattet und ist befähigt Fluorochrome in 8 verschiedenen Kanälen zu messen. Aufgrund der Heterogenität unserer

Gewebeproben wurde eine manuelle Kompensation mittels der Flow Jo Software durchgeführt. Einzelfärbungen jedes Antikörpers wurde im Zielgewebe hergestellt. Am FACS - Gerät wurde zunächst eine kleine Menge ungefärbter Zellsuspension eingezogen und die Scattereinstellungen angepasst. Daraufhin folgten die Messungen der Einzelzellsuspensionen und eine Probemessung der Mehrfachfärbung aller Antikörper. Die Kompensationsmatrix wurde auf Grundlage der gemessenen Einzelfärbungen durch das Programm Flow Jo zunächst automatisch berechnet und dann manuell kontrolliert und angepasst. Die Kompensationsmatrix wurde anhand der Probemessungen der Mehrfachfärbungen aller Antikörper überprüft. Es wurde auf die zweifelsfreie Identifikation und Separation der Subpopulationen geachtet.

4.1.3 FMO (Fluoreszenz Minus One)

Die Fluoreszenz Minus One Kontrolle (=Fluoreszenz minus Eins) wird bei Mehrfachfärbungen zur Überprüfung der Positivsignale der Antikörper genutzt. Hintergrundsignale sollen detektiert und Kenntnisse über die richtige Platzierung der Auswertefenster (Gates) und deren Grenzen kontrolliert werden. Alle Fluoreszenzfarbstoffe werden gefärbt und ein Antikörper aus dem Färbepanel eliminiert. Zur Verdeutlichung der Versuchsdurchführung ist in Tabelle 5 die Zusammensetzung der FMO-Kontrollen dargestellt. Zur Durchführung wurde die Kapsel entsprechend der Standardprozedur bis zur Zellsuspension aufgearbeitet und eine definierte Menge an Zellen (1x10⁶ Zellen) für die Färbung verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Flow Jo Software. In Abbildung 3 sind die FMO-Kontrollen der Antikörper CD3 PE und CD4 PerCP eFluor 710 dargestellt. Im Vergleich mit dem *fullstain* (Mehrfachfärbung des gesamten Panels) konnten die gewählten Grenzen der Gates angepasst und bestätigt werden.

FMO				Antik	örper			
FINO	CD45	CD3	CD4	CD8	HIS48	FVD	CD68	CD163
Ungefärbte Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
FMO- CD45	-	+	+	+	+	+	+	+
FMO-CD3	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Übersicht der Zusammensetzung der Fluoreszenz Minus One Mehrfachfärbungen für das Kapselpanel

FMO – CD4	+	+	-	+	+	+	+	+
FMO – CD8	+	+	+	-	+	+	+	+
FMO – HIS48	+	+	+	+	-	+	+	+
FMO - FVD	+	+	+	+	+	-	+	+
FMO – CD68	+	+	+	+	+	+	-	+
FMO – CD163	+	+	+	+	+	+	+	-



Abbildung 3: Darstellung der Dotplots von *fullstains* der Kapsel (links) im Vergleich zu den FMO – Kontrollen der Antikörper CD3 PE (oben) und CD4 PerCP eFluor 710 (unten)

4.1.4 Isotypkontrollen

Isotypen dienen der Kontrolle der Spezifität des Antikörpers und der Bestimmung von unspezifischen Bindungen, die durch Autofluoreszenz, durch Bindungen an Zellen oder Proteinen bedingt sein können. Isotypen werden aus der gleichen Spezies gewonnen, müssen an dieselben Fluorochrome gekoppelt sein und werden in derselben Konzentration eingesetzt. Der Isotyp bindet jedoch nicht spezifisch an die Zielzelle. Es wurden Einzelfärbungen im Zielgewebe Kapsel entsprechend der Standardaufarbeitungsprozedur hergestellt. Die Messungen am MACSQuant "Erato" erfolgten entsprechend einer konstanten Menge an Zellen (10.000 *Counts*). Die Auswertung erfolgte mittels Flow Jo Software. Es wurde auf die Zielpopulation *gegatet* und das Histogramm des Isotyps wurde mit dem Histogramm von Einzelfärbungen desselben Antikörpers verglichen. Es sollte keine Bindung des Isotyps erfolgen. In der Abbildung 4 ist der Bereich im Scatter für die CD45 positiven Zellen

(Leukozyten) und das Histogramm einer Einzelfärbung (Single Stain, SS) im Vergleich zum Histogramm des zugehörigen Isotyps (Isotypkontrolle, IC) am Beispiel des Antikörpers CD45 eFluor 450 dargestellt. Für die in Rot dargestellte Isotypkontrolle ist kein positiver Peak zu verzeichnen, es hat keine spezifische Bindung stattgefunden.



Abbildung 4: Gatingbereich der Zielpopulation (links) und Histogramm der Isotypkontrolle (IC, rot) im Vergleich zur Einzelfärbung (SS, blau) des Antikörpers CD45 eFluor 450 (rechts)

4.2 Versuchsdurchführung

Das beschriebene Tierversuchsvorhaben mit dem Titel: "Analyse der Biokompatibilität neuartiger Magnesiumformulierungen als Werkstoff für orthopädische Implantate- Einfluss verschiedener Modifikationen auf die Degradation und die Fremdkörper Abstoßungsreaktion (Foreign Body Reaction, FBR) im Implantationsmodell in der Ratte, Analyse mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) sowie histologischer Aufarbeitung des Gewebes" wurde entsprechend des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetztes genehmigt und unter der Nummer G310/13 geführt.

4.2.1 Auswahl und Bezug der Tiere

Für den Versuch wurden weibliche, nicht kastrierte Lewis Ratten (n=108) vom Stamm der SsNHsd mit einem Gewicht von 180 bis 300 g von Envigo, ehemals Harlan Laboratories Ltd. bezogen. In Vorbereitung der Tiere auf den Versuch erfolgte die Eingewöhnung an die neue Umgebung nach der Anlieferung über 7 Tage in Gruppen von 4 bis 6 Tieren. Die Tiere wurden in 12 stündigem Tag-Nachtrhythmus bei regelmäßiger Fütterung und artgerechter Umgebungstemperatur gehalten.

4.2.2 Einteilung der Gruppen

Die Gruppeneinteilung erfolgte entsprechend der Standzeiten 1, 3, 7, 14, 21 und 28 Tagen und der eingesetzten Materialien: MgGd10, MgGd5 und MgFe. Es wurden pro Zeitpunkt und pro Materialgruppe 6 Tiere verwendet. Die Zuordnung der Ratten zu den Gruppen sowie die Nummerierung erfolgten nach dem Zufallsprinzip.

4.2.3 Beschaffenheit der Implantate

Die gewählten Materialien MgGd10, MgGd5 und MgFe wurden im Helmholtz-Zentrum Geesthacht als Kreiszylinder mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 2 mm angefertigt. MgGd10 wurde mit einem Gehalt von 10 % Gadolinium und MgGd5 mit einem Gehalt von 5 % Gadolinium ausgewiesen. Als Kontrollgruppe einer schnellen Degradation wurde ein Magnesiummaterial verwendet, welches eine Verunreinigung aus Eisen mit einem Volumenanteil von 150 ppm enthielt. Die Materialien wurden vor der Implantation poliert, geätzt und gamma-sterilisiert.

4.2.4 Operationsmethodik

Die Tiere erhielten 30 Minuten vor dem Eingriff eine subkutane Injektion Buprenorphin (Temgesic) in einer Dosis von 0,04 mg/kg zur Analgesie. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Box mit 3,5-5 % Isofluran, die Narkoseerhaltung per Atemmaske unter 1,5-2 % Isofluran sowie einem Sauerstofffluss von 1 l/min. Die antibiotische Abschirmung erfolgte über eine einmalige subkutane Clindamycingabe (60 mg/kg). Während der Narkose wurden die Augen der Ratten mit Bepanthen® Augensalbe benetzt und die Tiere auf einer Wärmematte gelagert. Das Erreichen der Narkosetiefe und der Analgesie wurde vor Beginn der chirurgischen Maßnahmen mittels Testung der Ausschaltung des Flexor-Reflexes überprüft. Nach dem Scheren der betroffenen Hautareale und chirurgischer Desinfektion mit alkoholischer Jodlösung wurden ieweils 2 Implantate subkutan und intramuskulär implantiert. Subkutan erfolgte eine Inzision der Haut median des Schulterblattes und die stumpfe Präparation einer 1 x 0,5 cm großen Tasche in die Unterhaut rechts und links vom Hautschnitt. In diese Tasche wurde das Implantat platziert. Hierbei wurde auf einen ausreichenden Abstand zur Hautinzision geachtet, um später eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Reaktion auf das Nahtmaterial zum Vernähen der Wunde ausschließen zu können. Die Unterhauttasche wurde mit einem Einzelheft verschlossen. Die Haut wurde daraufhin mit Einzelheften vernäht. Intramuskulär erfolgte nach Inzision der Haut über der Wirbelsäulenkontur die Inzision der Faszie des Musculus gluteus sowie die stumpfe Präparation einer 1 x 1 cm großen Tasche im Musculus gluteus in Faserrichtung. In diese Tasche wurde das Implantat platziert. Die Tasche des Muskels wurde durch ein U-Heft verschlossen. Die Naht der Haut erfolgte durch eine intrakutane Nahtmethode. Für die Naht wurde resorbierbares Nahtmaterial (Vicryl) in einer Fadenstärke von USP 5-0 verwendet. Die kontrollierte Aufwachphase fand unter Rotlicht statt. Eine postoperative Analgesie wurde über 3 Tage übers Trinkwasser mit Tramadol 2,5 mg/Kg sichergestellt. 24 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden das Haarkleid, die Körperhaltung, der Bewegungsdrang, eine Isolation der Tiere, Tränen der Augen und die Trinkmenge dokumentiert. Weitere Kontrollen des Allgemeinzustandes, die Wund- und Gewichtskontrollen wurden nach jeweils einer Woche bis zum Ende der Standzeit durchgeführt.

4.2.5 Finalisierung

Zur Narkoseeinleitung erfolgte eine Injektion von Ketamin (60 mg/Kg) und Medetomidin (0,3 mg/Kg) intraperitoneal. Erst bei vollständigem Verlust des Bewusstseins durch Prüfung des Flexor-Reflexes wurde das Herz zur finalen Blutentnahme punktiert und 10 ml 10 % Kaliumchlorid ins Herz injiziert. Die Blutproben wurden in Lithium-Heparin Röhrchen überführt. Die Präparation der subkutanen und intramuskulären Kapsel erfolgte unter sterilen Bedingungen, bei den längeren Standzeiten nach vorherigem Scheren der betroffenen Hautareale. Die Kapseln wurden bis zur Aufarbeitung in einem Kollagenasepuffer auf Eis gelagert. Die entnommenen Implantate wurden in Mikrotiterplatten überführt und bis zur Aufarbeitung mit Chromsäure bei -80°C tiefgefroren.

4.3 Probenaufarbeitung

4.3.1 Aufarbeitung von Vollblut

200 µl Rattenvollblut und 4 ml Erylysepuffer wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen suspendiert, geschwenkt und 10 Minuten bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach Zentrifugation bei 500 g bei 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml PBS + 2% FCS resuspendiert, anschließend in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde daraufhin zweimalig gewaschen (Zentrifugation 400 g, 4°C, 5 Minuten, Resuspendierung mit 1 ml PBS + 2% FCS) und für die Färbung eingesetzt.

4.3.1.1 Herstellung der FACS-Färbung

Der Mastermix für die Färbung der Blutzellsuspension wurde aus Vorverdünnungen der Antikörper hergestellt. Nach Gabe zur Zellsuspension erfolgte die Inkubation über 30 Minuten im Kühlschrank (4°C) bei Dunkelheit. Nach der Inkubation folgten zwei Waschvorgänge mit FACS-Puffer. Zuletzt wurde das Pellet in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Untersucht wurden die Oberflächenmoleküle CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b/c und HIS48. Kurz vor der Messung am MACS-Quant "Erato" wurde der Lebend-Tot-Farbstoff DAPI (1,5 µl) zur Zellsuspension hinzugefügt.

4.3.1.2 Gatingstrategie der Blutproben

Im Blut wurde die Anzahl der lebenden Leukozyten in Counts pro Milliliter bestimmt. Die Zellpopulationen wurden guantifiziert als Anteil an lebenden Leukozyten in Prozent. Die im Ergebnisteil beschriebenen Zahlenwerte in Prozent beziehen sich auf die Mittelwerte aus den Gruppen (n=6) zu den verschiedenen Standzeiten. Aus den Daten der Pilotstudie wurden Referenzbereiche der zu untersuchenden Zellpopulationen festgelegt. Hierfür wurden Blutproben vor dem operativen Eingriff bei jedem Tier (n=108) aus der V. saphena gewonnen und die ermittelten Referenzbereiche aus der Pilotstudie zum Vergleich mit den Daten der Hauptstudie herangezogen. Die Gatingstrategie wurde ausgehend von den Ergebnissen von Fecho, et al. [137] entwickelt und wird in der Abbildung 5 dargestellt. Der Oberflächenmarker CD45 wurde für die Markierung von Leukozyten verwendet. Der Ausschluss von aneinander gelagerten Zellen, den sogenannten Dubletten, erfolgte über das Gating FSC.A gegen FCS.H. Die CD45 positiven Zellen wurden daraufhin auf ihre Viabilität (DAPI) untersucht, die lebenden CD45 positiven Zellen wurden daraufhin nach CD3 gegatet. Die CD3 positiven T-Zellen wurden zur weiteren Differenzierung nach CD4 (T-Helferzellen, NK-T-Zellen) und CD8 (zytotoxische T-Zellen, TCR αβ, TCR ɣδ, NK-T-Zellen) *gegatet*. Bei den CD3 negativen Zellen handelt es sich um Nicht-T-Zellen, die weiter nach CD11bc/HIS48 gegatet wurden. Im nächsten Auswahlfenster (Gate) konnten nun 5 verschiedene Populationen voneinander unterschieden werden: R1: CD11bcneg/HIS48neg (B-Zellen), R2: CD11bc+/HIS48neg NK-Zellen), (Dendritische CD11bc+/HIS48low Zellen. R3: (Monozvten). R4: CD11bc+/HIS48medCD4-CD8- (Neutrophile Granulozyten) und R5: CD11bc+/HIS48high (aktivierte Monozyten, Granulozyten).



Abbildung 5: Gatingstrategie der Blutproben

4.3.2 Aufarbeitung der Kapsel

Die Kapseln wurden nach der Präparation in 500 ul Kollagenase-Puffer überführt, die Gewebe-Kollagenasesuspension in eine Zellkulturschale gegeben und mit einem Skalpell zerkleinert. Daraufhin wurde die Kapsel 1 Stunde lang bei 39 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde diese in der Petrischale mit Hilfe eines Spritzenkolbens zerdrückt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen durch ein 100 µm Zellsieb gegeben, dabei wurde das Zellsieb mehrmals mit PBS bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml durchspült. Die Kapselzellsuspension wurde dreimalig zentrifugiert (400g, 8 min, 4°C) und anschließend der Überstand abgenommen und das Pellet in PBS resuspendiert. Daraufhin wurde 1 µl des Lebend-Tot Farbstoffes FVD hinzugegeben und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung der Oberflächenantikörper CD45, CD3, CD4, CD8, HIS48 und CD163. Die Fixierung und Permeabilisierung zur Färbung des intrazellulären Markers CD68 erfolgte durch Leucoperm der Firma Serotec entsprechend der Herstellerangaben. Nach der Fixierung und mit dem Schritt der Permeabilisierung wurde der Antikörper CD68 zur Suspension hinzugefügt. Nach der Inkubation über 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit wurde die Kapselzellsuspension mit PBS + 2% FCS gewaschen und folgend mit 400 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die durchflusszytometrischen Messungen am MACS Quant verwendet.

4.3.2.1 Gatingstrategie der Kapselproben

Die Anzahl der lebenden Leukozyten wird in *Counts* pro Kapsel angegeben und folgend alle Zellpopulationen auf den Anteil an lebenden Leukozyten in Prozent bezogen. Die Gatingstrategie wird in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt. Der Oberflächenmarker CD45 wurde für die Markierung von Leukozyten verwendet. Der Ausschluss von aneinander gelagerten Zellen, der sogenannten Dubletten, erfolgte über das Gating FSC.A gegen FCS.H. Die CD45 positiven Zellen wurden daraufhin auf ihre Viabilität durch den Lebend-Tot-Farbstoff FVD eFluor506 untersucht. Die lebenden CD45 positiven Zellen wurden daraufhin nach CD3

gegatet. Die CD3 positiven T-Zellen wurden zur weiteren Differenzierung nach CD4 (T-Helferzellen, NK-T-Zellen) und CD8 (zytotoxische T-Zellen, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, NK-T-Zellen) unterteilt. Bei den CD3 negativen Zellen handelt es sich um Nicht-T-Zellen die weiter nach CD68/HIS48 gegatet wurden um die Granulozyten/Monozyten von Makrophagen zu unterscheiden. Die HIS48 positiven Zellen wurden weiter nach CD4 gegatet. Die CD4 negativen Zellen wurden über den Forward- und Sidescatter in Neutrophile Granulozyten (FCSlow/SSCmed-high) und Monozyten (FCSmed/SSClow) unterteilt. Die CD4 positive Population wurde im Forward- und Sidescatter betrachtet. Hierbei konnten wiederum 2 Populationen voneinander unterschieden werden: Eosinophile Granulozyten (FSClow/SSChigh) und eine FSCmed/SSCmed Population, die weiter nach CD163 gegatet wurde. Diese Population wird fortwährend als CD68-CD163+ Population bezeichnet. Die CD68+/HIS48- Population wurde weiter nach CD68 und CD163 gegatet. Die CD68+CD163-Population wird als M1-Makrophagen und die CD68+CD163+ Population als M2-Makrophagen bezeichnet.



Abbildung 6: Gatingstrategie der Kapselproben für T-Zellen



Abbildung 7: Gatingstrategie der Kapselproben für Nicht-T-Zellen

4.3.2.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse

Die Auswertung der Daten wurde mit dem FlowJo Programm 7.6.5 der Firma Tree Star und unter der Verwendung von Excel Version 2013 der Firma Microsoft durchgeführt. Die Erstellung der Kompensation zur rechnerischen Korrektur einer möglichen Überlappung der Fluoreszenzsignale erfolgte rechnerisch sowie manuell über FlowJo auf Grundlage von Einzelfärbungen der Zellsuspensionen.

4.3.3 Zellsortierung und Zytozentrifugation zur Identifikation der Zellpopulationen

Die Identifikation der gemessenen Zellpopulationen in der Kapsel wurde anhand einer Zellsortierung mit anschließender Zytozentrifugation überprüft. Ein Zellsorter erkennt die fluoreszenzgekoppelten Oberflächen- und intrazellulären Marker und überführt die reinen Zellpopulationen anhand ihrer Fluoreszenzmarkierungen in Zentrifugenröhrchen. Die Zellsuspensionen können dann über eine Zytozentrifuge auf Objektträger überführt und zur mikroskopischen Untersuchung angefärbt werden. Dieses Verfahren wurde zur Überprüfung der gewählten Analysefenster (Gates) eingesetzt und erfolgte exemplarisch zu einzelnen Standzeiten. Die Zellsuspensionen wurden entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise aufgearbeitet und gefärbt. Die Sortierung erfolgt am Zellsorter Aria II "Calliope" im BCRT. Die Zellsuspensionen wurden nach der Sortierung 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 200 ul PBS + 2 % FCS resuspendiert. Die Zelltrichter wurden mit beschichteten Objektträgern bestückt, die 200 µl Zellsuspension in die Trichter pipettiert und entsprechend in die Zytozentrifuge platziert. Die Zentrifugation erfolgte über 5 Minuten bei 500 rpm. Die Objektträger wurden dann über Nacht an der Luft getrocknet und am Folgetag mit einer kommerziellen Diff-Quik Färbung gefärbt. Jeder Objektträger wurde jeweils 5 x über 2 sec in die Fixier- und in die beiden Färbelösungen getaucht. Danach wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gespült und wiederum über Nacht getrocknet. Die Zellen konnten anhand ihrer Morphologie mikroskopisch untersucht und unterschieden werden. Die

mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Axio Scope A1 der Firma Zeiss mit einer Vergrößerung von 1000x angefertigt.

4.3.4 Ablösen der Korrosionsprodukte zur Bestimmung der Korrosionsrate

Zur Unterbrechung des Degradationsprozesses wurden die Implantate direkt nach der Entnahme aus dem Tier in Mikrotiterplatten überführt und auf -80 °C tiefgefroren. Zum Ablösen der Korrosionsprodukte wurden die Implantate insgesamt 20 Minuten in 5 ml Chrom(VI)-oxid gebadet. Nach 10 Minuten Inkubation auf der einen Seite wurden die Implantate gewendet und weitere 10 Minuten in Chrom(VI)-oxid inkubiert. Hiernach wurden sie unter ständiger Bewegung erst 30 Sekunden in 250 ml destilliertem Wasser und dann 20 Sekunden in 50 ml 100 % Ethanol gewaschen. Es erfolgte nach dem Abdampfen der Proben unterm Abzug über 24 Stunden die Bestimmung des Gewichtsverlustes mit einer Feinwaage. Die Korrosionsrate wurde auf Grundlage folgender Formel [7] bestimmt:

 $CR = \frac{8,76*10000*\Delta GV}{A*t*\rho}.$

CR (Korrosionsrate) in mm/Jahr

 Δ GV (Gewichtsverlust) in g

A (Oberfläche) in cm²

t (Zeit) in Stunden

 ρ (Dichte) in g x cm⁻³

4.3.5 In vitro Studien zur Bestimmung der Korrosionsrate im Bioreaktor

Untersuchungen zum Korrosionsverhalten der eingesetzten Materialien MgGd10. MgGd5 und MgFe erfolgten in einem geschlossenen Bioreaktorsystem. Hierfür wurde eine Fließkammer über Schläuche und Schlauchverbindungen an eine Pumpe der Firma Ismatec angeschlossen. Die in der Fließkammer platzierten Implantate wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 10,5% Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid über 72 Stunden kontinuierlich mit HANKS- Nährmedium bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,33 ml/min umspült. Entsprechend der Volumenverhältnisse der Ratte wurde das Gesamtvolumen eines Kreislaufes auf 21 ml bemessen. Vor dem Start wurde der Bioreaktor über einer Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Extrakte wurden nach Versuchsende auf die Leitfähigkeit, den pH-Wert und die Osmolarität untersucht und mit der Baseline (Kontrollgefäß ohne Zugang zur Pumpe) verglichen (Daten werden nicht gezeigt). Auf Grundlage des Gewichtverlustes der Implantate wurde nach Ablösung der Korrosionsprodukte die Korrosionsrate nach der in Abschnitt 4.2.2. genannter Formel bestimmt.



Abbildung 8: Aufbau des Bioreaktorsystems

4.3.6 Rauigkeitsmessungen der Implantate durch mechanische Profilometrie

Für die Vermessung der Oberflächentopografie der Proben wurde die mechanische Profilometrie eingesetzt. Hierfür wurde der Hommel-Tester T2000 der Firma Hommelwerke GmbH mit der Messonde TK100 genutzt. Der Hommel-Tester T2000 fährt die Probe innerhalb eines bestimmten Messbereiches mit einer Diamantnadel ab und ermittelt verschiedene Rauigkeitsparameter. Für die verwendeten Materialien wurde der arithmetische Mittenrauwert (R_a) vor und nach der Implantation bestimmt. Der Mittenrauwert R_a ist der Mittelwert der Abweichungen vom Rauheitsprofil. Der Messbereich wurde für die Proben vor Implantation auf 2 µm und nach der Implantation auf 20 µm festgelegt. Für die Messungen der Materialien nach Implantation wurde die Standzeit 28 Tage als Zeitpunkt einer fortgeschrittenen Korrosion ausgewählt. Die Ergebnisse wurden von dem Gerät durch einen geräteigenen Drucker ausgegeben. Die Messungen am Hommel-Tester T2000 wurden im Institut für Werkstoffwissenschaften und –technologien an der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

4.3.7 Oberflächenanalyse mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Das Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie besteht in der zeilenweisen Abtastung der Probe durch einen fokussierten Elektronenstrahl. Die Bilderzeugung erfolgt durch Messung der Intensität der von der Probe emittierten Sekundärelektronen durch einen Detektor. Die aufgenommenen Signale werden in Grauwertinformationen transformiert und auf dem Bildschirm dargestellt. Es entsteht ein dreidimensionales, plastisches Abbild der topografischen Beschaffenheit der Oberfläche der Probe. Die Voraussetzung für die Messdurchführung besteht in der Leitfähigkeit der Proben. Vorteil dieser Messtechnik ist die Bilderzeugung im Nanometerbreich sowie der geringe Präparationsaufwand. Die Aufnahmen wurden am BCRT Berlin von einem Gerät des Typs JCM-6000 von der Firma Joel Inc., Japan angefertigt.

4.3.8 quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion die Amplifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Quantifizierung erfolgt durch Zugabe eines fluoreszierenden Moleküls, welches unspezifisch an die DNA bindet und das Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge an vorhandener DNA, je stärker das Fluoreszenzsignal, umso mehr PCR Produkt wurde in der Reaktion amplifiziert. Die Real-Time PCR wurde in dieser Studie zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination im umliegenden Gewebe des Implantates genutzt.

Während der Explantation der Kapsel wurde umliegendes Gewebe SC und IM aus der Unterhaut und dem Muskel entnommen. Diese Proben wurden in DNA freien Reaktionsgefäßen bis zur Aufarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

4.3.8.1 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA wurde das Gewebe auf Trockeneis pulverisiert und in 1 ml Trizol überführt. Als Positivkontrolle wurde entnommenes Gewebe mit E. coli - Bakterien verunreinigt. Das Trizolgemisch wurde mehrere Sekunden auf einem Vortexmischer vermischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurde in jede Probe 200 µl Chloroform pipettiert und diese mehrere Sekunden vermischt bis eine homogene milchige Lösung entstanden war. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C über 15 Minuten bei 11500 rpm. Die wässrige Phase wurde abpipettiert, hierbei darf die intermediäre weiße Phase nicht berührt werden. Zur RNA Präzipitation wurden die Proben mit 1,5 µl Glykogen versetzt und das Eppendorf Gefäß mehrmals invertiert. Nun wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt und die Eppendorf Gefäße wiederholt invertiert. Dies bewirkt die Zerstörung der Hydrathülle und das Ausfallen der Nukleinsäuren. Es wurde das NucleoSpin RNA Plus Kid von der Firma Macherey-Nagel GmbH & CO.KG verwendet. Die Proben wurden in ein High Filter Tube gegeben, welches in ein Collection Tube platziert wurde. Entsprechend des Protokolls wurden die Proben mehrmals mit Waschpuffer überschichtet und anschließend zentrifugiert. Das Eluiren der RNA erfolgte durch die zweimalige Zugabe von 30 µl RNAase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation. Nun lag die RNA im Collector Tube in 60 µl RNAase-freiem Wasser vor. Die RNA Konzentration und Reinheit wurde nun mit einem Nanophotometer bestimmt. Die RNA kann ab diesem Zeitpunkt bei -80 °C aufbewahrt werden.

4.3.8.2 Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription der RNA wurde diese aufgetaut, kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. 100 ng der RNA wurden mit 1 μ l Anchored-oligo(dT)-Primer, 2 μ l Random-Hexamer-Primer und 8 μ l Wasser (DEPC-H₂O) versetzt bis zu einem Gesamtvolumen von 13 μ l. Der Primer-Template-Mix wurde nun zur Denaturierung des Templates bei 65 °C 10 Minuten lang inkubiert; anschließend erfolgte die Abkühlung auf Eis. Nun wurden die restlichen Komponenten (4 μ l Transkriptor-Reverse Transkriptase Reaction Buffer, 0,5 μ l Protector RNase Inhibitor, 2 μ l Deoxynucleotide Mix, 0,5 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase) dem Primer-Template-Mix hinzugefügt bis zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die Proben wurden anschließend vorsichtig vermischt, kurz zentrifugiert und in einem Thermocycler für 10 Minuten bei 56°C, für 10 Minuten bei 25°C, für 60 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 85 °C inkubiert. Der letzte Schritt bewirkte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt.

4.3.8.3 RT - PCR

2 μ I der entstandenen cDNA wurden für die quantitative Real-Time PCR verwendet. Die Proben wurden 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Folgende Reagenzien wurden je Well in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert: 6 μ I hochreines Wasser, 2 μ I PCR Primer (Bakterien Primer Forward, Bakterien Primer Reverse, 18S Forward oder 18S Reverse) und 10 μ I Mastermix. Daraufhin wurden 2 μ I der cDNA dazugegeben. Es folgte die Zentrifugation unter Abdeckung mit Folie bei 300 rpm für 2 Minuten. Die Mikrotiterplatten wurden in den Light Cycler 480 geladen und folgendes Programm gestartet:

Programm	Prozess
10 Minuten bei 95 °C	Aktivierung
10 Sekunden bei 95 °C	Denaturierung
20 Sekunden bei 60 °C	Annelierung
30 Sekunden bei 72 °C	Elongation

 Tabelle 6: Programmbeschreibung Light Cycler 480

Die Denaturierung, Annelierung und Elongation erfolgte über 40 Zyklen.

4.3.8.4 Relative Quantifizierung

Die Auswertung erfolgte über die Methode der relativen Quantifizierung. Es wurde SYBR Green als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die Analyse der Genexpression des Zielgens erfolgte in Relation zu der Expression eines Referenzgens (Housekeeping Gen). Eukaryontische 18S ribosomale RNA wurde aufgrund des ubiquitär Vorkommen in den verwendeten Ratten-Zellen als Housekeeping Gen herangezogen [138]. Als prokaryontisches Zielgen wurde ein spezifischer Bakterienprimer verwendet [139]. Als Kontrolle wurden Gewebeproben mit E. coli Kulturen verunreinigt. Der Expressionsunterschied wurde über die $\Delta\Delta$ CP Methode bestimmt. Der relative Expressionsunterschied einer Probe wurde durch folgende Formel bestimmt: Ratio = $2^{-\Delta\Delta CP}$. Zum Vergleich der relativen Expression der Gewebeproben und der mit Bakterien verunreinigten Kontrolle wurde ein T-Test durchgeführt, ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen, bei einem p-Wert <0,01 ist von einer hohen Signifikanz und bei p-Werten <0,001 von einer höchsten Signifikanz

auszugehen. Eine Schmelzpunktanalyse wurde zur Überprüfung der Sauberkeit und zum Ausschluss unspezifischer Amplifizierungen durchgeführt.

Primer Name	Sequenz
Bakterienprimer	(Forward) 5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3'
Bakterienprimer	(Reverse) 5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3'
18s rRNA	(Forward) 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
18s rRNA	(Reverse) 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'

Tabelle 7: Darstellung der verwendeten Primersequenzen

4.3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung von Excel der Firma Microsoft und SPSS Version 24 der Firma IBM.

Zunächst wurde die Verteilung der Daten mit der Erstellung eines Streu/Punktdiagramm, Histogramm und Q-Q-Diagramm untersucht. Für das Streu/Punktdiagramm wurden der vorhergesagte Wert auf der X-Achse und das studentisierte Residuum der Variable auf der Y-Achse dargestellt. Das Histogramm wurde vom studentisierten Residuum angefertigt. Bei akzeptabler Normalverteilung wurde eine einfaktorielle Varianzanalvse (ANOVA) erstellt. Als feste Faktoren wurden das Material und die Standzeit klassifiziert. Eine Interaktion zwischen Material und Standzeit wurde bei Normalverteilung der Daten für jede Variable untersucht. Wechselwirkungen wurden nur im Modell belassen, sofern diese statistisch signifikant waren. Die Post Hoc Tests wurden nach Bonferroni durchgeführt. Bei nicht akzeptabler Normalverteilung wurde eine logarithmische Transformation der Daten untersucht. Bei weiterhin nicht annähernder Normalverteilung wurden nicht-parametrische Verfahren (Post-Hoc Test des Kruskal-Wallis-Tests) zur Auswertung verwendet. Es wurden Unterschiede zwischen den Materialien und Unterschiede zwischen den Standzeiten der einzelnen Materialien untersucht. Bei p-Werten <0.05 ist von einer Signifikanz auszugehen, bei p-Werten <0,01 ist von einer hohen Signifikanz und bei p-Werten <0,001 ist von einer höchsten Signifikanz auszugehen.

4.4 Die Arbeit anderer Doktoranden an der Forschungsreihe

Der beschriebene Versuch wurde als Hauptstudie einer Forschungsreihe mit vorgeschaltetem Pilotprojekt durchgeführt. Das Pilotprojekt wurde von der Kollegin Marie-Christin Jungmann geb. Heinze geleitet. Hierbei wurden Lewis Ratten Implantate aus Polyetherehterketon (PEEK), Polystrene (PS) und reinem Magnesium subkutan und intramuskulär über die Standzeiten 1,3,7,14,21 und 28 Tage implantiert und die Kapsel mittels der Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Das Panel bestand aus den Oberflächenantikörpern CD45, CD3, CD4, CD8, HIS48, CD117 und Dapi. In der Pilotstudie wurden Schlüsselzeitpunkte zur Charakterisierung der Fremdkörperantwort ermittelt. Die FBR durch nicht degradable Materialien (PS, PEEK) wurden mit dem degradablen Werkstoff (reines Magnesium) verglichen. PEEK wurde hierbei als Negativkontrolle eingesetzt, da es nur eine milde FBR hervorruft und PS wurde als Positivkontrolle ausgewählt. Den Ratten wurden jeweils 2 Implantate subkutan und 2 Implantate intramuskulär implantiert. Eine Seite wurde für die FACS Analyse verwendet, während die andere Seite histologisch untersucht wurde. Die histologische Arbeit innerhalb der Pilotstudie wurde von Marcel Geiling durchgeführt. In der Hauptstudie übernahm Eric Vogt die histologische Aufarbeitung. In diesem Zusammenhang wurde in der Hauptstudie eine Körperseite (SC+IM) für die FACS Analyse und die andere Körperseite (SC+IM) der Ratte für die Histologie verwendet. Auf Ergebnisse der Kollegen kann in dieser Arbeit zum Zeitpunkt der Veröffentlichung keinen Bezug genommen werden. Im Anhang befinden sich zur exemplarischen Ansicht histologische Übersichtsdarstellungen der Kapsel, die von meinem Kollegen Eric Voigt angefertigt wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie werden über Boxplots und Liniendiagramme graphisch dargestellt. Hinsichtlich der Interpretation der Liniendiagramme sollte berücksichtigt werden, dass die einzelnen Standzeiten zur besseren Darstellung des Verlaufes zu einer Linie verbunden wurden. Messpunkte zwischen den Standzeiten spiegeln keine reellen Werte wider. Liniendiagramme für das Blut mit den zugehörigen Referenzbereichen und für die Kapsel befinden sich im Anhang. Die im Folgenden beschriebenen quantitativen Verläufe der Zellpopulationen der verschiedenen Materialien beziehen sich auf die ermittelten Mittelwerte der Gruppen (n=6) zu den einzelnen Standzeiten. Im Blut wurde die Anzahl der lebenden Leukozyten in *Counts* pro Milliliter bestimmt. Die Zellpopulationen wurden quantifiziert als Anteil an lebenden Leukozyten in Prozent. Die beschriebenen Referenzwerte wurden ausgehend von 108 genommenen Blutproben aus gesunden Tieren der Pilotstudie festgelegt. In der Kapsel wird die Anzahl der lebenden Leukozyten in Prozent bezogen.

5.1.1 Blut-Leukozyten

Alle Zellpopulationen zeigen bei den verschiedenen Materialien einen ähnlichen Verlauf bezüglich der postoperativen Änderungen. Insgesamt konnten nur geringfügige Abweichungen der Mittelwerte von den physiologischen Referenzwerten gemessen werden. Zusammenfassend wurden für folgende Zellpopulationen signifikante Unterschiede zwischen den Materialien gefunden: CD3+CD8+, CD11bc+HIS48-, CD11bc-HIS48-.

Im Detail zeigte sich: die Mittelwerte der Anzahl der **lebenden Leukozyten** schwankte über den zeitlichen Verlauf von 1 bis 28 Tage zwischen 1,3 bis 2,6 x 10⁶ *Counts* pro Milliliter innerhalb des Referenzbereiches (Abb. 9).

Es ist eine Zunahme der CD3+ Population (**T-Zellen**) von 44,8% (MgFe) am Tag 1 bis Tag 7 auf 65% (MgFe) bis 67,4% (MgGd10) mit folgendem Abfall zum Tag 14 auf 60,4% (MgFe) oder weiteren Anstieg auf 71% bei MgGd5 zu verzeichnen (Abb. 9).



Abbildung 9: Boxplot der lebenden Leukozyten in *Counts*/Kapsel x 10^6 und der CD3+ Population

Der Anteil der CD3+CD4+ Population (**T-Helferzellen**) an lebenden Leukozyten beträgt an Tag 1 12,9% (MgGd5) und 31,5% (MgFe) und befindet sich unterhalb des Referenzbereiches, der Anteil der CD3+CD4+ Population für MgGd10 liegt an Tag 1 innerhalb des Referenzbereiches bei 39,6%. Ab Tag 3 bis Tag 28 schwanken die Werte für alle Materialien innerhalb des Referenzbereiches zwischen 42,5 bis 54,3% (Abb. 10).

Der Anteil der CD3+CD8+ Population (**zytotoxische T-Zellen**) an lebenden Leukozyten bewegt sich über die gesamte Zeit zwischen 12,9% (MgGd10, Tag 1) und 16,6% (MgGd5, Tag 21) innerhalb der Referenz. Ausnahmen für Werte außerhalb des Referenzbereiches sind MgFe (12,35%) und MgGd5 (36,8%) an Tag 1 (Abb. 10). Statistisch besteht ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Materialien MgGd5 und MgFe am Tag 1 (p=0,002).



Abbildung 10: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population

Die Mittelwerte des Anteils der CD3+CD4+CD8+ Population (**doppelt positive T-Zellen**) bewegt sich bei allen Materialien zwischen 0,4 und 0,7% innerhalb der Referenz (Abb. 11).

Die CD3- Population (**Nicht-T-Zellen**) umfasst an Tag 1 zwischen 44,4 (MgGd10) und 52,6% (MgFe) und nimmt über den zeitlichen Verlauf bis Tag 28 ab (28,8-34,1%). Die Anzahl der CD3- Zellen am Tag 1 bei MgGd5 und MgFe befinden sich außerhalb des Referenzbereiches (Abb. 11).



Abbildung 11: Boxplot der CD4+CD8+ und CD3- Population

Der Anteil der CD11bc+HIS48- Population (**Dendritische Zellen, NK-Zellen**) an lebenden Leukozyten befindet sich an Tag 1 (MgGd10), Tag 3 (alle Materialien), Tag 7 (MgGd5, MgGd10), Tag 14 (MgGd10, MgGd5), Tag 21 (MgGd10, MgFe) und Tag 28 (MgGd10) unterhalb des Referenzbereiches (1,0-6,08%) (Abb. 12). Es bestehen statistische Unterschiede zwischen den Materialien MgGd10 und MgFe an Tag 1 (p=0,009) sowie an Tag 7 zwischen MgGd10 und MgFe (p=0,015) und MgGd5 und MgFe (p=0,018).

Der Anteil der CD11bc-HIS48- Population (**B-Zellen**) schwankt bei allen Materialien innerhalb eines kleinen Bereiches zwischen 9,2 und 13,3% innerhalb der Referenz (Abb. 12). Es bestehen statistische Unterschiede im zeitlichen Verlauf zwischen den Materialien an Tag 3 zwischen MgGd10 und MgGd5 (p=0,020) und am Tag 21 zwischen MgGd5 und MgFe (p=0,004).



Abbildung 12: Boxplot der CD11bc+HIS48- und CD11bc-HIS48- Population

Der Anteil der CD11bc+HIS48low Population (**Monozyten**) umfasst bei allen Materialien zwischen 1,1 bis 3,5% innerhalb des Referenzbereiches (Abb. 13). Tendenziell ist eine höhere Anzahl an Monozyten bei MgFe über den Zeitverlauf von Tag 1 bis Tag 21 zu beobachten.

Der Anteil der CD11bc+HIS48medCD4-CD8- Population (**Neutrophile Granulozyten**) liegt zum Tag 1 bei allen Materialien über dem Referenzbereich (24,2-33,9%) und befindet sich im folgenden Zeitverlauf zwischen 8,5 und 16,9 % innerhalb des Referenzbereiches (Abb. 13).



Abbildung 13: Boxplot der CD11bc+HIS48low und CD11bc+HIS48medCD4-CD8- Population

Die **aktivierten Monozyten** (CD11bc+HIS48high) nehmen von Tag 1 (1,6-2,6%) zum Tag 3 (3,3-4,8%) bei allen Materialien zu und zum Tag 7 (2,0-2,7%) wiederum ab. Der folgende Verlauf bewegt sich zwischen 2,0 und 3,2% innerhalb des Referenzbereiches. Der Verlauf am Tag 3 bei MgGd5 steigt über den Referenzbereich hinaus auf 4,8% (Abb. 14).



Abbildung 14: Boxplot der CD11bc+HIS48hi Population

5.1.2 Kapsel-Leukozyten

5.1.2.1 Kapsel subkutan

In der Kapsel subkutan sind im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede zwischen den Materialien für die Parameter lebende Leukozyten, Eosinophile Granulozyten, Monozyten, M1-Makrophagen, M2-Makrophagen und der CD68-CD163+ Population nachweisbar.

Im Vergleich der Materialien ist in der Kapsel ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der lebenden Leukozyten und der Korrosionsrate zu beobachten. Je höher die Korrosionsrate über die Zeit, desto größer ist die Anzahl der lebenden Leukozyten: beim schnell korrodierenden MgFe ist die höchste Anzahl der Leukozyten, gefolgt vom MgGd5 zu verzeichnen. Die niedrigste Anzahl der Leukozyten in der Kapsel ist beim langsam korrodierenden MgGd10 zu beobachten.

Im Detail beträgt die Anzahl der lebenden Leukozyten in der Kapsel subkutan an Tag 3 im Falle von MgFe 2,49 x 10⁶ *Counts*/Kapsel bei einer Korrosionsrate von 1,0 mm/Jahr. MgGd5 degradiert am Tag 3 mit einer Geschwindigkeit von 0,74 mm/Jahr bei einer Anzahl von 2,46 x 10^{6} *Counts* Leukozyten pro Kapsel. Im Vergleich ist bei MgGd10 eine Korrosionsrate von 0,25 mm/Jahr bei einer Anzahl von 0,78 x 10^{6} *Counts* an lebenden Leukozyten pro Kapsel zu beobachten. Mit sinkender Korrosionsrate nimmt die Anzahl der lebenden Leukozyten annähernd sigmoidal ab: zum Tag 21 fällt die Korrosionsrate auf 0,16 mm/Jahr (MgGd10), 0,38 mm/Jahr (MgGd5) und 0,44 mm/Jahr (MgFe) bei einer Leukozytenzahl von 0,15 bis 0,42 x 10^{6} *Counts* (Abb. 16, Abb. 31).

Der Anteil der verschiedenen Zellpopulationen an lebenden Leukozyten im zeitlichen Verlauf unterliegt einem Wandel und ermöglicht die Einteilung in eine perakute (Tag 1), akute (Tag 3 bis 7) und chronische Phase (Tag 14 bis 28). Es bestehen Unterschiede in der Beteiligung der Zellpopulationen an den einzelnen Phasen zwischen den Lokalisationen SC und IM. Subkutan ist Tag 1 geprägt durch eine hohe Anzahl von Neutrophilen- (26-33%) und Eosinophilen Granulozyten (2-5,6%), M2-Makrophagen (24-33%) und Monozyten (3,4-7%). Zum Tag 3 ist ein deutlicher Anstieg der lebenden Leukozyten zu verzeichnen. Ab Tag 3 bis 7 dominieren weiterhin die M2-Makrophagen, die Eosinophilen Granulozyten und Monozyten sinken deutlich ab und die Neutrophilen Granulozyten sind nur noch in einer geringen Zahl nachweisbar. Der Tag 7 wird geprägt durch das Erreichen des Höchststandes an T-Zellen in der Kapsel SC. In der chronischen Phase ab Tag 14 bis 28 ist ein Anstieg der M1-Makrophagen zu beobachten, während der Anteil der M2-Makrophagen abnimmt (Abb. 15). Die CD3+CD4+ Zellen sind beteiligt an der chronischen Phase zwischen 5,1 (MgFe, Tag 14) bis 9,1% (MgGd5, Tag 14). Die Anzahl der lebenden Leukozyten sinken in der chronischen Phase auf 0,3 bis 1,1 x 10⁶ Counts/Kapsel ab (Abb. 16).



Abbildung 15: Verlaufsdiagramm der Mittelwerte des Anteils der Neutrophilen Granulozyten, CD3+ Zellen, M1- und M2-Makrophagen an lebenden Leukozyten (LL) aller Materialien über die Zeit in der Kapsel SC

Höchst signifikante Unterschiede (p<0,001) im zeitlichen Verlauf sind in der Kapsel SC beim MgFe hinsichtlich der M1-Makrophagen in einem deutlich höheren Anteil im Vergleich zu den anderen Materialien und im Falle der M2-Makrophagen in einem deutlich geringeren Anteil über die gesamte Zeit vorhanden. Eine weitere Auffälligkeit beim MgFe ist an Tag 3 zu verzeichnen, hier ist ein deutlicher Anstieg der CD68-CD163+ Population auf 14% messbar, wohingegen bei den anderen Materialien nur geringe Anteile von um die 2% nachweisbar sind. Tendenziell sind außerdem höhere Anteile an T-Zellen beim MgGd5 im Vergleich zu den anderen Materialien zu beobachten. Eine interessante Auffälligkeit besteht beim MgGd10 über den gesamten Verlauf in einer deutlich geringeren Anzahl von lebenden Leukozyten zwischen 0,2 bis 0,8 x 10^6 *Counts*/Kapsel. Höchst signifikante Unterschiede für den Parameter der lebenden Leukozyten zwischen MgFe und MgGd10 besteht über die gesamte Zeit (p<0,001).

Im Detail beträgt die Anzahl der **Leukozyten** an Tag 1 bei allen Materialien zwischen 0,3 und 0,7 x 10^6 *Counts*. Zum Tag 3 ist ein Anstieg der Leukozyten auf 2,5 x 10^6 *Counts* (MgGd5, MgFe) zu verzeichnen. Im Falle von MgGd10 steigen die Leukozyten auf 0,8 x 10^6 an. Bis zum Tag 21 und 28 sinken die Leukozyten bei allen Materialien auf ein niedriges Niveau zwischen 0,2 und 0,6 x 10^6 *Counts*/Kapsel ab (Abb. 16). Statistische Unterschiede zwischen den Materialien wurden an Tag 3, 7, 14, 21 und 28 ermittelt.

Der Anteil an CD3+ Zellen **(T-Zellen)** an den lebenden Leukozyten steigt bei den Materialien MgGd5 (14,3%) und MgFe (13,5%) zum Tag 7 an und sinkt folgend wieder ab. Bei MgGd10 ist ein unregelmäßiger Anstieg bis zum Tag 28 auf 11,3% zu beobachten (Abb. 16). Über die gesamte Zeit ist ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Materialien MgGd5 und MgFe nachweisbar (p=0,006).



Abbildung 16: Boxplot der lebenden Leukozyten in *Counts*/Kapsel x 10⁶ und CD3+ Population SC

Die CD3+CD4+ Zellen (**T-Helferzellen**) erreichen bei MgGd5 (9,8%) und MgFe (9,5%) bis zum Tag 7 den Höchststand und sinken dann folgend wieder ab (MgFe) beziehungsweise bleiben auf ähnlichem Niveau (MgGd5). Bei MgGd10 kann ein Peak zum Tag 3 (6,0%) sowie ein geringes Absinken mit folgendem Anstieg auf 8,4% zum Tag 28 beobachtet werden (Abb. 17).

Die CD3+CD8+ Population (**zytotoxische T-Zellen**) steigt von Tag 1 (weniger als 1%, alle Materialien) bis zum Tag 7 bis 1,6% (MgGd10), 3,2% (MgFe) und 3,5% (MgGd5) an und fallen folgend wieder ab (Abb. 17).



Abbildung 17: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population SC

Die CD3- Zellen (**Nicht-T-Zellen**) erreichen den Höchststand bereits an Tag 1 (95,4-96,1%) und verbleiben auf ähnlichem Niveau bis zum Tag 28 (87,4–91,2%) (Abb. 18).

Bei den **Monozyten** ist ein ähnlicher Verlauf mit einem Höchststand zum Tag 1 zwischen 3,4 und 7% bei allen Materialien sowie ein gleichmäßiges Absinken auf weniger als 0,5% von Tag 14 bis Tag 28 zu beobachten (Abb. 18). Es bestehen statistische Unterschiede zwischen den Materialien am Tag 3 (MgGd10-MgGd5 p=0,048, MgGd10-MgFe p=0,046) und 28 (MgGd10-MgFe, MgGd5-MgFe p<0,001).



Abbildung 18: Boxplot der CD3- und Monozyten SC

Die **Neutrophilen Granulozyten** erreichen den Höchststand an Tag 1 zwischen 25,5 und 32,9 % bei allen Materialien und sinken folgend auf ein geringes Niveau ab Tag 3 bis zum Tag 28 zwischen 0,02 und 0,4% ab (Abb. 19). Es bestehen keine statistischen Unterschiede zwischen den Materialien.

Die **Eosinophilen Granulozyten** sinken bei MgFe und MgGd10 im zeitlichen Verlauf gleichmäßig ab von 5,6% an Tag 1 auf 0,96% an Tag 28 (MgGd10) und von 2% an Tag 1 auf 0,05% (MgFe) an Tag 28. Im Falle von MgGd5 ist ein Anstieg von Tag 1 zum Tag 3 von 3,2 auf über 6% und nachfolgendes Absinken auf weniger als 1,2% zu verzeichnen (Abb. 19). Es bestehen statistische Unterschiede zwischen den Materialien MgGd10 und MgFe an Tag 1, 7, 14, 21 und 28.



Abbildung 19: Boxplot der Neutrophilen- und Eosinophilen Granulozyten SC

Die **M1-Makrophagen** (CD68+CD163-) steigen über den zeitlichen Verlauf langsam an auf 41,6% (MgGd10, Tag 21) und 42,1% (MgGd5, Tag 28). Im Falle von MgFe ist ein Peak am Tag 3 auf 38% messbar. Zum Tag 7 sinkt der Anteil der M1-Makrophagen bei MgFe auf 18,8% und steigt nachfolgend auf ein Niveau zwischen 43 und 52,2% wieder an (Abb. 20). Es bestehen statistisch relevante Unterschiede zwischen den Materialien an Tag 3, 14, 21 und 28.

Die **M2-Makrophagen** (CD68+CD163+) erreichen bei allen Materialien an Tag 1 bereits ein Niveau zwischen 23,9 und 36,7% und verbleiben auf hohem Niveau bis Tag 14 (MgGd5, MgGd10) zwischen 45,7 und 49,1%. Zum Tag 28 sinken die M2–Makrophagen bei MgGd10 auf 27,8 % und MgGd5 auf 30,8 % ab (Abb. 20). Es bestehen statistisch relevante Unterschiede zwischen den Materialien an Tag 3, 7, 14, 21 und 28.



Abbildung 20: Boxplot der M1- und M2-Makrophagen SC

Die **CD68-CD163+ Population** verbleibt im Falle von MgGd10 und MgGd5 auf einem niedrigen Niveau zwischen 0,2 % (MgGd5, Tag1) und 2,0 % (MgGd10, Tag 3). Bei MgFe ist ein deutlicher Peak an Tag 3 auf 14% zu verzeichnen (Abb. 21). Es besteht über die gesamte Zeit ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Materialien MgGd5 und MgFe (p<0,001) und MgGd10 und MgFe (p=0,004).



Abbildung 21: Boxplot der CD68-CD163+ Population SC

5.1.2.2 Kapsel intramuskulär

Insgesamt sind ähnliche Verläufe IM über die Zeit bei den Populationen lebende Leukozyten, T-Zellen, Neutrophile Granulozyten, M1- und M2-Makrophagen im Vergleich zu SC zu verzeichnen. Unterschiede zur Lokalisation SC besteht an Tag 1 in einer höheren Anzahl an Leukozyten pro Kapsel zwischen 0,8 bis 1,0 x 10⁶ *Counts*. Die T-Zellen erreichen ihren Höchststand IM zum Tag 14 bei 6,0 (MgGd10) und 10% (MgGd5). Der Anteil an Neutrophilen Granulozyten ist intramuskulär circa 30 % höher als subkutan, außerdem ist ein deutlich geringerer Anteil an Eosinophilen Granulozyten (0,04 bis 2,4%) zu beobachten. Der Verlauf der Monozyten intramuskulär weicht vom Verlauf subkutan ab. Intramuskulär sind ein Anstieg der Monozyten zum Tag 3 und ein nachfolgendes Absinken messbar (Abb. 22). Es bestehen intramuskulär statistische Unterschieden zwischen den Materialien für die Parameter M1-Makrophagen, M2-Makophagen und der CD68-CD163+ Population.



Abbildung 22: Verlaufsdiagramm der Mittelwerte des Anteils der Neutrophilen Granulozyten, CD3+ Zellen, M1- und M2-Makrophagen an lebenden Leukozyten (LL) aller Materialien über die Zeit in der Kapsel IM

Im Detail erfolgt ein Anstieg der **Leukozyten** zum Tag 3 bei allen Materialien sowie ein Abfall ab Tag 7 auf ein Niveau zwischen 0,13 und 0,44 x10⁶ *Counts* pro Kapsel (Abb. 23).



Abbildung 23: Boxplot der lebenden Leukozyten in Counts/Kapsel x 10^6 und der CD3+ Population IM

Bei der CD3+CD4+ Population (**T-Helferzellen**) sind geringere Anteile IM als SC am Tag 1 zwischen 0,5 und 0,8% bei allen Materialien vorhanden. Der Anteil der CD3+CD4+ Zellen nimmt über die Zeit langsamer zu als subkutan und erreicht den Höchststand an Tag 14 bei MgGd5 (7,4%) beziehungsweise an Tag 28 bei MgGd10 (6,6%) und MgFe (6%) (Abb. 24).

Ähnlich verhält sich die CD3+CD8+ Population (zytotoxische T-Zellen). Ein deutlicher Anstieg ist bei allen Materialien am Tag 1 von 0,1 (MgGd10) bis 0,3% (MgFe) zum Tag 14 auf 1,4 (MgGd10) bis 2,1% (MgGd5) zu verzeichnen (Abb. 24).



Abbildung 24: Boxplot der CD4+ und CD8+ Population IM

Die **Monozyten** weisen einen abweichenden Verlauf IM im Vergleich zu SC auf. Es erfolgt ein Anstieg von Tag 1 (1,2-1,6%) bis Tag 3 (3,8-8,8%). Besonders ausgeprägt ist der Anstieg beim MgFe. Ab Tag 7 sinkt das Niveau der Monozyten bei allen Materialien auf weniger als 1% (Abb. 25).



Abbildung 25: Boxplot der CD3- Population und der Monozyten IM

Die **Neutrophilen Granulozyten** sind IM an Tag 1 mit 59,6% (MgGd5) und 66,4% (MgFe) in einer höheren Anzahl vertreten als SC. Am Tag 14 sinken sie auf weniger als 1% ab (Abb. 26).

Die **Eosinophilen Granulozyten** sind intramuskulär weniger vertreten in der Anzahl als subkutan. Die Mittelwerte liegen bei allen Materialien über die gesamte Zeit zwischen 0,03 und 2,4%. Im Falle von MgFe ist wiederum ein Peak zum Tag 3 (2,4%) zu verzeichnen (Abb. 26).



Abbildung 26: Boxplot der Neutrophilen- und Eosinophilen Granulozyten IM

Bei den **M1- Makrophagen** besteht ein ähnlicher Verlauf IM wie SC. Nach einem geringen Anstieg auf 8,9 bis 21,2% an Tag 3 folgt ein kurzes Absinken an Tag 7 mit nachfolgendem Anstieg auf den Höchststand an Tag 21 (MgFe 61,2%, MgGd10 45,5%) und 28 (MgGd5 43%). Insgesamt besteht ein deutlich höherer Anteil an M1-Makrophagen beim MgFe über die gesamte Zeit (Abb. 27). Statistisch besteht über die gesamte Zeit ein hoch signifikanter Unterschied zwischen MgGd5 und MgFe (p=0,008) und ein signifikanter Unterschied zwischen MgGd5 und MgFe (p=0,008) und ein signifikanter Unterschied zwischen MgGd10 und MgFe (p=0,019).

Bei den **M2- Makrophagen** ist ein deutlicher Anstieg intramuskulär von Tag 1 (11,5-23,4%) bis Tag 7 (51,5-64,8%) messbar. Der Anstieg von Tag 1 zu Tag 3 ist weniger ausgeprägt im Falle von MgFe (Abb. 27). Generell besteht ein höchst signifikant niedrigerer Anteil an M2-Makrophagen im Falle von MgFe im Vergleich zu MgGd10 (p<0,001) und MgGd5 (p<0,001).



Abbildung 27: Boxplot der M1- und M2-Makrophagen IM

Die **CD68-CD163+ Zellen** verbleiben im Falle von MgGd10 und MgGd5 über die gesamte Zeit auf einem niedrigen Niveau zwischen 0,1 und 1,2%. MgFe weist einen deutlichen Peak zum Tag 3 (14,6%) auf (Abb. 28). Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied an Tag 3 zwischen MgGd10 und MgFe (p=0,020) und ein hoch signifikanter Unterschied zwischen MgGd5 und MgFe (p=0,005).



Abbildung 28: Boxplot der CD68-CD163+ Population IM

5.2 Zellsortierung & Zytospin

Die Zellsortierung ist ein durchflusszytometrisches Verfahren, welches die Möglichkeit zur Trennung der einzelnen Zellpopulationen bietet. Aus einer Zellsuspension können bis maximal 4 Populationen zeitgleich voneinander separiert werden. Die Einzelzellsuspensionen können folglich in einer Zytozentrifuge auf einen Objektträger zur lichtmikroskopischen Analyse überführt werden. Die Zellsortierung dient der Überprüfung der gewählten FACS-Gates in Bezug auf die Identität der Zellpopulationen.

In der Abbildung 29 und 30 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellen entsprechend ihrer FSC/SSC-Gates dargestellt. Die Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der Gates, der Identität der Zellen und der makroskopischen Merkmale in Zusammenhang mit den lichtmikroskopischen Bildern in 1000-facher Vergrößerung.
Tabelle 8: Makroskopische Merkmale der Zellen innerhalb der Gates

Gate	ldentität der Zellen	makroskopische Merkmale	Bildliche Darstellung
CD45+FVD-CD3+CD4+	T-Helferzellen	basophiler Zytoplasmasaum, runder Zellkern	
CD45+FVD-CD3+CD8+	Zytotoxische T-Zellen	basophiler Zytoplasmasaum, runder Zellkern	
CD45+FVD-CD3- HIS48+CD68-CD4- FSClowSSCmed-high	Neutrophile Granulozyten	segmentierter polymorpher Zellkern, schwach azidophiles Zytoplasma	0
CD45+FVD-CD3- HIS48+CD68- CD4+FSClowSSChigh	Eosinophile Granulozyten	segmentierter Zellkern, eosinophile Granula	

CD45+FVD-CD3- HIS48+CD68- CD4+FSCmedSSClow- medCD163+	Residente Makrophagen	dichter Zellkern, Granula sichtbar, spindelförmige Zellen	
CD45+FVD-CD3- HIS48+CD68-CD4- FSCmedSSClow	Monozyten	basophiles Zytoplasma, nierenförmiger Zellkern mit feiner Chromatinstruktur	
CD45+FVD-CD3- (HIS48+/dim)CD68+CD163-	M1- Makrophagen	kleiner dichter Zellkern, Granula sichtbar, kleine, runde Zellen	
CD45+FVD-CD3- (HIS48+/dim)CD68+CD163+	M2- Makrophagen	dichter Zellkern, Granula sichtbar, große polygonale Zellen	



Abbildung 29: Darstellung der mikroskopischen Bilder von T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten im FSC/SSC Gate



FSC

Abbildung 30: Darstellung der mikroskopischen Bilder der Eosinophilen Granulozyten, CD68-CD163+ Makrophagen, M1- und M2-Makrophagen im FSC/SSC Gate

5.3 Bestimmung der Korrosionsrate

5.3.1 Bestimmung der Korrosionsrate in vivo

In der Abbildung 31 sind die ermittelten Korrosionsdaten dargestellt. Im Allgemeinen nimmt die Korrosionsrate *in vivo* von Tag 1 bis zum Tag 28 ungleichmäßig ab. Über die gesamte Zeit besteht ein höchst signifikanter Unterschied zwischen MgGd10 und MgFe (p<0,001) sowie zwischen MgGd10 und MgGd5 (p<0,001). In der perakuten und akuten Phase der Fremdkörperantwort von Tag 1 bis Tag 7 bestehen Unterschiede zwischen den Materialien: signifikant ist der Unterschied intramuskulär zwischen MgGd10 und MgGd5 an Tag 3 (p=0,03), subkutan ist ein hoch signifikanter Unterschied zwischen MgGd10 und MgFe an Tag 3 (p=0,001) und an Tag 7 (p=0,006) zu verzeichnen. Die Abnahme der Korrosionsrate erfolgt im perakuten und akuten Verlauf schneller als in der chronischen Phase. In der chronischen Phase bestehen statistische Unterschiede innerhalb der Standzeiten zwischen MgGd10 und MgFe an Tag 14 (IM, p=0,003), an Tag 21 (SC, p=0,032) und an Tag 28 (SC, p=0,001; IM, p=0,003). Es sind keine statistischen Unterschiede zwischen den Lokalisationen subkutan und intramuskulär nachweisbar (p=0,229).



Abbildung 31: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der Korrosionsraten *in vivo*

5.3.2 Bestimmung der Korrosionsrate in vitro

In der Abbildung 32 sind die Mittelwerte der Korrosionsraten (n=10) der Materialien MgGd10, MgGd5 und MgFe aus den Korrosionsstudien *in vitro* dargestellt. Im direkten Vergleich der Materialien konnten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Materialien nachgewiesen werden. (p=0,104). MgGd10 degradiert im mittel mit 2,69 mm/Jahr (σ = 0,67 mm/Jahr) langsamer als MgGd5 mit 3,08 mm/Jahr (σ = 0,81 mm/Jahr). MgFe weist einen Mittelwert von 3,37 mm/Jahr (σ = 0,55 mm/Jahr) auf.



Abbildung 32: Ergebnisse der Korrosionsraten mit Standardabweichung in vitro

6.2.3 Vergleichbarkeit der In-Vivo- und In-Vitro-Korrosionsdaten

In vitro Untersuchungen über das Korrosionsverhalten von verschiedenen Materialien stellen eine Möglichkeit der Reduktion von Tierversuchen dar. Die zentrale Frage ist, ob *in vitro* Daten auf *in vivo* Verhältnisse übertragen werden können. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die Korrosionsdaten aus dem Rattenmodell vom Tag 3 SC und IM mit den *in vitro* Daten verglichen. Die exakte Übertragung von *in vitro* auf *in vivo* ist demzufolge nicht möglich. Unsere Studie hat jedoch gezeigt, dass tendenzielle Aussagen getroffen werden können. Die Korrosionsrate der eingesetzten Magnesiumlegierungen ist *in vivo* deutlich langsamer als *in vitro*. Die Größenordnungen der Verhältnisse steigen mit sinkender Korrosionsrate. In der Tabelle 9 sind die *in vivo* Korrosionsraten (CR) subkutan und intramuskulär vom Tag 3 im Vergleich zu den *in vitro* Korrosionsdaten dargestellt. Der Faktor berechnet sich aus dem Verhältnis der CR *in vitro* zur CR *in vivo* in Abhängigkeit vom Implantationsort. Die Faktoren unterscheiden sich SC und IM. Es ist nicht möglich eine einheitliche Aussage über die Abhängigkeit des Faktors vom Implantationsort zu treffen.

Material	CR in vivo		CR in vitro	Faktor SC	Faktor IM
	SC	IM		in vitro/in vivo	in vitro/in vivo
MgGd10	0,25	0,33	2,69	10,76	8,15
MgGd5	0,74	0,55	3,08	4,16	5,6
MgFe	1,00	0,69	3,37	3,37	4,88

Tabelle 9: Darstellung der Korrosionsdaten in vivo und in vitro im Vergleich

6.3 Ergebnisse der Profilometrie

Die Profilometrie trifft Aussagen über die Rauigkeit der eingesetzten Materialien. Die ermittelten Werte des arithmetischen Mittenrauwertes (R_a) sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung der Mittenrauigkeit (R_a) und der Standardabweichungen vor und nach der Implantation der Materialien

Material	R_a vor Implantation in μm	R_a nach Implantation in μm
MgGd10	0,19 ± 0,05	3,57 ± 1,4
MgGd5	0,06 ± 0,01	6,5 ± 1,71
MgFe	0,14 ± 0,06	8,83 ± 4,9

Die Rauigkeiten der Materialien vor der Implantation unterscheiden sich nicht maßgeblich. MgGd5 weist die geringste Rauigkeit vor Implantation auf, wohingegen MgGd10 die stärkste Mittenrauigkeit im Vergleich zu den anderen Materialien besitzt. Die Rauigkeiten nach Implantation weisen materialspezifische Unterschiede auf: MgGd10 weist die geringste Mittenrauigkeit auf (3,57 ± 1,4 µm), die Mittenrauigkeit von MgGd5 liegt im mittleren Bereich (6,5 ± 1,71 µm) und MgFe umfasste die stärkste Mittenrauigkeit (8,83 ± 4,9 µm). Das Maß der Veränderung der Rauigkeit korrelierte mit den ermittelten Korrosionsgeschwindigkeiten der Materialien und verdeutlicht das Vorliegen einer Lochfraßkorrosion bei den eingesetzten Materialien.

6.4 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

6.4.1 Vor der Implantation

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erlauben eine detaillierte, plastische Darstellung der Oberfläche von Probenkörpern.

6.4.1.1 MgGd10

MgGd10 weist eine glatte Oberfläche mit schollenartiger Textur auf. Kathodische punktförmige Ausscheidungen vom Gadolinium befinden sich in gleichmäßigen Abständen zueinander. Dunkle Strukturierungen sind in geringem Maße auf der Oberfläche erkennbar.



Abbildung 33 : REM - MgGd10 vor der Implantation

6.4.1.2 MgGd5

MgGd5 weist eine ebenso glatt wirkende Oberfläche mit schollenartiger Textur auf. Vereinzelt befinden sich rillenförmige Vertiefungen nebst tropfenförmigen Ausscheidungen vom Gadolinium. Dunkle Strukturierungen sind in höherem Maße als bei MgGd10 sichtbar.



Abbildung 34: REM - MgGd5 vor der Implantation

6.4.1.3 MgFe

MgFe weist eine Oberfläche mit regelmäßiger scheckiger Musterung aus dunklen Schollen auf. Eisenausscheidungen sind in geringem Ausmaß zackenförmig oder rundlich zu beobachten. In Nahsicht sind sehr feine Rillen erkennbar.



Abbildung 35: REM - MgFe vor der Implantation

6.4.2 Nach der Implantation

6.4.2.1 MgGd10

MgGd10 zeigt nach der Implantation eine unregelmäßige kraterartige Oberfläche, welche durchzogen wird von tropfenförmigen Gadoliniumausscheidungen.



Abbildung 36: REM – MgGd10 nach der Implantation

6.4.2.2 MgGd5

MgGd5 weist nach Implantation eine unregelmäßige Oberfläche auf, die bestehend aus kraterartigen Strukturen unterbrochen wird von schollenartigen Erhebungen. Vereinzelt sieht man tiefe Becken nebst steilen Erhebungen.



Abbildung 37: REM - MgGd5 nach der Implantation

6.4.2.3 MgFe

Die Oberfläche von MgFe wirkt unregelmäßig und weist schollen- und kraterartige Erhebungen sowie einzelne rundlich bis ovale Eisenausscheidungen auf.



Abbildung 38: REM - MgFe nach der Implantation

6.5 Quantitative RT-PCR

Die Methode der quantitativen Real-Time PCR wurde zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination herangezogen. Es erfolgte die relative Quantifizierung über die $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die Normalisierung wurde anhand des nicht regulierten eukaryontischen Housekeeping Gen 18s ribosomale RNA durchgeführt. Nach dem Zufallsprinzip wurden je 3 Tiere aller Standzeiten und Materialien beider Lokalisationen ausgewählt und exemplarisch als Stichprobe untersucht. P-Werte von <0,05 wurden als signifikant angenommen. Unspezifische Amplifizierungen (z.B. Primer-Dimere) wurden von der Wertung ausgeschlossen. Die relative Expression der *in vivo* Gewebeproben wurden mit der relativen Expression der kontrolliert mit E. coli verunreinigten Kapselproben (Positivkontrolle) über einen T-Test verglichen. Der p-Wert lag bei den untersuchten Proben (n=82) im hoch signifikanten Bereich (p<0,001). Eine prokaryontische Besiedlung konnte ausgeschlossen werden.



Abbildung 39: Vergleich der Mittelwerte der relativen Expression bakterieller mRNA

7 Diskussion

7.1 Akzeptanz und Integration des Implantates während der FBR

Magnesiumlegierungen stehen für den orthopädischen Einsatz aufgrund ihrer hervorragenden mechanischen Eigenschaften, guter Biokompatibilität und niedriger Zytotoxizität im Fokus der aktuellen Forschung von Biomaterialien. Aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Wahl eines geeigneten Legierungsverhältnisses zur Einstellung einer langsamen, kalkulierbaren Degradationsrate entsprechend der Knochenheilung und aleichzeitiger quter Kompensationsmöglichkeit für den Organismus hinsichtlich der freigesetzten Korrosionsprodukte. Die Annäherung an die Problematik erfolgte in dieser Studie durch die Messung eines zeitlichen Verlaufes der FBR und der damit verbundenen quantitativen Beschreibung der beteiligten Zellpopulationen.

Die erste Frage, welche an diese Studie adressiert wurde, fragt nach einer nachweisbaren, systemischen Veränderung im Blut durch die FBR nach Implantation von Magnesiumimplantaten. Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf keine nachweisbare systemische Veränderung durch die FBR nach Implantation im Blut von Magnesiumlegierungen hin. Es bestehen bei allen Materialien nur geringfügige Abweichungen von den ermittelten Referenzwerten. Es konnten keine Abweichungen bezüglich der Anzahl der Leukozyten im Blut im Sinne einer Leukozytose oder Leukopenie festgestellt werden.

Die zweite Frage befasst sich mit einem vermuteten Zusammenhang zwischen der Korrosionsrate und dem Auftreten von Leukozyten und ob hierbei eine Abhängigkeit vom Implantationsort besteht. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Korrosionsrate und der Anzahl von lebenden Leukozyten in der Kapsel, unabhängig vom Implantationsort subkutan und intramuskulär beobachtet werden. Es zeigte sich, dass eine hohe Korrosionsrate des Magnesiums eine hohe Anzahl lebender Leukozyten in der Fremdkörperkapsel bedingte.

Die dritte Frage adressierte einen zeitlichen, charakteristischen Verlauf der FBR auf Magnesiumimplantate und mögliche Unterschiede hinsichtlich der Lokalisationen. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen einen charakteristischen, zeitlichen Verlauf gegliedert in eine perakute, akute und chronische Phase, die sich nur geringfügig unterschiedlich im subkutanen oder intramuskulären Implantationsort darstellen. Die perakute Phase (Tag 1) wird geprägt von einem hohen Anteil von Neutrophilen Granulozyten und dem Anstieg von M2-Makrophagen. Subkutan sind an Tag 1 die Eosinophilen Granulozyten und Monozyten in der Kapsel vertreten. Die akute Phase (Tag 3-7) wird begleitet durch den Anstieg der lebenden Leukozyten. Die M2-Makrophagen sind in einer hohen Zahl nachweisbar. Intramuskulär steigen die Monozyten und Eosinophilen Granulozyten zum Tag 3 an. An Tag 7 erreichen die T-Zellen subkutan den Höchststand. Die folgende chronische Phase (Tag 14 - 28) ist geprägt von einem wachsenden Anteil an M1- und sinkenden Anteil an M2-Makrophagen. Die Anzahl der lebenden Leukozyten fällt in der chronischen Phase deutlich ab. Intramuskulär zeigen sich die T-Zellen in einer hohen Zahl von Tag 14 bis 28. Ab Tag 14 sind nur noch wenige Anteile Neutrophiler-, Eosinophiler Granulozyten und Monozyten nachweisbar. Diese Ergebnisse stützen den von Anderson, et al. [2] postulierten zellulären Ablauf der Fremdkörperreaktion auf Biomaterialien in einer moderaten Form.

Das Interesse der aktuellen Forschung besteht in der Bedeutung der einzelnen Zellfraktionen für die Biokompatibilität der Implantate. Die Frage nach der für den Organismus optimalen Präsenz der Zellfraktionen während der Phasen der FBR und deren Bedeutung für eine bioinerte Integrität des Biomaterials wurden in verschiedenen Studien evaluiert. Neutrophile Granulozyten sind der vorherrschende Zelltyp an der Implantatoberfläche in der perakuten

Phase (0-24 h) der FBR [3]. Bedeutend für den progressiven Verlauf ist deren initiales Auftreten zur Einleitung der phagozytotischen Vorgänge. Mit dem Scheitern der Phagozytose durch die Neutrophilen Granulozyten werden diese durch Makrophagen ersetzt. Die Aktivierung von Makrophagen legt den Grundstein für die Einleitung der chronischen Entzündungsreaktion und Fusion von Makrophagen an der Oberfläche des Biomaterials [2]. Eine verlängerte Präsenz von Neutrophilen Granulozyten im Wundbereich kann durch die Abgabe von Sauerstoffradikalen zu oxidativem Stress und einer verlängerten Wundheilung führen [140]. Makrophagen sind zuständig für die Entfernung der Neutrophilen via Phagozytose und induzieren deren Apoptose [141]. Die Phagozytose der Neutrophilen ist wiederum ein zentrales Element der Stimulation der Makrophagen zu einem Phänotypwechsel von M1- zu M2-Makrophagen [142]. Im Falle einer Störung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen konnten Khanna, et al. [143] eine verlängerte Wundheilung bei diabetischen Mäusen nachweisen. Kirk, et al. [3] untersuchten in vitro die Bedeutung von Neutrophilen Granulozyten auf die Makrophagenfusion und die Formation von FBGCs. Es konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Neutrophilen Granulozyten einen inhibierenden Effekt auf die IL-4 induzierte Makrophagenfusion und die Bildung von FBGCs haben. Die Monozytenadhäsion, Makrophagenfusion und die Dichte der FBGCs wurde negativ beeinflusst durch die Präsenz von Neutrophilen Granulozyten in der Kultur mit Monozyten.

Diese Studie belegt das Auftreten von Neutrophilen Granulozyten in der perakuten Phase am Tag 1 in höchster Konzentration, wobei intramuskulär ein 30 % höherer Gehalt im Vergleich zur subkutanen Lokalisation nachweisbar ist. Dies könnte auf eine schnellere Rekrutierung und Migration von Neutrophilen Granulozyten IM zurückzuführen sein. Ab Tag 7 sind an beiden Lokalisationen weniger als 2 % Neutrophiler Granulozyten in der Kapsel nachweisbar. M2-Makrophagen sind bereits an Tag 1 in hoher Zahl vertreten. Intramuskulär sind die Neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zu SC am Tag 3 mit einem höheren Anteil von 8 bis 15 % vertreten (SC 1,1-3,2 %). Die Erklärung für dieses Phänomen sind vermutlich die länger andauernden Abbauvorgänge durch die initial höhere Menge der Neutrophilen Granulozyten an der intramuskulären Lokalisation. Diese Ergebnisse sprechen für den progressiven Verlauf der Fremdkörperreaktion auf die eingesetzten Materialien mit einer initialen Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten, einer schnellen Aktivierung von heilungsfördernden M2-Makrophagen und der folgenden Einleitung der Apoptose der Neutrophilen Granulozyten.

7.2 Das Paradigma von M1- und M2- Makrophagen

Die Rolle der phänotypischen Variabilität von Makrophagen für die Wundheilung und Biomaterialintegration wird diskutiert. In dieser Studie standen aufgrund der technischen Voraussetzungen des FACS-Gerätes 8 Identifikationsparametern zur Verfügung. Es konnten 3 unterschiedliche Makrophagenpopulationen identifiziert werden: CD68+CD163-, CD68+CD163+ und CD68-CD163+. Die CD68+CD163- Population wurde als M1-Makrophagen, die CD68+CD163+ Population als M2-Makrophagen und die CD68-CD163+ Population als residente Makrophagen klassifiziert.

CD68 ist ein Transmembranprotein, welches im Zytoplasma und auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert wird [144, 145]. CD68 wird als Marker für Makrophagen der Ratte genutzt. Der Grad der Expression korreliert mit der phagozytotischen Aktivität einer Zelle [145]. CD163 wird auf Monozyten und Makrophagen exprimiert [146, 147]. Polfliet, et al. [148] identifizierten das ED2-Antigen als das CD163 Glykoprotein der Ratte und als Marker für reife Gewebsmakrophagen. Residente Makrophagen sind in normalem Zustand CD68- und CD163+ und exprimieren erst unter entzündlichen Bedingungen CD68 [149]. Die Expression von CD163 auf DCs [150] und hämatopoetischen Stammzellen [151] konnte gezeigt werden. Dahingegen untersuchten Palmer, et al. [152] CD163 positive Zellen auf die Expression des hämatopoetischen

Stammzellmarker CD34, wobei die Expression von CD34 auf CD163 positiven Zellen nicht bestätigt werden konnte. Demnach besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den CD68-CD163+ Zellen um DCs handelt, die aufgrund ihres Ursprunges aus Monozyten, nah verwandt mit den Makrophagen sind [153]. Die Differenzierung der DCs von Makrophagen erfolgte in dieser Studie durch das fortwährende Gating und die höhere Granularität der Makrophagen im Gegensatz zu den DCs.

Die Eigenschaften von Makrophagen werden durch das Mikroklima der Umgebung beeinflusst [154]. In der frühen Phase der FBR entwickeln sich M1-Makrophagen unter dem Einfluss von IFN-y und produzieren TNF- α , IL-6 und IL-1 β . Sie sekretieren pro-inflammatorische Zytokine und zytotoxische Faktoren. Die Faktoren, die von M1-Makrophagen sekretiert werden, sind ein wichtiger Bestandteil der Abwehrmechanismen nach einer Gewebsverletzung, jedoch wird das umliegende Gewebe durch die zytotoxischen Faktoren weitreichend geschädigt. Nach einer Gewebsverletzung produzieren Makrophagen IL-4, dies ist ein wichtiger Aktivierungsfaktor für M2-Makrophagen. M2-Makrophagen sekretieren anti-inflammatorische Faktoren (IL-10, IL-12, TGF-β) und fördern die reparative Fibrose. Das von den M2-Makrophagen sezernierte IL-10 erhöht die Anfälligkeit für Infektionen und reduziert die Funktion der M1-Makrophagen [154]. Der Einfluss der Makrophagenphänotypen auf die FBR wird diskutiert. Tidball [155] beschreibt die Entwicklung des Phänotyps von Makrophagen nach einer Muskelverletzung als ein System der frühen Invasion von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen mit dem Ziel der Beseitigung von Zelltrümmern und der folgenden Dominanz der anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zur Förderung der Wundheilung und Milderung der Entzündung. Yu, et al. [149] stellten die gemeinsame Expression von CD68+ und CD163+ (M2-Phänotyp) bei der Ratte mit Gewebereparatur in Verbindung. Die Abfolge von M1 und M2 bewirkt einen effektiven Mechanismus für die Heilung und Regeneration von beschädigtem Gewebe [155]. Auch Klopfleisch [60] postuliert die Wichtigkeit eines ausgeglichenen Verhältnisses von M1- zu M2-Makrophagen.

In dieser Studie wurde bei den langsam degradierenden Gadoliniumlegierungen MgGd10 und MgGd5 ein geringer initialer Anstieg der M1-Makrophagen SC und IM in der perakuten und akuten Phase der FBR beobachtet. Das schnell degradierende MgFe ruft einen stärkeren initialen Anstieg der M1-Makrophagen hervor. Die Vermutung für dieses Phänomen ist die schnelle Degradation und abrupte Freisetzung von Degradationsprodukten. Tendenziell sind über die gesamte Zeit ein deutlich höherer Anteil an M1-Makrophagen und ein deutlich geringerer Anteil an M2-Makrophagen beim MgFe im Vergleich zu den Gadoliniumlegierungen zu beobachten. Die verstärkte pro-inflammatorische- und reduzierte anti-inflammatorische Antwort beim MgFe könnte auf eine geringere Biokompatibilität im Vergleich zu den anderen Materialien durch die rasche Degradation zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang ist eine weitere Besonderheit im zeitlichen Verlauf beim MgFe in einem Anstieg der CD68-CD163+ Population zum Tag 3 zu beobachten. Die Vermutung ist, dass aufgrund der abweichenden M1-Reaktion beim MgFe CD68-CD163+ Makrophagen aktiviert werden, die die Heilung unterstützen sollen. Schaer [156] beschreibt die Funktion von CD68-CD163+ Makrophagen ebenso als heilungsfördernd und beobachtete die Akkumulation in verschiedenen Geweben während der Heilungsphase. Die Oberfläche der Materialien wies vor der Implantation relative glatte Strukturen (Ra zwischen 0,06 und 0,19 µm) auf. Anderson, et al. [2] sprechen den Oberflächeneigenschaften eines Biomaterials in der Regulation der FBR eine bedeutende Rolle zu. Rich, et al. [25] beobachteten das Vermögen von Makrophagen vorwiegend auf rauen Oberflächen zu akkumulieren und zu hydrophoben Substraten zu migrieren. Zu diskutieren ist eine ursächliche Verknüpfung von glatten Oberflächenstrukturen mit einem geringeren Ausmaß von Degradationsprodukten und Zelltrümmern und der moderateren M1-Reaktion in der frühen Phase der FBR. Somit könnte ein verminderter pro-inflammatorischen Reiz auf die Makrophagen ausgeübt werden. Bereits ab der perakuten Phase der FBR ist eine Reaktion der M2-Makrophagen zu beobachten. Die M1-Makrophagen steigen daraufhin tendenziell zur chronischen Phase wieder an, während

die M2-Makrophagen absinken. Landén, et al. [157] beschreiben eine mögliche Stimulation von Makrophagen während der Wundheilung zu einem reparativen M2-Phänotyp als einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz, der weiter verfolgt werden sollte. Die frühe reparative Phase der FBR in dieser Studie könnte als Zeichen einer guten Verträglichkeit der eingesetzten Materialien und der effektiven Kompensation der Degradationsprodukte durch den Organismus verstanden werden. Hypothetischen Charakter besitzt die Annahme der Entwicklung von FBGCs aus M1-Makrophagen. Somit könnte der Anstieg der M1-Makrophagen in der chronischen Phase mit der zunehmenden Ansammlung von FBGC an der Biomaterialoberfläche zusammenhängen. In histologischen Schnitten konnten jedoch zu den späten Standzeiten an Tag 21 und 28 keine FBGCs nachgewiesen werden. Exemplarische histologische Schnitte befinden sich im Anhang auf Seite 112 vom Material MgFe zu den Standzeiten 21 und 28 Tage. Im Zuge der Aufarbeitung der Zellsuspension der Kapsel wurde diese zunächst durch ein 100 µm Zellsieb und zuletzt vor der Messung am FACS-Gerät durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Die Filtrierung ist einerseits für die störungsfreie Arbeit des FACS-Gerätes unerlässlich und dient dem Schutz vor Verstopfungen. Andererseits dient dieser Schritt der Auswaschung von Epithelzellen. FBGCs konnten demnach aufgrund ihrer Größe im Zusammenhang mit den Voraussetzungen des FACS-Gerätes und der nötigen Filtrierung durchflusszytometrisch nicht erfasst werden.

Eine wichtige Limitation dieser Studie in diesem Kontext ist die exakte Identifikation der Makrophagenphänotypen über die Expression von CD68 und CD163. Eine zweifelsfreie Identifizierung der beteiligten Makrophagensubpopulationen ist über weitere Marker möglich: M1: iNOS, CD80, CCR7 und M2: CD206, MR [152]. Weiterführende Untersuchungen zur stützenden Identifikation der Makrophagensubtypen in Kombination mit unserem Versuchsaufbau und die Näherung des Einflusses der M1- und M2-Makrophagen auf die Biokompatibilität von Implantaten sollten in zukünftigen Forschungen adressiert werden.

7.3 Mikroskopische Eigenschaften der Makrophagensubpopulationen

Bisherige Ergebnisse hinsichtlich Untersuchungen zu Unterschieden in der Zellform der M1und M2-Makrophagen beschreiben die CD68+CD163- Population (M1) als kleine, runde Monozyten ähnliche Zellen und die CD68+CD163+ Population (M2) mit einer größeren und langgezogenen Form [149, 152]. Die beschriebenen mikroskopischen Eigenschaften der M1und M2-Makrophagen konnten im Zuge der Zellsortierung und Zytozentrifugation bestätigt werden. Der Hauptteil der M1-Makrophagen zeigte sich als kleine, rundliche Zellen mit kleinem dichtem Zellkern. Im Gegensatz dazu zeigten die als M2 klassifizierten Makropagen eine größere, langgezogene Form. Aktuelle Forschungen verdeutlichen eine mögliche Modifikation des Phänotyps von Makrophagen durch die Zellform. McWhorter, et al. [43] konnten demonstrieren, dass durch die Längenausdehnung der Zellen allein, ohne Stimulation durch exogene Zytokine, M2-Phänotyp-Marker auf Makrophagen exprimiert wurden und konnten die verminderte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zeigen.

7.4 Einfluss der T-Zellen auf die FBR

Lymphozyten bestimmen zu 65-85 % die Leukozytenpopulation im Blut einer Ratte [46]. Die Interaktion von T-Zellen und Makrophagen während der FBR spielt eine besondere Rolle für die Aktivierung von Makrophagen und die Formation von FBGCs [16]. Über parakrine Mechanismen steigern Lymphozyten die Adhäsion und Fusion von Makrophagen [51]. In einer Studie mit T-Zell defizienten Ratten konnte eine Verminderung der MHC-II Expression und der phagozytotischen Aktivität von Makrophagen durch die fehlende Aktivität von T-Zellen gezeigt werden. Die Bildung von Kollagen um das implantierte Material war unter diesen Bedingungen gesteigert zu beobachten [50]. Die Fibrose und fibröse Kapselbildung führt zur

Beeinträchtigung der Effizienz der Implantates und kann zum Versagen der Implantatfunktion führen [2]. Schmidt-Bleek, et al. [52] stellen die Verbindung einer verlängerten Wundheilung mit einer höheren Anzahl zytotoxischer T-Zellen her. Die Vermutung besteht hierbei, dass die Verlängerung der pro-inflammatorischen Phase zu einer zeitlichen Verzögerung des Makrophagen-Switch vom M1- zum M2-Phänotyp führt. In dieser Studie zeigte sich in der Kapsel SC ein hoch signifikant niedrigerer Anteil von CD3+ T-Zellen über die gesamte Zeit beim MgFe im Vergleich zum MgGd5 (p=0,006). Des Weiteren ist im Falle von MgFe die kräftigste Kapselbildung nach 28 Tagen im Vergleich zu den anderen Materialien zu beobachten. Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen einer geringeren Anzahl von T-Zellen und der daraus resultierenden verringerten Aktivierung von Makrophagen, verminderter MHC-II Expression und dadurch verstärkten Kapselbildung beim MgFe stellt sich, kann durch die Ergebnisse dieser Studie nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Hinsichtlich der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+) wurden in der Kapsel SC wie IM keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien nachgewiesen. Dahingegen sind im Blut ein hoch signifikant höherer Anteil an zytotoxischen T-Zellen beim MgGd5 im Vergleich zum MgFe an Tag 1 (p=0,002) messbar. Aus den Ergebnissen der aktuellen Forschung geht hervor, dass durch eine hohe Anzahl von zytotoxischen T-Zellen ebenso wie durch die ausfallende Aktivität von T-Zellen ein nachteiliger Effekt auf die Biokompatibilität von Biomaterialien entsteht. Der Einfluss der T-Zellen ist ein interessanter Aspekt zur Beeinflussung der FBR und sollte in weiteren Studien evaluiert werden.

7.5 Die Durchflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung der FBR

Diese Studie zeigt die Verlässlichkeit der Durchflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung der zellulären Fremdkörperantwort auf Biomaterialien. Die Zellpopulationen konnten abhängig von der Zeit quantifiziert werden. Die zeitlichen Abläufe bieten Raum für Vermutungen der funktionellen Zusammenhänge und Eignung der Legierungen für den medizinischen Einsatz. Die Limitation der Durchflusszytometrie liegt im nicht zweifelsfreien Nachweis der Zellpopulationen. Diese Sicherheitsschwelle konnte durch die Zellsortierung der Kapselsuspensionen mit anschließender Zytozentrifugation und mikroskopischer Beurteilung der Zellen überwunden werden. Die Annahme der Identifikation der einzelnen Zellpopulationen aus den gewählten FACS-Gates konnte somit bestätigt werden. Die Vorteile gegenüber einer immunhistologischen Aufarbeitung bestehen in der schnellen und zeitgleichen Aufzeichnung der Verschiedenen Zellpopulationen. Durch dieses hier entwickelte Panel der Durchflusszytometrie steht ein schnelles Screening der beteiligten Zellfraktionen während der Fremdkörperreaktion auf Biomaterialien zur Verfügung.

7.6 Die Perfusionsrate als maßgebliche Beeinflussung der FBR

entsprechenden Die Perfusionsrate der Lokalisationen stellt einen wichtigen Diskussionsaspekt dar. In einer Studie von Willbold, et al. [158] wurde die zelluläre Fremdkörperreaktion auf die Legierung RS66 an drei unterschiedlichen Lokalisationen: subkutan, intramuskulär und intraossär verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Immunantwort subkutan und intramuskulär stärker ist als die Antwort im Knochen. Man stellte die abschließende Vermutung auf, dass die Korrosionsrate abhängig ist vom lokalen Blutfluss und unabhängig von den Legierungseigenschaften. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Korrosionsrate vom Blutfluss könnten Aufschluss für zukünftige Untersuchungen geben, da diese durch den operativen Eingriff drastisch verändert werden. Die Studie von Willbold, et al. [158] stützt die Ergebnisse dieser Studie hinsichtlich der Vergleichbarkeit der in vivo Korrosionsraten SC und IM. Es konnten in vivo keine signifikanten Unterschiede zwischen den Korrosionsraten der beiden unterschiedlichen Lokalisationen nachgewiesen werden. Grund hierfür könnten die nicht stark abweichenden Perfusionsraten SC und IM sein. Messungen der Perfusionsrate von Willbold, et al. [158] zeigten Perfusionsraten SC von 44 ± 13 Perfusionseinheiten und IM 31 ± 8 Perfusionseinheiten im Vergleich zum Knochen bei 7 ± 4 Perfusionseinheiten. Die subkutane und intramuskuläre Implantation als wenig invasive Methode wurde in diesem Modell als Screeningtest der eingesetzten Materialien mit geringer Belastung fürs Tier eingesetzt. Die Materialien, die in diesem Modell eine gute Biokompatibilität und gute Degradation zeigten, können nun mit einem geringen Risiko für das Tier im Zielgebiet Knochen eingesetzt werden. Die intraossäre Anwendung der verwendeten Legierungen MgGd10 und MgGd5 ist nach der erfolgreichen Anwendung SC und IM der nächste Schritt im Etablierungsprozess.

7.7 Ausschluss einer bakteriellen Kontamination in Kapselproben

Eine weitere wichtige Sicherheitsschwelle des Versuchsdesigns stellt die fälschliche Beschreibung einer bakteriellen Entzündung als Fremdkörperreaktion dar. Die Abgrenzung einer Entzündungsreaktion von der ablaufenden Fremdkörperreaktion wurde durch den Ausschluss einer bakteriellen Verunreinigung im Gewebe durch Untersuchungen mittels Quantitativer-Echtzeit-PCR durchgeführt. Es erfolgte die relative Quantifizierung über die $\Delta\Delta CP$ Methode. Als Housekeeping Gen wurde 18S ribosomale RNA herangezogen [138] und als Zielgen ein spezifischer Bakterienprimer verwendet [139]. Als Positivkontrolle wurden die Gewebeproben mit E. coli Kulturen verunreinigt. In dieser Studie wurde ein System einer Positivkontrolle gewählt, welches nicht den lückenlosen Nachweis von Wundkeimen bietet, jedoch die Fragestellung nach prokaryontischer Verunreinigung beantwortet. In diesem Zusammenhang wurde E. coli aufgrund der niedrigen Humanpathogenität und einfachen Kultivierung als Positivkontrolle gewählt. Der Vergleich der relativen Expression der in vivo Gewebeproben mit der relativen Expression der verunreinigten Kapselproben (Positivkontrolle) über einen T-Test zeigte ein Ergebnis im hoch signifikanten Bereich (p<0,001). Somit konnte das Vorhandensein einer prokaryontischen Verunreinigung widerlegt und die reelle Beschreibung der zellulären FBR bestätigt werden.

7.8 Diskussion des Einflusses von Oberflächeneigenschaften und der Korrosionsgeschwindigkeit der eingesetzten Materialien auf die FBR

Das Verhalten von Zellen hinsichtlich der Adhäsion, Migration, Orientierung und Differenzierung wird maßgeblich von der Oberflächentopografie eines Implantates bestimmt [28]. Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht eine plastische Darstellung der Oberfläche der Implantate. Unterschiede der Oberflächenstrukturen werden dargestellt, die den Ablauf der FBR entscheidend beeinflussen können. Die Interpretation der Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie stützen die in vivo ermittelten Daten der Korrosionsgeschwindigkeiten der eingesetzten Materialien. Nach der Implantation und Ablösung der Korrosionsprodukte durch Chrom(VI)-oxid wirkt die Oberfläche bereits bei makroskopischer Betrachtung rauer als vor der Implantation. Auf den REM-Bildern ist eine kraterartige Oberfläche mit beckenartigen Einziehungen erkennbar. Je höher die Korrosionsrate, desto stärker stellt sich die Ausprägung der Krater auf der Oberfläche dar. Demnach kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Degradation und den Oberflächenveränderungen hergestellt werden. Beim MgFe zeigt sich die stärkste und beim MgGd10 die geringste Degradation anhand der Oberfläche. Die Gewichtsreduktion und die Veränderung der Oberfläche der Implantate belegen das Vorliegen einer Lochfraßkorrosion. Die profilometrischen Ergebnisse nach der Implantation der Materialien unterstreichen die ermittelten Korrosionseigenschaften. MgGd10 weist den geringsten Mittenrauwert (Ra 3,57 ± 1,4 μ m) und MgFe den höchsten Mittenrauwert (R_a 8,83 ± 4,9 μ m) auf. Der Mittenrauwert von MgGd5 nach Implantation liegt bei 6,5 ±1,71 µm im mittleren Bereich. Die Profilometrie zeigt vergleichbare Mittenrauwerte der Materialien vor der Implantation zwischen 0,06 \pm 0,01 μ m und 0,19 \pm 0,05 µm. Eine Limitation der Rauigkeitsmessungen durch die Profilometrie besteht aufgrund der dynamischen Entstehung einer Oxidschicht auf der Oberfläche der Probenkörper während der Korrosion. Durch die Ablösung der Korrosionsprodukte über Chrom(VI)-oxid wird diese Oxidschicht abgelöst. Die mittels der Profilometrie gemessene Oberfläche nach Chromsäurebehandlung entspricht demnach nicht dem Zustand, mit dem die Zellen ursprünglich in Kontakt getreten sind. Die Messmethodik der Profilometrie kann jedoch verlässlich als Anhaltspunkt und als Basis für reale Messwerte betrachtet werden um eine vergleichende Betrachtung und eine Abschätzung von Effekten durchzuführen.

Eine Übertragbarkeit von in vitro Korrosionsdaten auf in vivo Verhältnisse wäre von besonderem Interesse für die Forschung, um Tierversuche zu minimieren. Ergebnisse von Witte, et al. [89] zeigen, dass sich die Korrosionsgeschwindigkeiten in vivo deutlich langsamer darstellen als in vitro. Ebenso konnte in dieser Studie von Witte, et al. [89] in vitro ein entgegengesetztes Korrosionsverhalten zweier Legierungen im Gegensatz zu den in vivo Ergebnissen festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass es derzeit nicht möglich ist, in vitro Korrosionsverhältnisse direkt auf in vivo Daten zu übertragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass die in vitro ermittelten Degradationsraten nicht mit dem Korrosionsverhalten in vivo übereinstimmt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tendenzen "degradiert schneller" oder "degradiert langsamer" übertragbar sind. MgFe degradiert in beiden Modellen am schnellsten, wohingegen MaGd10 am langsamsten degradiert. Des Weiteren wurde beobachtet, dass das Verhältnis von in vitro zu in vivo Daten nicht vergleichbar ist und abhängig von der Korrosionsrate zu sein scheint. Das Verhältnis von in vitro zu in vivo Korrosionsdaten wächst mit sinkender Korrosionsrate. Geeignete Materialien für den orthopädischen Einsatz sollten ein langsames und gleichmäßiges Korrosionsverhalten aufweisen. Die Biokompatibilität von Magnesiumlegierungen ist abhängig von der Korrosionsrate und der damit verbundenen freigesetzten Menge der Degradationsprodukte [4]. MgGd10 wurde bereits aufgrund der stabilen Degradation und moderaten Veränderung von pH und Osmolarität für den orthopädischen Einsatz mit geeigneten Eigenschaften ausgezeichnet [96, 159]. Eine langsame und stabile Degradation von MgGd10 konnte in diesem Zusammenhang durch die Untersuchungen bestätigt werden.

7.9 Abschließende Betrachtung

In dieser Studie konnte ein Panel im Tiermodell etablieren werden, welches die Möglichkeit der gualitativen und guantitativen Messung eines zeitlichen Verlaufes der FBR bietet. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Korrosionsrate und dem Auftreten von lebenden Leukozyten hergestellt werden. Ein schnelles Werkzeug steht zur Verfügung, welches eine große Hilfe sein könnte, wenn es im wachsenden Feld der Magnesiummaterialien um die Fragestellung geht, ob die Legierungselemente oder die Mikrostrukturen verschiedener Zusammensetzungen einen störenden Einfluss auf die Fremdkörperreaktion haben könnten. Durch die Standardisierung des Verfahrens ist eine hohe Vergleichbarkeit gegeben und die Ergebnisse spiegeln eine reale Antwort auf die implantierten Materialien wieder. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Ratte auf den Menschen stellt eine zu beachtende Limitation dar. Aufgrund der einfachen Zucht und Haltung in Gefangenschaft und aufgrund des schnellen Erreichens der Geschlechtsreife gehören Ratten heute zu den am weitesten verbreiteten Tiermodellen in der Forschung [21]. Die Physiologie der Ratte ist der des Menschen ähnlicher als im Vergleich zur Maus [21]. Ungefähr 90 % der Gene der Ratte stimmen mit denen des Menschen überein [22]. Jedoch unterscheidet sich die Entwicklung des Immunsystems maßgeblich von der des Menschen [160]. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen sollte kritisch betrachtet werden.

Die eingesetzten Magnesium-Gadoliniumlegierungen bewirken moderate eine Fremdkörperantwort ohne einen systemisch nachweisbaren Effekt zu zeigen. Zu keiner Zeit konnte bei den Versuchstieren ein nennenswerter veränderter Allgemeinzustand verzeichnet werden. Vielzählige Forschungen weisen nur limitierte oder nicht signifikante Langzeiteffekte durch Biomaterialien nach [88, 161-165]. Magnesiumeisen kann als schnell degradierende Positivkontrolle angesehen werden, die für den medizinischen Einsatz aufgrund der zu schnellen Degradation nicht zu empfehlen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Konzentrationen von Gadolinium von 5 und 10 % in den Legierungen mit Magnesium einen nachweisbaren Effekt auf die FBR haben. Die funktionellen Zusammenhänge wurden in dieser Studie nicht weiter evaluiert und sollten in weiteren Untersuchungen thematisiert werden. Aus heutiger Sicht eignet sich MgGd10 aufgrund der langsameren und gleichmäßigeren Degradation am besten für den orthopädischen Einsatz und kann zukünftig in der intraossäre Anwendung erprobt werden.

8 Zusammenfassung

Einfluss der Korrosion von biodegradablen Metallen auf die Fremdkörperantwort

Magnesiumlegierungen spielen aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften eine bedeutende Rolle im wachsenden Feld von Biomaterialien. Die Beteiligung von Magnesium in mannigfaltige biochemische Prozesse und als natürlicher Bestandteil des Körpers reflektiert das vielversprechende Potential als Implantatmaterial. Durch die Implantation eines Medizinproduktes wird eine Fremdkörperreaktion ausgelöst, die die Endphase der Wundheilung darstellt und vorrangig durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen geprägt wird. Es ist bekannt, dass der Ablauf und die Intensität der FBR als direkte Antwort des Organismus auf biodegradable Werkstoffe im direkten Zusammenhang mit deren Biokompatibilität stehen. Die direkte Beeinflussung der beteiligten Zellpopulationen im Sinne einer bioinerten Integration der Materialien und einer nur mäßig ablaufenden FBR ist das Ziel für den medizinischen Einsatz um eine adäquate Stabilisierung eines Defektes zu ermöglichen und eine Implantatabstoßung zu verhindern. Kenntnisse über die guantitative Beteiligung der Zellpopulationen von T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen an der FBR auf ausgewählte, biodegradierbare Magnesiumlegierungen: MgGd10, MgGd5 und MgFe in Abhängigkeit von der Zeit von 1 bis 28 Tagen wurden in dieser Studie an zwei unterschiedlichen Lokalisationen (subkutan, intramuskulär) über ein durchflusszytometrisches Panel im Rattenmodell erworben. Im Blut konnten keine systemisch nachweisbaren Veränderungen als Reaktion auf die FBR festgestellt werden. Unabhängig vom Implantationsort wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Korrosionsrate der eingesetzten Materialien und der Anzahl der lebenden Leukozyten ermittelt: mit steigender Korrosionsrate wächst die Anzahl der lebenden Leukozyten in der Kapsel um das Implantat. Ein zeitlich charakteristischer Verlauf der FBR auf Magnesiumimplantate, unabhängig von der Lokalisation, entsprechend einer perakuten, akuten und chronischen Gliederung wurde beobachtet. Daten über den spezifischen zellulären Verlauf der FBR auf Magnesiumlegierungen standen zuvor nicht zur Verfügung. Wir konnten demnach nicht nur quantitative Aussagen über den Ablauf der FBR treffen, sondern auch ein standardisiertes Verfahren entwickeln, welches im wachsenden Feld der Biomaterialien die Möglichkeit bietet den zeitlich-zellulären Verlauf der FBR aufzuzeichnen. Durch die Weiterentwicklung des Verfahrens könnten zudem wichtige funktionelle Aussagen getroffen werden, die derzeit nur hypothetischen Charakter besitzen. Ein weiterer wichtiger Kernpunkt dieser Arbeit ist die vergleichende Betrachtung der zellulären FBR im Zusammenhang mit den Oberflächeneigenschaften und dem Korrosionsverhalten der eingesetzten Materialien.

9 Summary

The Influence of corrosion from biodegradable metals on the foreign body response

Due to their mechanical properties, magnesium alloys play a significant role in the growing field of biomaterials. Being a natural component of the body, the involvement of magnesium in various biochemical processes reflects the promising potential as a suitable implant material. The implantation of a medical device initiates a foreign body reaction, which is the final phase of wound healing and is predominantly characterized by macrophages and foreign body giant cells. It is known that the process and the intensity of the FBR as a direct response of the organism are directly related to the biocompatibility of biodegradable materials. For medical use the aim is direct influencing of the participating cell population for an appropriate integration of the materials. To enable an adequate stabilization of an injury and to prevent implant rejection a moderate foreign body reaction is the goal of biological responses. Knowledge about quantitative involvement of T cell, granulocyte and macrophage populations on the selected biodegradable magnesium alloys MgGd10, MgGd5 and MgFe, depending on the time of 1 to 28 days, in this study was acquired in two different locations subcutaneous and intramuscularly via a flow cytometry rat model panel. Systemic changes in blood could not be detected in response to the foreign body reaction. Regardless of the location of the implant, a direct relationship between the corrosion rate and the number of living leukocytes could be determined. As the corrosive rate increases, the number of living leukocytes in the capsule increases around the implant. A characteristic progression of the foreign body reaction to magnesium implants was observed regardless of the localization according to a peracute, acute and chronic structuring. Data on the specific pathway of the foreign body reaction to magnesium alloys were not available before. Thus, we could not only make statements about the behavior of the FBR but could also develop a standardized procedure which allows to note the chronological cellular process of the FBR. Further development of our panel could be an opportunity to make statements about functional relationships between cellular responses to biomaterials, which currently only have a hypothetical character. An important focus of this work is the comparative consideration of the cellular FBR in connection with the surface properties and the corrosion behavior of the used materials.

10 Literaturverzeichnis

- 1. Luttikhuizen, D.T., et al., Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. Tissue Eng, 2006. 12(7): p. 1955-70.
- 2. Anderson, J.M., et al., Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol, 2008. 20(2): p. 86-100.
- 3. Kirk, J.T., et al., Polymorphonuclear leukocyte inhibition of monocytes/macrophages in the foreign body reaction. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. 94a(3): p. 683-687.
- 4. Seitz, J.M., et al., Magnesium degradation products: effects on tissue and human metabolism. J Biomed Mater Res A, 2014. 102(10): p. 3744-53.
- 5. Trivedi, P., et al., Degradation behaviour of magnesium-rare earth biomedical alloys. Materials Technology, 2016. 31(12): p. 726-731.
- 6. Grillo, C.A., et al., Cellular response to rare earth mixtures (La and Gd) as components of degradable Mg alloys for medical applications. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. 117: p. 312-21.
- 7. Hort, N., et al., Magnesium alloys as implant materials--principles of property design for Mg-RE alloys. Acta Biomater, 2010. 6(5): p. 1714-25.
- 8. Witte, F., et al., Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. Current Opinion in Solid State & Materials Science, 2008. 12(5-6): p. 63-72.
- 9. Williams, D.F., On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, 2008. 29(20): p. 2941-53.
- 10. Franz, S., et al., Immune responses to implants a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomaterials, 2011. 32(28): p. 6692-709.
- 11. Anderson, J.M., Inflammatory response to implants. ASAIO Trans, 1988. 34(2): p. 101-7.
- 12. Kenneth Ward, W., A Review of the Foreign-body Response to Subcutaneouslyimplanted Devices: The Role of Macrophages and Cytokines in Biofouling and Fibrosis. Journal of diabetes science and technology (Online), 2008. 2(5): p. 768-777.
- 13. Anderson, J.M., Biological responses to materials. Annual Review of Materials Research, 2001. 31: p. 81-110.

- 14. Wilson, C.J., et al., Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. Tissue Eng, 2005. 11(1-2): p. 1-18.
- 15. Amini, A.R., et al., Short-term and long-term effects of orthopedic biodegradable implants. J Long Term Eff Med Implants, 2011. 21(2): p. 93-122.
- 16. Anderson, J.M., et al., Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. Semin Immunopathol, 2011. 33(3): p. 221-33.
- 17. Anderson, J., et al., Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. Seminars in Immunopathology, 2011. 33(3): p. 221-233.
- 18. Mantovani, A., et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol, 2004. 25(12): p. 677-86.
- 19. Broughton, G., 2nd, et al., The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 12S-34S.
- 20. Chen, E.H., et al., Cell-cell fusion. FEBS Lett, 2007. 581(11): p. 2181-93.
- 21. Iannaccone, P.M., et al., Rats! Dis Model Mech, 2009. 2(5-6): p. 206-10.
- 22. Lindblad-Toh, K., Genome sequencing: three's company. Nature, 2004. 428(6982): p. 475-6.
- 23. Khouw, I.M., et al., The foreign body reaction to a biodegradable biomaterial differs between rats and mice. J Biomed Mater Res, 2000. 52(3): p. 439-46.
- 24. Luttikhuizen, D.T., et al., Cytokine and chemokine dynamics differ between rats and mice after collagen implantation. J Tissue Eng Regen Med, 2007. 1(5): p. 398-405.
- 25. Rich, A., et al., Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. J Cell Sci, 1981. 50: p. 1-7.
- 26. Boss, J.H., et al., The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. Isr J Med Sci, 1995. 31(4): p. 203-9.
- 27. Matlaga, B.F., et al., Tissue response to implanted polymers: the significance of sample shape. J Biomed Mater Res, 1976. 10(3): p. 391-7.
- 28. Roach, P., et al., Modern biomaterials: a review bulk properties and implications of surface modifications. J Mater Sci Mater Med, 2007. 18(7): p. 1263-77.

- 29. Wennerberg, A., et al., An Animal Study of Cp Titanium Screws with Different Surface Topographies. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 1995. 6(5): p. 302-309.
- 30. Madden, L.R., et al., Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. 107(34): p. 15211-15216.
- 31. Zheng, Y., Magnesium alloys as degradable biomaterials. 2015, Boca Raton; London; New York: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- 32. Wennerberg, A., On Surface Roughness and Implant Incorporation. 1996: University of Göteborg.
- 33. Hansson, S., Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: a critical analysis. J Biomech, 2000. 33(10): p. 1297-303.
- 34. Albrektsson, T., et al., Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. Int J Prosthodont, 2004. 17(5): p. 536-43.
- 35. Yun, J.K., et al., Human monocyte/macrophage adhesion and cytokine production on surface-modified poly(tetrafluoroethylene/hexafluoropropylene) polymers with and without protein preadsorption. J Biomed Mater Res, 1995. 29(2): p. 257-68.
- 36. Xing, S., et al., Differential response to chemically altered polyethylene by activated mature human monocyte-derived macrophages. Biomaterials, 2002. 23(17): p. 3595-602.
- 37. Sethi, R.K., et al., Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE. Biomaterials, 2003. 24(15): p. 2561-73.
- 38. Marques, A.P., et al., Cytokine secretion from mononuclear cells cultured in vitro with starch-based polymers and poly-L-lactide. J Biomed Mater Res A, 2004. 71(3): p. 419-29.
- 39. Refai, A.K., et al., Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. J Biomed Mater Res A, 2004. 70(2): p. 194-205.
- 40. Brodbeck, W.G., et al., In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. J Biomed Mater Res A, 2003. 64(2): p. 320-9.
- 41. Barth, K.A., et al., The effect of surface roughness on RAW 264.7 macrophage phenotype. J Biomed Mater Res A, 2013. 101(9): p. 2679-88.

- 42. Moon, H., et al., Novel grooved substrata stimulate macrophage fusion, CCL2 and MMP-9 secretion. J Biomed Mater Res A, 2016. 104(9): p. 2243-54.
- 43. McWhorter, F.Y., et al., Modulation of macrophage phenotype by cell shape. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. 110(43): p. 17253-17258.
- 44. Chehroudi, B., et al., Bone formation on rough, but not polished, subcutaneously implanted Ti surfaces is preceded by macrophage accumulation. J Biomed Mater Res A, 2010. 93(2): p. 724-37.
- 45. Denkena, B., et al., Biocompatible magnesium alloys as absorbable implant materials - Adjusted surface and subsurface properties by machining processes. Cirp Annals-Manufacturing Technology, 2007. 56(1): p. 113-116.
- 46. Wolfensohn, S., et al., Small Laboratory Animals, in Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 2007, Blackwell Publishing Ltd. p. 233-271.
- 47. Mahlke, K., et al., Immunologie. 2005: Spektrum Akademischer Verlag.
- 48. Haas, W., et al., Gamma/delta cells. Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 637-85.
- 49. Kuhnlein, P., et al., Gamma/delta T cells in fetal, neonatal, and adult rat lymphoid organs. Dev Immunol, 1995. 4(3): p. 181-8.
- 50. van Luyn, M.J., et al., Modulation of the tissue reaction to biomaterials. II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T-cell-deficient rats. J Biomed Mater Res, 1998. 39(3): p. 398-406.
- 51. Brodbeck, W.G., et al., Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. J Biomed Mater Res A, 2005. 74(2): p. 222-9.
- 52. Schmidt-Bleek, K., et al., Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. Cell Tissue Res, 2012. 347(3): p. 567-73.
- 53. Braga, T.T., et al., Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. Front Immunol, 2015. 6: p. 602.
- 54. Gordon, S., et al., Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. Immunol Rev, 2014. 262(1): p. 36-55.
- 55. N, A.G., et al., Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. J Exp Med, 2017.

- 56. Italiani, P., et al., From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. Front Immunol, 2014. 5: p. 514.
- 57. Gordon, S., Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol, 2003. 3(1): p. 23-35.
- 58. Mills, C.D., et al., M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol, 2000. 164(12): p. 6166-73.
- 59. Ferrante, C.J., et al., Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle), 2012. 1(1): p. 10-16.
- 60. Klopfleisch, R., Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model Phenotypes, functions and markers. Acta Biomater, 2016. 43: p. 3-13.
- 61. Stein, M., et al., Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med, 1992. 176(1): p. 287-92.
- 62. Janeway, C.A., Jr., et al., Innate immune recognition. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
- 63. Mills, C.D., et al., M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. J Innate Immun, 2014. 6(6): p. 716-26.
- 64. Cote, C.H., et al., Monocyte depletion increases local proliferation of macrophage subsets after skeletal muscle injury. BMC Musculoskelet Disord, 2013. 14: p. 359.
- 65. Gordon, S., et al., Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 2005. 5(12): p. 953-64.
- 66. Parihar, A., et al., Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. J Innate Immun, 2010. 2(3): p. 204-15.
- 67. Strauss-Ayali, D., et al., Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. J Leukoc Biol, 2007. 82(2): p. 244-52.
- 68. Grau, V., et al., Monocytes in the rat. Immunobiology, 2000. 202(1): p. 94-103.
- 69. Junger, W.G., Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(16): p. 2528-40.
- 70. Nuzzi, P.A., et al., Analysis of neutrophil chemotaxis. Methods Mol Biol, 2007. 370: p. 23-36.

- 71. Hogan, S.P., et al., Eosinophils: biological properties and role in health and disease. Clin Exp Allergy, 2008. 38(5): p. 709-50.
- 72. Martinez Lalis, R., et al., Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. Braz Dent J, 2009. 20(2): p. 112-7.
- 73. Chirumbolo, S., State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve? Blood Transfusion, 2012. 10(2): p. 148-164.
- 74. Beghdadi, W., et al., Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. Front Immunol, 2011. 2: p. 37.
- 75. Avula, M.N., et al., Modulation of the foreign body response to implanted sensor models through device-based delivery of the tyrosine kinase inhibitor, masitinib. Biomaterials, 2013. 34(38): p. 9737-46.
- 76. Tsai, Y.T., et al., Optical imaging of fibrin deposition to elucidate participation of mast cells in foreign body responses. Biomaterials, 2014. 35(7): p. 2089-96.
- 77. Orenstein, S.B., et al., Effects of mast cell modulation on early host response to implanted synthetic meshes. Hernia, 2010. 14(5): p. 511-6.
- 78. Biron, C.A., et al., Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 189-220.
- 79. Stabile, H., et al., Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. Front Immunol, 2017. 8: p. 293.
- van Luyn, M.J.A., et al., Repetitive subcutaneous implantation of different types of (biodegradable) biomaterials alters the foreign body reaction. Biomaterials, 2001. 22(11): p. 1385-1391.
- 81. Khouw, I.M., et al., Inhibition of the tissue reaction to a biodegradable biomaterial by monoclonal antibodies to IFN-gamma. J Biomed Mater Res, 1998. 41(2): p. 202-10.
- 82. Vasilijic, S., et al., Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation. Cell Immunol, 2005. 233(2): p. 148-57.
- 83. Banchereau, J., et al., Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.
- 84. Mellman, I., et al., Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell, 2001. 106(3): p. 255-8.

- 85. Trinite, B., et al., A subset of cytolytic dendritic cells in rat. J Immunol, 2000. 165(8): p. 4202-8.
- 86. Saris, N.E., et al., Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin Chim Acta, 2000. 294(1-2): p. 1-26.
- 87. Jahnen-Dechent, W., et al., Magnesium basics. Clin Kidney J, 2012. 5(Suppl 1): p. i3i14.
- 88. Staiger, M.P., et al., Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. Biomaterials, 2006. 27(9): p. 1728-34.
- 89. Witte, F., et al., In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. Biomaterials, 2006. 27(7): p. 1013-8.
- 90. Feyerabend, F., et al., Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. Acta Biomater, 2010. 6(5): p. 1834-42.
- 91. Yang, K., et al., 19 Control of biodegradation of magnesium (Mg) alloys for medical applications A2 Song, Guang-Ling, in Corrosion Prevention of Magnesium Alloys. 2013, Woodhead Publishing. p. 509-543.
- 92. Kirkland, N.T., Magnesium biomaterials: past, present and future. Corrosion Engineering Science and Technology, 2012. 47(5): p. 322-328.
- 93. Janning, C., et al., Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. Acta Biomater, 2010. 6(5): p. 1861-8.
- 94. Feyerabend, F., et al., Unphysiologically high magnesium concentrations support chondrocyte proliferation and redifferentiation. Tissue Eng, 2006. 12(12): p. 3545-56.
- 95. Tian, P., et al., Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications. Regen Biomater, 2015. 2(2): p. 135-51.
- 96. Cecchinato, F., et al., Influence of Magnesium Alloy Degradation on Undifferentiated Human Cells. PLoS One, 2015. 10(11): p. e0142117.
- 97. Hamm, L.L., et al., Acid-Base Homeostasis. Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2015. 10(12): p. 2232-2242.
- 98. Wintermantel, E., et al., [Biomaterials, human tolerance and integration]. Chirurg, 1999. 70(8): p. 847-57.

- 99. Heublein, B., et al., Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? Heart, 2003. 89(6): p. 651-6.
- 100. Song, G.L., Control of biodegradation of biocompatable magnesium alloys. Corrosion Science, 2007. 49(4): p. 1696-1701.
- 101. Kuhlmann, J., et al., Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants. Acta Biomater, 2013. 9(10): p. 8714-21.
- 102. Huang, C.S., et al., Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. Free Radic Res, 2010. 44(9): p. 971-82.
- 103. Yuen, C.K., et al., Theoretical risk assessment of magnesium alloys as degradable biomedical implants. Acta Biomater, 2010. 6(5): p. 1808-12.
- 104. Facchini, P.J., et al., Adhesion of suspension-cultured Catharanthus roseus cells to surfaces: effect of pH, ionic strength, and cation valency. Biomaterials, 1989. 10(5): p. 318-24.
- 105. Meintieres, S., et al., Apoptosis may contribute to false-positive results in the in vitro micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions. Mutat Res, 2004. 560(2): p. 101-18.
- 106. Witte, F., et al., Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response. J Biomed Mater Res A, 2007. 81(3): p. 748-56.
- 107. Vormann, J., Magnesium: nutrition and metabolism. Mol Aspects Med, 2003. 24(1-3): p. 27-37.
- 108. Cunningham, J., et al., Magnesium in chronic kidney disease Stages 3 and 4 and in dialysis patients. Clin Kidney J, 2012. 5(Suppl 1): p. i39-i51.
- 109. Hashizume, N., et al., An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. Jpn J Med, 1990. 29(4): p. 368-72.
- 110. Turner, J.A., Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. Int J Womens Health, 2010. 2: p. 327-37.
- 111. Clark, B.A., et al., Unsuspected morbid hypermagnesemia in elderly patients. Am J Nephrol, 1992. 12(5): p. 336-43.
- 112. Qureshi, T., et al., Acute hypermagnesemia after laxative use. Ann Emerg Med, 1996. 28(5): p. 552-5.

- 113. Ali, A., et al., latrogenic acute hypermagnesemia after total parenteral nutrition infusion mimicking septic shock syndrome: two case reports. Pediatrics, 2003. 112(1 Pt 1): p. e70-2.
- 114. Brar, H.S., et al., Magnesium as a biodegradable and bioabsorbable material for medical implants. Jom, 2009. 61(9): p. 31-34.
- 115. Magda, D., et al., Motexafin gadolinium: a novel redox active drug for cancer therapy. Semin Cancer Biol, 2006. 16(6): p. 466-76.
- 116. Dai, Y., et al., Effects of rare earth compounds on growth and apoptosis of leukemic cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. 38(7): p. 373-5.
- 117. Ji, Y.J., et al., The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines. Biomed Environ Sci, 2000. 13(4): p. 287-92.
- 118. Kostova, I., et al., New Samarium(III), Gadolinium(III), and Dysprosium(III) Complexes of Coumarin-3-Carboxylic Acid as Antiproliferative Agents. Met Based Drugs, 2007. 2007: p. 15925.
- 119. Brambilla, S., et al., Gadolinium and lanthanum: a iatrogenic transmetallation? Clin Biochem, 2008. 41(13): p. 1029-33.
- 120. Bruce, D.W., et al., The Acute Mammalian Toxicity of Rare Earth Nitrates and Oxides. Toxicol Appl Pharmacol, 1963. 5: p. 750-9.
- 121. Haley, T.J., et al., Toxicological and pharmacological effects of gadolinium and samarium chlorides. Br J Pharmacol Chemother, 1961. 17: p. 526-32.
- 122. Myrissa, A., et al., In vitro and in vivo comparison of binary Mg alloys and pure Mg. Materials Science and Engineering: C, 2016. 61: p. 865-874.
- 123. De Rosa, S.C., et al., Beyond six colors: A new era in flow cytometry. Nature Medicine, 2003. 9(1): p. 112-117.
- 124. Baumgarth, N., et al., A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J Immunol Methods, 2000. 243(1-2): p. 77-97.
- 125. Tung, J.W., et al., Modern flow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med, 2007. 27(3): p. 453-68, v.
- 126. Hassett, J., et al., Laboratory practices in reporting flow cytometry phenotyping results for leukemia/lymphoma specimens: results of a survey. Cytometry, 1995. 22(4): p. 264-81; discussion 330.

- 127. Maecker, H.T., et al., Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. Cytometry A, 2006. 69(9): p. 1037-42.
- 128. Hulspas, R., et al., Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom, 2009. 76(6): p. 355-64.
- 129. Autissier, P., et al., Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. Cytometry A, 2010. 77(5): p. 410-9.
- 130. Monici, M., Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Biotechnol Annu Rev, 2005. 11: p. 227-56.
- 131. Mayeno, A.N., et al., Granule-associated flavin adenine dinucleotide (FAD) is responsible for eosinophil autofluorescence. J Leukoc Biol, 1992. 51(2): p. 172-5.
- 132. Capel, P.J., et al., Heterogeneity of human IgG Fc receptors. Immunomethods, 1994. 4(1): p. 25-34.
- 133. Srivastava, P., et al., Streptavidin-based quantitative staining of intracellular antigens for flow cytometric analysis. Cytometry, 1992. 13(7): p. 711-21.
- O'Gorman, M.R., et al., A rapid whole blood lysis technique for the diagnosis of moderate or severe leukocyte adhesion deficiency (LAD). Ann N Y Acad Sci, 1993. 677: p. 427-30.
- 135. Stewart, C.C., et al., Cell preparation for the identification of leukocytes. Methods Cell Biol, 1994. 41: p. 39-60.
- 136. Perfetto, S.P., et al., Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol, 2004. 4(8): p. 648-55.
- 137. Fecho, K., et al., Morphine-induced enhancement in the granulocyte response to thioglycollate administration in the rat. Inflammation, 2002. 26(6): p. 259-71.
- 138. Wijesundera, K.K., et al., M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. Exp Mol Pathol, 2014. 96(3): p. 382-92.
- 139. Horz, H.P., et al., Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol, 2005. 43(10): p. 5332-7.
- 140. Dovi, J.V., et al., Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? Thromb Haemost, 2004. 92(2): p. 275-80.

- 141. Meszaros, A.J., et al., Macrophage-induced neutrophil apoptosis. J Immunol, 2000. 165(1): p. 435-41.
- 142. Fadok, V.A., et al., Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. Journal of Clinical Investigation, 1998. 101(4): p. 890-898.
- 143. Khanna, S., et al., Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. PLoS One, 2010. 5(3): p. e9539.
- 144. Holness, C.L., et al., Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood, 1993. 81(6): p. 1607-13.
- 145. Damoiseaux, J.G., et al., Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. Immunology, 1994. 83(1): p. 140-7.
- 146. Lau, S.K., et al., CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. Am J Clin Pathol, 2004. 122(5): p. 794-801.
- 147. Moestrup, S.K., et al., CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. Ann Med, 2004. 36(5): p. 347-54.
- 148. Polfliet, M.M., et al., The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. Immunobiology, 2006. 211(6-8): p. 419-25.
- 149. Yu, E., et al., Expression of area-specific M2-macrophage phenotype by recruited rat monocytes in duct-ligation pancreatitis. Histochem Cell Biol, 2016. 145(6): p. 659-73.
- 150. Maniecki, M.B., et al., CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. Immunobiology, 2006. 211(6-8): p. 407-17.
- 151. Matthews, K.E., et al., Expression of the hemoglobin-haptoglobin receptor CD163 on hematopoietic progenitors. Stem Cells Dev, 2006. 15(1): p. 40-8.
- 152. Palmer, J.A., et al., Macrophage phenotype in response to implanted synthetic scaffolds: an immunohistochemical study in the rat. Cells Tissues Organs, 2014. 199(2-3): p. 169-83.
- 153. Hume, D.A., The mononuclear phagocyte system. Curr Opin Immunol, 2006. 18(1): p. 49-53.

- 154. Kokoshima, H., et al., Histopathological and immunohistochemical characterization of spontaneous pituitary tumors in dwarfs derived from Wistar Hannover GALAS rats. Exp Toxicol Pathol, 2016. 68(2-3): p. 191-6.
- 155. Tidball, J.G., Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. Compr Physiol, 2011. 1(4): p. 2029-62.
- 156. Schaer, D.J., The macrophage hemoglobin scavenger receptor (CD163) as a genetically determined disease modifying pathway in atherosclerosis. Atherosclerosis, 2002. 163(1): p. 199-201.
- 157. Landén, N.X., et al., Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. 73(20): p. 3861-3885.
- 158. Willbold, E., et al., Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal. Acta Biomater, 2013. 9(10): p. 8509-17.
- 159. Mostofi, S., et al., Effects of Corroded and Non-Corroded Biodegradable Mg and Mg Alloys on Viability, Morphology and Differentiation of MC3T3-E1 Cells Elicited by Direct Cell/Material Interaction. PLoS ONE, 2016. 11(7): p. e0159879.
- 160. Holsapple, M.P., et al., Species comparison of anatomical and functional immune system development. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2003. 68(4): p. 321-34.
- 161. Pihlajamaki, H.K., et al., Tissue restoration after implantation of polyglycolide, polydioxanone, polylevolactide, and metallic pins in cortical bone: an experimental study in rabbits. Calcif Tissue Int, 2010. 87(1): p. 90-8.
- 162. Pihlajamaki, H.K., et al., Long-term outcome after surgical treatment of unresolved osgood-schlatter disease in young men: surgical technique. J Bone Joint Surg Am, 2010. 92 Suppl 1 Pt 2: p. 258-64.
- 163. Sitharaman, B., et al., In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. Bone, 2008. 43(2): p. 362-70.
- 164. Usui, Y., et al., Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and boneformation acceleration effects. Small, 2008. 4(2): p. 240-6.
- 165. Witte, F., et al., Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling. J Biomed Mater Res A, 2007. 81(3): p. 757-65.

11 Anhang

Gerät	Тур	Hersteller
Automatische Pipette	Pipetboy	IBS INTEGRA Biosciences
Pipetten	Research®plus	Eppendorf
FACS Gerät	MACSQuant "Erato"	Miltenyi Biotec
FACS Gerät	Aria II "Calliope"	BD Biosciences
Brutschrank	HeraCell	Heraeus
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge	X-15R	Beckman Coulter
Feinwaage	Typ S-64	BeWA-tec
Vortexmischer	Vortexgenie2	Scientific Industries
Wärmestrahler für Tiere	S-29-04	Kerbl

OP-Tisch mit Silikonmatte	Labotect Hot Plate 062	Labotect
Schermaschine	GT410-Vega	Aesculap/BRAUN
Tierwaage	PCB1000-2	Kern & Sohn GmbH
Neubauer Kammer	0,100 mm	A. Hartenstein
Mehrkanal-Schlauchpumpe	IPC-ISM934C	Ismatec
Osmometer	OSMOMAT auto	Gonotec
pH-Meter	SevenCompact [™] pH/Ion5220	Mettler Toledo
Leitfähigkeits-Messgerät	SevenCompact [™] ConductivityS230	Mettler Toledo
Tiermaske für Inhalationsnarkosen		Medizinisch - Technische Labore am CVK der Charité
Profilometer	Hommel – Tester T2000	Hommelwerke GmbH
Nanophotometer	Nanodrop P360	Implen
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Real-Time PCR System	LightCycler®480	Roche
----------------------	--	-------------------------
Zytozentrifuge	Cytospin [™] 4 Zytozentrifuge	ThermoFisher Scientific

Tabelle 12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
50 ml Polypropylene Conical Tube 30x115	FALCON®
15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube 17x120 mm	FALCON®
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
DNA LoBindTube 1,5 ml	Eppendorf
Lithium-Heparin-Röhrchen 1,3 ml	Sarstedt
Lithium-Heparin-Röhrchen 2 ml	BD Vacutainer®

100 µm Cell-Strainer	FALCON®
40 µm Cell-Strainer	FALCON®
Zellkulturschale 100x20 mm	FALCON®
Zellkulturschale 35x10 mm	FALCON®
Skalpell No. 15, Einweg	Feather pfmmedical
Skalpell No. 11, Einweg	Feather pfmmedical
Implantate MgFe	Helmholtz-Zentrum Geesthacht
Implantate MgGd10	Helmholtz-Zentrum Geesthacht
Implantate MgGd5	Helmholtz-Zentrum Geesthacht
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer-Cap 12x75mm	FALCON®
10 ml Spritze	BD Biosciences
Pinzette aus Plastik	VITLAB

Nahtmaterial Vicryl 5-0	Ethicon
1 ml Spritzen	BD Biosciences
5 ml Spritzen	BD Biosciences
10 ml Spritzen	BD Biosciences
Abdecktuch SK 2-lagig 75x90 cm	Charité Universitätsmedizin Berlin
Glaspipette "Serological Pipet" 10 ml	FALCON®
Glaspipette "Serological Pipet" 25 ml	FALCON®
Sterican Kanülen 20G	BRAUN
Sterican Kanülen 22G	BRAUN
Sterican Kanülen 24G	BRAUN
Vlieskompressen	Charité Universitätsmedizin Berlin
Mullkompressen-Set 10x10 cm	Charité Universitätsmedizin Berlin

Sterile Handschuhe	Ansell Protects
OP Haube	Farstar medical
Mundschutz	Hartmann
Tiermarkierstifte	Edding
Klebeband	Leukoplast
Alufolie	Roth
sterile 50 ml Tubes	VWR
2-Stopper-Schläuche,ID 1.02	Ismatec
Silikonschläuche, 1mm	Roth
Luerschlauchverbinder	Roth
Minischlauchverbinder	Roth
Dualfilter 1000 µL PCR clean	Eppendorf

beschichtete Objektträger	Tharmac GmbH
Shandon [™] Einfach-Cytofunnel [™] mit weißen Filterkarten	ThermoFisher Scientific

Tabelle 13: Liste der verwendeten Reagenzien

Substanz	Hersteller
FACS-Puffer	eBioscience® - Flow Cytometry Staining Buffer Solution
Dulbecco's PBS	gibco® by lifetechnologies™
FBS Superior	Biochrom
Erylysepuffer	eBioscience® - RBC Lysis Buffer (Multi- spezies) 10x
Kollagenase P	Roche
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat	AppliChem Panreac

Desoxyribonuklease	Sigma-Aldrich
Aqua dest.	BRAUN
Medetomidinhydrochlorid (Cepetor)	Cp-pharma
Clindamycin	Ratiopharm
Tramadolhydrochlorid	Grünenthal
Natriumchlorid 0,9 %	BRAUN
Kaliumchlorid 10 %	BRAUN
Isofluran	abbvie
Augensalbe	Bepanthen
Jodhaltige Desinfektionslösung mit Alkohol	BRAUN
Jodhaltige Desinfektionslösung ohne Alkohol	BRAUN
Buprenorphin (Temgesic)	Reckitt Benckiser

Leucoperm	Serotec
Sterillium®classic pure Händedesinfektionsmittel	Bode
Ketamin	Inresa Arzneimittel
Chrom(VI)-oxid-Lösung 20 %	Bernd Kraft
Ethanol 100 %	AppliChem Panreac
HANKS-Solution	gibco® by lifetechnologies™
Trypan Blue	Sigma-Aldrich
Acetic Acid	Sigma-Aldrich
Glycerol	Fluka
Trizol Reagent	Ambion by life technologies
flüssiger Stickstoff	Linde Healthcare
RNase Away	Molecular BioProducts

NucleaSpin RNA Plus	Macherey-Nagel GmbH&Co.KG
Chloroform-d	Aldrich
Glykogen RNAgrade	Thermo Scientific
2-Propanol	Sigma
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel GmbH&Co.KG
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Diff-Quik Färbeset	Henry Schein Animal Health



Abbildung 40: Übersicht der Liniendiagramme des Blutes, Darstellung der Mittelwerte der Anzahl der lebenden Leukozyten und der Anteile der Zellpopulationen an lebenden Leukozyten (LL) mit Standardabweichung, Kennzeichnung der Referenzwerte (Minimum, Maximum)



Abbildung 41: Übersicht der Liniendiagramme der Kapsel SC, Darstellung der Mittelwerte der Anzahl der lebenden Leukozyten und der Anteile der Zellpopulationen an lebenden Leukozyten (LL) mit Standardabweichung



Abbildung 42: Übersicht der Liniendiagramme der Kapsel IM, Darstellung der Mittelwerte der Anzahl der lebenden Leukozyten und der Anteile der Zellpopulationen an lebenden Leukozyten (LL) mit Standardabweichung



Abbildung 43: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes einer Kapsel, MgFe Standzeit 21 Tage, HE, 20x



Abbildung 44: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes einer Kapsel, MgFe Standzeit 28 Tage, HE, 20x

12 Publikationen

Krummsdorf S, Schreiber A, Beutler C, Schmidt T, Witte F. The effect of biodegradable metals degradation on the foreign body response. Conference Abstract. 9th Biometal Symposium on biodegradable metals for biomedical applications. eCM Journal, in press.

Schmidt T, Heinze MC, Krummsdorf S, Kronbach Z, Kleemann C, Witte F. Charakterisierung der Fremdkörperantwort auf permanente und magnesiumbasierte, biodegradable Implantate mittels Durchflusszytometrie. Meeting Abstract, veröffentlicht am 10.10.2016. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2016), Berlin, 25. - 28.10.2016.

Schmidt T, Heinze MC, 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. *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress.* doi: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.01650

Heinze MC, Schmidt T, Kronbach Z, Krummsdorf S, Geiling M, Witte F. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) as a tool to quantify the immune cell response to intramuscular implanted materials in rats. Poster. JWI Retreat 2015.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem humanmedizinischen Doktorvater Prof. Dr. Frank Witte für die stetige Unterstützung und gute Betreuung bedanken. Herzlichen Dank für die motivierenden Gespräche und den regelmäßigen Austausch. Ebenso danken möchte ich meinem veterinärmedizinischen Doktorvater Prof. Dr. Ralf Einspanier aus dem Institut der Veterinär - Biochemie für die Unterstützung der Fortführung meiner Arbeit. Dr. Tanja Schmidt möchte ich hiermit besonders danken für die gute Einarbeitung und Heranführung an die Thematik, für den Beistand und die stetige Ermunterung. Anzelika Schreiber möchte ich danken für die Unterstützung, für den Wissensaustausch und die Hilfe in kniffligen Situationen. Besonderer Dank gilt dem gesamtem Team der AG Witte des BCRT Berlin (Marie-Christin Jungmann geb. Heinze, Marcel Geiling, Claudia Beutler, Dr. Katja Reiter, Zheni Zaka, Zienab Kronbach, Romina Amberg, Sarah Schkölziger) für die Hilfeleistungen und den Zusammenhalt in der Zeit der Promotion. Ein großer Dank geht an Desiree Kunkel und Sarah Warth für die Nutzung des Flow Cytometry Labors im BCRT Berlin und die stetige Unterstützung bei Fragestellungen rund um die Durchflusszytometrie. Frau Dr. Fransziska Schmidt des Institut für Werkstoffwissenschaften und -technologien – Keramische Werkstoffe möchte ich danken für die Unterstützung bei den Messungen für die Profilometrie. Frau Dr. Roswitha Merle aus dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie möchte ich für die Beratung bei der statistischen Aufarbeitung meiner Ergebnisse danken. Meinen Eltern und Stiefeltern möchte ich herzlich danken für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Meinen lieben Großmüttern Anni Krummsdorf und Bärbel Köhler möchte ich für den stetigen Zuspruch und die offenen Ohren danken. Meinem Großvater Prof. Dr. Albrecht Krummsdorf danke ich für die Inspiration für diese Arbeit mit dem Wunsch in die großen Fußstapfen zu treten. Der größte Dank gilt meinem Freund Jonathan Krause, der mich in den vergangenen Jahren durch Höhen und Tiefen begleitet hat und mir mit Rat und Tat beiseite stand.

14 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.

Susann Krummsdorf

Berlin, den 19.02.2018