In vivo-Untersuchung zum Einwachsverhalten eines neuen Polymers im Mausmodell unter dem Aspekt der T-Zell Defizienz

EVA ENGELHARDT



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Zentralinstitut für Biomedizinische Technik Arbeitsbereich Biokompatible Materialien der Universität Ulm

Betreuer: Herr Prof. Dr. M. Reinacher

In vivo-Untersuchung zum Einwachsverhalten eines neuen Polymers im Mausmodell unter dem Aspekt der T-Zell Defizienz

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Eva Engelhardt, geb. Binzen

Tierärztin aus Zell/Mosel

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. Klaus H. Bonath

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2009

INHALTSVERZEICHNIS

I Einleitung

II. Literaturübersicht	8
1. Polymere als Biomaterial	8
1.1. Einteilung und Verwendung	8
1.2. Oligo-(ɛ-hydroxycaproat), Butylacrylat	10
1.3. Biokompatibilität	12
2. Das Tiermodell	13
2.1 Die congenital athymische Maus	14
2.2. T-Lymphozyten bei der congenital athymischen Maus	14
2.3. Makrophagen und MHC II-Komplex bei der congenital athymischen Maus	15
2.4. Nachweis von Makrophagen und MHC II-Komplex mittels Immunhistologie	15

1

6

3. Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und Organismus	17
3.1. Allgemein	17
3.2. Speziell: spezifische Immunantwort und T-Lymphozyten	20
3.2.1 T-Lymphozyten und Wundheilung	21
3.2.2. Biomaterialien und Allergie Typ IV	25
3.2.3. T-Lymphozyten und aseptische Lockerung sowie Osteolyse	26
3.3. Biomaterialien: fremdkörperassoziierte Tumorbildung	27
4. Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen	28
4.1. Doppelbrechung von Kollagen	28
4.2. Selektive Anfärbung: Trichromfärbung nach Masson-Goldner	30
5. pH-Wert im Implantatlager	31
6. Endotoxin-Nachweis (LAL-Test)	32

1

III Material	33
1. Versuchstiere	33
1.1. Maus	33
2. Polymer	34
IV Methoden	35
1. Subkutane Implantation der Polymerproben	35
1.1. OP-Vorbereitung	35
1.2. OP-Durchführung	35
1.3. OP-Nachsorge	36
2. Explantation	36
2.1. Probenbearbeitung	38
2.1.1. Periimplantäres Gewebe	38
2.1.2. Polymer	38
2.1.3. Lichtmikroskopische Untersuchung der Polymerproben	38
3. Anfertigung histologischer Präparate	39
3.1. Periimplantäres Gewebe	39
3.1.1. Objektträgerbeschichtung	39
3.1.2. Erstellung von Kryostatschnitten	39
3.2. Polymerproben	39
3.2.1. Paraffineinbettung	39
3.2.2. Schneiden der Paraffinblöcke	39
4. Immunhistologische Färbungen	40
4.1. Gefrierschnitte	40
4.1.1. Neu Fuchsin Färbelösung	40
4.1.2. Kontrollschnitte	40
4.2. Polymer	41

4.2.1. Entparaffinierung und Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung	41
4.2.2. Entparaffinierung und Trichromfärbung nach Masson-Goldner	41
5. Histologische/Immunhistologische Auswertung	42
5.1. Auswahl der Präparate	42
5.1.1. Gefrierschnitte	42
5.1.2. Polymer	42
5.2. Aufnahme der Bilder	42
5.2.1. Gefrierschnitte	42
5.2.2. Polymer/Paraffinschnitte	43
6. Optical Coherence Tomography (OCT) Messung	45
7. Endotoxin-Nachweis (LAL-Test)	46
8. Statistik	46
V Ergebnisse	47
1. Klinische Ergebnisse und Einheilung des Polymers	47
1.1. Allgemeine klinische Beobachtungen	47
1.2. Makroskopische Beschreibung des Implantatlagers	47
1.3. Festigkeit des Polymers im Implantatlager	47
2. Polymer	49
2.1. Makroskopische Beobachtung	49
2.2. Lichtmikroskopische Beobachtung	49

3. Da	arstellung histologischer Ergebnisse	51
3.1.	H.E. Färbung der Paraffinschnitte des Polymers	51
3.1.1	. Periimplantäres Gewebe	51
3.1.2	. Doppelbrechende Kollagenfasern im periimplantären Gewebe	51
3.1.3	. Aufrauhung des Polymerrrandes	52
3.2.	Trichromfärbung nach Masson-Goldner	53
3.3.	Nachweis von Makrophagen und MHC II-Komplex mittels Immunhistologie	53
3.4.	Isolierte Polymerpartikel im periimplantären Gewebe	54
4. Oj	otical Coherence Tomography (OCT) Messung	55
5. pH	I-Wert im Implantatlager	55
6. En	ndotoxin-Nachweis (LAL-Test)	55
VI D	iskussion	56
1. Tie	ermodell und Implantationsmethode	57
2. Int	egration des Polymers (Wechselwirkung Gewebe-Implantat)	59
3. Pe	riimplantäre Mikrovaskularisation	63
4. Ze	lluläre Reaktionen auf das Polymer	66
4.1 P	olymer und isolierte Polymerpartikel	69
5. pH	I-Wert im Implantatlager	71
6. Po	lymere Biomaterialien: Nutzen und Risiken	73
VII 2	Zusammenfassung	75
VIII	Summary	77
IX A	bkürzungen	79

X Literaturverzeichnis	82
XI Anhang	98
Material	98
Methoden	103
Tabellen	106
Abbildungen	122
XII Danksagung	132
XIII Eigene Publikationen und Vorträge	134
XIV Erklärung	134

I Einleitung

Biomaterialien finden in der Human- und Tiermedizin eine große Anwendung. Sie werden beispielsweise in Form von Zahnfüllungen, chirurgischem Nahtmaterial, künstlichen Gelenken und Gefäßprothesen eingesetzt. Zu den synthetischen Biomaterialien gehören die Polymere. Sie werden in medizinischen Bereichen wie der Chirurgie (Suh, 1998), im Tissue Engineering (Langer et al., 1993) oder der Pharmakotherapie (Controlled Drug Delivery) (Langer, 1995) eingesetzt. Je nach Funktion und Anwendungsbereich kommen biokompatible und langsam abbaubare Polymere zum Einsatz oder solche, die nur kurzfristig eine Funktion übernehmen sollen und schneller abgebaut werden. Implantate, die für lange Zeit und dauerhaft eine bestimmte Funktion übernehmen sollen, wie beispielsweise Hüftprothesen, sind in diesem Sinne nicht gezielt abbaubar, können aber durch Verschleiß, Abrieb oder Korrosion entstandene Materialpartikel abgeben und so an Substanz verlieren (Tang et al., 1995; Thomas et al., 2000; Singh et al., 2007).

Ein Biomaterial, das als Implantat im medizinischen Gebrauch eingesetzt werden soll, muss biokompatibel sein. Die Biokompatibilität beschäftigt sich mit den Interaktionen, die zwischen dem Biomaterial und dem Wirtsgewebe stattfinden (Remes et al., 1992; Tang et al., 2005). Biokompatibilität beschreibt ein Biomaterial bezüglich der Gewebsreaktionen nach einer Implantation als nicht pyrogen, zytotoxisch, antigen, mutagen, karzinogen oder teratogen (Suh,1998). Die Biokompatibilität berücksichtigt chemische, physikalische, biologische und morphologische Wechselwirkungen des Biomaterials mit dem umgebenden Gewebe.

Die Gewebekompatibilität eines Materials ist das Resultat komplexer Interaktionen im Organismus. Die Wechselwirkungen mit dem Gewebe sind abhängig von der Mikroarchitektur (porös, nicht porös), den physiko-chemischen Eigenschaften (hydrolytischer Abbau, enzymatischer Abbau) und der lokalen Umgebung des Polymers (Sieminski et al., 2000)

Eingebrachte Biomaterialien beeinflussen die lokale Umgebung und das biologische System in komplexer Weise (Remes et al., 1992). Die Reaktionen, die ein Biomaterial im Organismus hervorrufen kann, reichen von Abstossung bis zu Biokompatibilität mit einer milden Fremdkörperreaktion oder von einer fibrösen Einkapselung bis hin zur Biointegration mit dem Wachstum von nativem Gewebe auf der Oberfläche oder in die Poren des Materials (Morehead et al., 1994; Tang et al., 1995, 1999, 2005).

Die Reaktion des Organismus auf ein Biomaterial hängt auf der einen Seite vom Biomaterial (Anderson 1988; Sieminski et al., 2000; Parker et al., 2002; Anderson et al., 2008) und auf der anderen Seite vom Wirt ab. Von Seiten des Wirtes wird sie in hohem Maße durch seine humorale und zelluläre Immunantwort bestimmt. Dabei spielen auch die T-Lymphozyten des Immunsystems eine wichtige Rolle. T-Lymphozyten sind an Prozessen wie der Wundheilung, Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung, Allergie, Bone Remodelling, Atherosklerose und der Tumorbildung beteiligt (Blotnick et al., 1994; Park et al., 2004). Auch beim Einsatz von Biomaterialien können sie eine Rolle spielen. Sie sind wahrscheinlich beteiligt an der allergischen Unverträglichkeitsreaktion auf Implantatmaterialien (Thomas et al., 2000; Thomas 2003) und an der Osteolyse um und aseptischen Lockerung von Knochenimplantaten (Arora et al., 2003; Goodman, 2007)

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Biokompatibilität und der Gewebeintegration eines neuen elastischen, glatten, langzeitstabilen Polymers im Tiermodell unter dem Aspekt der T-Lymphozyten Defizienz. Dazu wurden runde Polymerscheiben subkutan in die congenital athymische NMRI nu/nu Maus und den entsprechenden immunkompetenten Auszuchtstamm implantiert. Nach Implantationszeiten von bis zu 9 Wochen wurden die Polymerproben und das periimplantäre Gewebe explantiert und histologisch aufgearbeitet. Dabei wurde besonders auf eine mögliche Integration in das umgebende Gewebe und auf Abriebpartikel und immunologische Reaktionen im periimplantären Gewebe geachtet. Ergebnisse, die in einer T-Lymphozyten defizienten Mauspopulation erzielt werden, könnten als T-Lymphozyten unabhängiger Prozess betrachtet werden.

II Literaturübersicht

1. Polymere als Biomaterial

1.1. Einteilung und Verwendung

Biomaterialien finden in der Human- und Tiermedizin eine große Anwendung. Verwendet werden dafür anorganische Materialien wie Keramik, Glas und metallische Legierungen, organische Materialien wie Kollagen und synthetische Materialien wie Polymere (Suh, 1998; Lendlein, 1999; Neffe et al., 2007). Es gibt mehrere Definitionen für den Begriff des Biomaterials. Die European Society for Biomaterials (ESB) definierte in der Konferenz von 1991 ein Biomaterial folgendermaßen: "A biomaterial is any material intended to interact with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function in the body." (Doherty, 1991). In unserem Institut wird ein Biomaterial definiert als ein körperfremdes Material, das in einen Organismus eingebracht wird, an einen Organismus herangebracht wird oder über die Körperflüssigkeiten mit dem Organismus in Kontakt steht.

Synthetische Biomaterialien sind die Polymere. Bereits 1937 wurde Poly-(methylmethacrylat) (PMMA) in die Zahnmedizin eingeführt. 1958 wurde die Herstellung einer Arterienprothese aus Poly(ethylenterephtalat) (Dacron) beschrieben und in den sechziger Jahren wurde eine Hüftgelenksprothese produziert, deren Kopf aus rostfreiem Stahl bestand, der in eine Azetabelumpfanne aus Polyethylen gesetzt wurde. Die Prothese wurde mit PMMA fixiert. Die ersten resorbierbaren Fäden als chirurgisches Nahtmaterial wurden 1962 von American Cyanamid Co. aus Polyglycolid hergestellt und kamen 1970 unter dem Handelsnamen Dexon auf den Markt. Seit 1975 wird Vicryl, ein Copolyester, von Ethicon Inc. produziert (Suh, 1998). Die Liste der heutigen Anwendungen für Polymere im Medizinbereich ist umfangreich.

Im Bereich des internen Wundverschlusses und Weichgewebeersatzes haben sich abbaubare biokompatible Polymere fest etabliert (Suh, 1998; Urry et al., 1998; Weigel et al., 2006). Weiterhin finden Polymere in der Medizin Anwendung als chirurgische Implantate, beispielsweise als Schrauben, Nägel und Klemmen.

Tabelle 1 (Anhang) zeigt verschiedene Anwendungsgebiete von polymeren Biomaterialien.

Eine weiteres Anwendungsgebiet für polymere Biomaterialien ist das Tissue Engineering (Langer et al., 1993; Patel et al., 1998; Weigel et al., 2006). Das Ziel dieser Technologie besteht darin, neues, funktionelles, lebendes Gewebe, beispielsweise Binde- und Epithelgewebe, unter Verwendung von kultivierten Zellen zu erzeugen. Das neue Gewebe wird dabei durch die Besiedelung einer polymeren Matrix oder eines porösen Polymergerüstes mit spezifischen Zellen außerhalb des Körpers hergestellt und dann implantiert bzw. inkomplett implantiert und dann in vivo komplettiert. Das polymere Gerüst bestimmt die dreidimensionale Form des Gewebes und soll abgebaut werden, während Zellen einwachsen (Minuth et al., 1998; Zdrahala et al., 1999; Chen et al., 2005). So könnten beispielsweise tubuläre Strukturen wie die Speiseröhre ersetzt werden (Langer et al., 1993, 2000; Zhu et al., 2006).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit für polymere Biomaterialien besteht im Rahmen des "Controlled Drug Delivery". Darunter versteht man die kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen über eine bestimmte Zeit. Dabei werden Arzneistoffe in Polymere eingebaut oder als Polymer-Arzneistoff-Pellet eingesetzt, aus denen der Wirkstoff allmählich abgegeben wird (Beispiel Kontrazeptiva) (Langer, 1995; Karp et al., 2007).

Die Anforderungen, die an ein Biomaterial gestellt werden, werden von der Anwendung bestimmt. Wichtige Charakteristika eines Biomaterials sind die mechanischen Eigenschaften, die Abbaugeschwindigkeit und das Abbauverhalten, die Bioverträglichkeit und ihre Funktionalität (Lendlein, 2002; Kelch et al., 2007).

Die Anwendung eines Biomaterials kann über kürzere oder längere Zeiträume erfolgen. Für den längerfristigen oder dauerhaften Einsatz benötigt man je nach des Funktion des Biomaterials biokompatible und langsam bzw. nicht abbaubare Materialien. Das Material übernimmt in diesem Fall für lange Zeit eine entsprechende Körperfunktion. Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylenterephtalat (PET), Silikone und ultrahoch-molekulares Polyethylen werden als solche Biomaterialien beispielsweise als Gefäßimplantate, in Herzklappen, in Knie- und Hüftgelenken eingesetzt. Bei kurzfristiger Anwendung soll das Material nur für einen begrenzten Zeitraum eine bestimmte Funktion übernehmen. Dazu werden biokompatible und in kürzerem Zeitraum biodegradierbare Polymere benötigt. Zu den schneller abbaubaren Polymeren zählen beispielsweise die Polyhydroxycarbonsäuren und bioabbaubare Polymernetzwerke aus Poly-ε-caprolacton. Sie finden beispielsweise Verwendung als resorbierbares Nahtmaterial.

Eine Übersicht der verschiedenen Polymere und ihrer Anwendungsgebiete ist in Tabelle 2 (Anhang) zusammengestellt.

1.2. Oligo-(ε-hydroxycaproat), Butylacrylat

Ein synthetisches Polymer kann aus mehreren Bestandteilen zusammengesetzt sein. Durch Modifikation der chemischen und mechanischen Charakteristika und durch Verwendung bestimmter Copolymere kann dabei ein Polymer mit gewünschten Eigenschaften produziert werden (Suh, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu einem Polymernetzwerk auf der Basis von Oligo(ε-hydroxycaproat)-dimethacrylaten und Butylacrylat gemacht. Die einzelnen Komponenten sollen hier näher beschrieben werden.

<u>Oligo-*ɛ*-hydroxycaproat</u>

Oligo-ɛ-hydroxycaproat dient als Komponente für den kristallinen Teil des Polymers.

Die Oligo-ε-hydroxycaproatdiole wurden mit polymerisierbaren Methacrylat-Endgruppen funktionalisiert, so dass Oligo-(ε-hydroxycaproat)dimethacrylate entstanden (Lendlein et al., 2001). Oligo-(ε-hydroxycaproat) ist hydrophob und wird unter physiologischen Bedingungen langsam hydrolytisch abgebaut (Vert et al., 1992)



Abb. 1: Oligo-(ε-hydroxycaproat)

Butylacrylat

Butylacrylat übernimmt in dem vorliegenden Polymer den Weichsegmentteil und bestimmt die Elastizität des Polymers. Oligo-butylacrylat ist hydrolytisch stabil und bestimmt durch seinen Anteil die Hydrolysegeschwindigkeit des Polymers (Lendlein et al., 2001).



Abb. 2: Oligobutylacrylat

Bei dem fertigen Polymer lassen sich über das Molekulargewicht des Oligo-(εhydroxycaproat)dimethacrylat und den Gehalt an Butylacrylat die Kristallinität, die mechanischen Eigenschaften und die Abbaugeschwindigkeit steuern. Die Abaugeschwindigkeit und der Abbaumechanismus werden durch die Stabilität der hydrolysierbaren Bindungen bestimmt (Kelch et al, 2007). Bei Polymeren aus Poly-ε-hydroxycaproat wird ein *bulk*-Abbau beobachtet. Das bedeutet, dass eine Degradation des gesamten Volumens vorliegt (Wong et al., 1997). Die Degradation des fertigen Polymers erfolgt sehr langsam. Der Abbau des Oligo-(εhydroxycaproats) benötigt eine Abbauzeit von mehr als 24 Monaten (Lendlein, 1999).

1.3. Biokompatibilität

Beim Abbau der Biomaterialien, die im physiologischen Milieu degradiert werden, muß verhindert werden, dass es zur Bildung von toxischen Produkten kommt (Bruck, 1980).

Die European Society for Biomaterials (ESB) definierte 1986 Biokompatibilität folgendermaßen: "Biocompatibility is defined as the ability of a biomaterial to perform with an appropriate host response on a specific application" (Lendlein, 1999).

Die Biokompatibilität bezieht sich dabei auf die chemische, physikalische, biologische und morphologische Anpassung des Biomaterials im umgebenden Gewebe.

Die Gewebekompatibilität eines Materials ist das Resultat komplexer Wechselwirkungen im Organismus (Anderson et al., 2008). Dabei unterscheidet man zwischen Strukturkompatibilität und Oberflächenkompatibilität. Oberflächenkompatibilität: man beobachtet mehr die chemische, physikalische, biologische und morphologische Anpassung eines Implantates an die es im Körper umgebenden Verhältnisse, mit dem Ziel einer jeweils lokal angepassten klinisch erwünschten Wechselwirkung (Wintermantel et al., 1996).

Die Wechselwirkungen mit dem Gewebe sind abhängig von der Mikroarchitektur (porös, nicht porös), den physiko-chemischen Eigenschaften (hydrolytischer Abbau, enzymatischer Abbau) und der lokalen Umgebung des Polymers (Sieminski et al., 2000). Biomaterialien sind nach verschiedenen Kriterien eingeteilt worden. Ein Biomaterial kann bioinert, bioaktiv oder biodegradierbar sein. Den Begriff bioinert verwendet man, wenn es zu keiner Wirtsreaktion kommt und die Struktur des Biomaterials im Körper erhalten bleibt. Bioaktiv ist ein Biomaterial, wenn es biologische Funktionen des natürlichen Gewebes übernimmt. Wird ein Biomaterial im Körper abgebaut und findet ein Ersatz durch Geweberegeneration statt, so bezeichnet man das Biomaterial als biodegradierbar (Suh, 1998).

Ein biokompatibles Polymer muß frei sein von Monomeren, Lösungsmitteln und Weichmachern. Letztendlich muß für den Einsatz in vivo und als medizinisches Produkt garantiert sein, dass ein polymeres Biomaterial sterilisierbar ist und dass dabei seine chemische und mechanische Beschaffenheit praktisch nicht beeinflußt wird.

2. Das Tiermodell

In vivo Untersuchungen von neuen Biomaterialien im Tier sind nach den in vitro Versuchen mit Zellkulturmodellen eine Methode, im kompletten Organismus die Bioverträglichkeit und Funktionalität eines neuen Biomaterials zu erfassen. Neben der technischen Funktionsfähigkeit des Biomaterials im Gewebe sind vor allem die biologische Verträglichkeit des eingesetzten Materials und die Reaktion des Organismus in seiner Gesamtheit für den dauerhaften Erfolg eines neuen Biomaterials wichtig (Khouw et al., 2000a).

Je nach Tiermodell und Methode ist es möglich, eher eine zellbiologische Fragestellung oder die Funktionalität eines Biomaterials zu untersuchen. Kleinere Labortiere werden oft benutzt, um die biologische Antwort auf ein Biomaterial zu untersuchen (Khouw et al.; 2000b; Ottaviani et al., 2007), während größere Tiere wie Schafe und Schweine zur Prüfung der Funktionalität eingesetzt werden (Tzur et al., 1998; van Susante et al., 1998).

Der Wahl des Versuchstieres kommt dabei entscheidende Bedeutung zu. Nur ein geeignetes Tiermodell führt dazu, dass valide Aussagen erhalten werden und dadurch eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine andere Spezies möglich ist (Zutphen et al., 1995; Dalu et al., 2000).

Ratte und Maus sind in der Biomaterialforschung etablierte und häufig verwendete Tiermodelle (van Luyn et al., 1998; Kidd et al., 2002). Ihre genetischen Varianz ermöglicht den Einsatz von transgenen oder von Knockout-Tieren. Auf Grund einer bestimmten genetischen Eigenschaft dieser Tiere wird es ermöglicht, speziellen Fragestellungen in der Biomaterialforschung nachzugehen (Dalu et al., 2000; Khouw et al., 2000b; Kidd et al., 2002).

2.1. Die congenital athymische Maus

Um die Bedeutung der T-Lymphozyten zu untersuchen, werden sogenannte congenital athymische Nacktmäuse eingesetzt (Kindred, 1979). Die congenital athymische Nacktmaus ist ein gutes Modell für die Untersuchung der Immunantwort in einem immunologisch beeinträchtigten Wirt (Nickol et al., 1977). Die Antwort, die bei diesen Tieren hervorgerufen wird, kann als T-Lymphozyten unabhängiger Prozess bezeichnet werden (Howerton et al., 1990). Nacktmäuse haben einen angeborenen Defekt der Epithelzellen, der in Haarlosigkeit (Flanagan, 1966) und im Fehlen der normalen Thymusentwicklung resultiert (Pantelouris, 1968). Die Tiere weisen zwar T-Vorläuferzellen ("T cell progenitors, Pre-T-cells) auf (Fortmeyer, 1981), aber bei homozygoten nu/nu Mäusen entstehen durch die fehlende Prägung im Thymus aus diesen unreifen Vorläuferzellen keine T-Lymphozyten (MacDonald et al., 1981). Die Folge ist, dass diese Tiere keine funktionellen T-Lymphozyten aufweisen und ihnen die zellvermittelte Immunität fehlt (Janeway et al., 1997). Die T-Vorläuferzellen spielen aber offensichtlich eine große Rolle in der verbleibenden Abwehr der Nacktmäuse, da Mäuse ohne diesen Zelltyp selbst unter SPF Bedingungen bereits nach einigen Wochen sterben (Fortmeyer, 1981).

Der Defekt wird durch ein rezessives nu-Gen auf dem Chromosom 11 kontrolliert. Flanagan erkannte erstmals die Mutante als autosomal rezessiv. Er nannte sie "nude" und führte das Symbol "nu" ein (Flanagan, 1966).

2.2. T-Lymphozyten bei der congenital athymischen Maus

Obwohl Nacktmäuse keine funktionellen T-Lymphozyten aufweisen, finden sich in älteren Tieren in geringer Zahl (1-5 %) auch Lymphozyten, die gemäß ihrer Oberflächenmarker T-Lymphozyten entsprechen (Raff, 1973; Sprent et al., 1973; MacDonald et al., 1981). Dabei konnte beobachtet werden, dass auch athymische Mäuse nach sechs bis zwölf Monaten in Lymphknoten und Milz eine hohe Anzahl von Lymphozyten aufwiesen, die den Oberflächenmarker Thy1 exprimierten. Man fand auch Lymphozyten, die CD4, CD8 oder den CD3/TCR-Komplex exprimierten (Abromson-Leeman et al., 1990). Vermutet wird eine extrathymische Entwicklung (Tamauchi et al., 1988). Im Gegensatz zu den älteren Tieren fand

man in jungen Nacktmäusen mit einem Alter von 1-2 Monaten kaum Lymphozyten, die diesen Oberflächenmarker exprimierten (MacDonald et al., 1981).

Obwohl die Zahl der Thy1-positiven Zellen mit zunehmendem Alter der Nacktmäuse zunimmt und sie phänotypisch normalen T-Lymphozyten entsprechen, bleiben diese Zellen immer in der gesamten biologischen Funktion eingeschränkt (Abromson-Leeman et al., 1990).

2.3. Makrophagen und MHC II-Komplex bei der congenital athymischen Maus

Die Bedeutung der Makrophagen und die Expression des MHC II-Komplexes bei Nacktmäusen wird kontrovers diskutiert.

Makrophagen scheinen einigen Untersuchungen zufolge bei Nacktmäusen zumindest partiell eine stärkere Wirksamkeit zu besitzen als bei Auszuchtmäusen (Zinkernagel et al., 1975; Nickol et al., 1977; Fortmeyer, 1981; Sharp et al., 1984). Bei Untersuchungen mit athymischen Mäusen hat man Makrophagen beobachtet, die den MHC II-Komplex exprimiert hatten (Lu et al., 1981; Howerton et al., 1990) und in der Antigenpräsentation effektiver waren als Makrophagen von normalen Mäuse (Miyazaki et al., 1983; Howerton et al., 1990). Jiranek et al. (1995) beobachtete, dass Makrophagen der athymischen Mäuse IL 1 produzierten. Andere Untersucher hingegen beschreiben auch eine mögliche eingeschränkte Funktion dieser Zellen (Kindred, 1979). Auch Bancroft et al. (1986) beschreibt bei Untersuchungen mit Listerieninfektion bei athymischen Mäusen trotz der Expression des MHC II-Komplexes eine unvollständige funktionelle Aktivierung der Makrophagen.

2.4. Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen und MHC II-Komplex

Makrophagen haben im Rahmen der Wundheilung unter anderem die Aufgabe, zerstörtes Gewebe und Debris zu phagozytieren. Damit kann es zu einer Förderung der Wundheilung kommen. Residente Gewebsmakrophagen und im Rahmen von Entzündungen eingewanderte Makrophagen lassen sich von einem gegen murine "Pan" Makrophagen gerichteten monoklonalen Antikörper (Clone BM8) darstellen (Malorny et al., 1986; Leenen et al., 1994). Die Funktion des Histokompatibilitätskomplexes (MHC) ist es, Peptidfragmente zu binden und antigenspezifischen T-Lymphozyten zu präsentieren, um diese zu aktivieren. Man unterscheidet den MHC I- und den MHC II-Komplex. Zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten erkennen Antigene, die mit dem MHC I-Komplex assoziiert sind. Antigene, die mit dem MHC II-Komplex verbunden sind, werden von den CD4-positive T-Helferzellen erkannt. In der Maus detektiert ein monoklonaler Antikörper einen Teil des MHC II-Antigens, der durch die Ia Region des H-2-Komplexes dargestellt wird. Dies entspricht dem menschlichen HLA-DR-Rezeptor. Das Antigen wird bei der Maus von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Es findet sich jedoch nicht auf T-Lymphozyten (Van Vliet et al., 1984, 1985).

3. Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und Organismus

3.1. Allgemein

Eingebrachte Biomaterialien beeinflussen die lokale Umgebung und das biologische System in komplexer Weise (Remes et al., 1992; Morehead et al., 1994; Tang et al., 1995, 1999; Anderson et al., 2008). Für die Wechselwirkung zwischen Implantat und umgebendem Gewebe ist zunächst die Belegung der Implantatoberfläche mit körpereigenen Proteinen entscheidend (Tang et al., 1993; Thomas, 2003).

Die Reaktion des Organismus auf ein Biomaterial hängt auf der einen Seite vom Biomaterial (Anderson 1988; Sieminski et al., 2000; Parker et al., 2002) und auf der anderen Seite vom Wirt ab. Dabei kann ein identisches Material je nach Immunabwehr unterschiedliche Reaktionen auslösen (Dalu et al., 2000). Als erste Reaktion, die das Einbringen von Fremdmaterial in den Organismus auslöst, wurde eine unspezifische, sterile Entzündung angegeben (Smetana et al., 1989). Das Ausmaß der Entzündung bzw. der Fremdkörperreaktion scheint von der Struktur oder Mikroarchitektur eines Biomaterials, von den physiko-chemischen und mechanischen Eigenschaften abhängig zu sein (Smetana et al., 1989; Morehead et al., 1994; Anderson et al., 2008). Von Seiten des Wirtes wird sie in hohem Maße durch seine humorale und zelluläre Immunantwort bestimmt.

Nach der Implantation eines Biomaterials können verschiedene Mechanismen im Organismus aktiviert werden. Direkt nach Einbringen des Biomaterials in den Organismus kann es zur Aktivierung der Fibrinkaskade kommen (Damas et al., 1990). Zudem ist es möglich, dass sich sofort Proteine wie Immunglobulin G an die Oberfläche des Biomaterials anlagern können und dadurch das Verhalten der zellulären Bestandteile im Implantatlager wie beispielsweise der Makrophagen beeinflussen können (Jenney et al., 2000). Nachfolgend kann das Komplementsystem aktiviert werden (Remes et al., 1992), wodurch beispielsweise Histiozyten, die in das Implantationsgebiet eingedrungen sind, angeregt werden, unterschiedliche Zytokine wie Interleukin 1, 8 und TNF α zu produzieren. Diese Zytokine können wiederum weitere Zellen wie T-Lymphozyten und Fibroblasten aktivieren (DeFife et al., 1995). Eine Übersicht über die komplexen Vorgänge bei der Implantation eines Biomaterials sind in Abbildung 3 dargestellt.



Abb. 3: Darstellung der komplexen zellulären und humoralen Reaktionen nach der subkutanen Implantation eines Biomaterials (nach van Luyn et al., 1998). Daran sind u.a. die Fibrinkaskade, das Komplementsystem, Zytokine, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Granulozyten und Makrophagen beteiligt, deren Wirkmechanismen zum Teil miteinander verknüpft sind. BM = Biomaterial, MØ = Makrophagen, G = Granulozyten, T = T-Lymphozyten, TH 1 = T-Helfer Lymphozyten F = Fibroblasten, IL1 = Interleukin 1, TNF = Tumor Nekrose Faktor , IFN = Interferon , IgG = Immunglobulin G, bFGF = basic Fibroblast Growth Factor

Für das Einwachsen von Implantaten ist ein fester Verbund mit dem umliegenden Gewebe notwendig. Bei langsam degradablen (bioinerten) Materialien soll die Einheilung wie bei normaler Wundheilung erfolgen. Den ersten Kontakt, den ein Material in der Regel mit dem Körper bekommt, ist der mit Blut und Gewebsflüssigkeit. In der Größenordnung von Sekunden ist körperfremdes Material mit proteinären Substanzen überzogen. Diese erste Interaktion von Körperprodukten mit der Materialoberfläche geht dem Auftreten von Entzündungszellen an der Implantationsstelle voraus (Tang et al., 1995). Die Art der angelagerten Proteine kann später auch das Anheften bestimmter Zelltypen beeinflussen (Tang et al., 1993, 1995). Auch die Oberflächenstruktur im Mikro- und Nanometerbereich kann die Anheftung und Vermehrung bestimmter Zelltypen auf einem Material steuern. Eine glatte Oberflächen kann die Bildung einer Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Gewebe fördern, während eine poröse, rauhe Oberfläche eher zu einer engeren Verbindung zwischen Implantat und Gewebe führt (Sieminski et al., 2000).

Biomaterialien sind Fremdkörper und können als solche verschiedene Reaktionen hervorrufen (Anderson et al., 2008). Neben der unspezifischen Entzündung können sie auf Grund von Abriebpartikeln eine Immunantwort hervorrufen. Die Gewebereaktion auf ein Biomaterial kann direkt, d.h. lokal im Implantatlager erfolgen aber auch systemisch, vermutlich auch durch das Ausschwemmen von Abriebpartikeln in den Organismus (Bainbridge et al., 2001; Thomas, 2003).

Es wird berichtet, dass die Immunantwort, durch die sich der Organismus gegen fremde Stoffe und Erreger wehrt, in die Reaktionen auf ein Biomaterial involviert sein kann (Remes et al., 1992). Die zelluläre Beteiligung an einer Reaktion auf ein Fremdmaterial/Biomaterial beinhaltet Neutrophile, Lymphozyten, Fibroblasten und Makrophagen (Morehead et al., 1994). Unter Einwirkung von Zytokinen wie Interleukin 1 kann es auch zu einer spezifischen Antwort unter Beteiligung von T-Lymphozyten kommen. Bekannt sind solche Reaktionen im Zusammenhang mit Metallimplantaten im Knochen. Im folgenden wird auf die Beteiligung der T-Lymphozyten bei der Wundheilung, Hypersensibilitätsreaktion und der aseptischen Lockerung von Implantaten kurz eingegangen.

3.2. Speziell: spezifische Immunantwort und T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gehören zum spezifischen, zellulären Immunsystem, deren normale physiologische Funktion darin besteht, infektiöse Organismen abzuwehren (Blotnick et al., 1994). Sie werden in zwei Hauptsubpopulationen eingeteilt, CD4-positive und CD8-positive Lymphozyten. Etwa 30-40 % der zirkulierenden T-Lymphozyten tragen das CD8-Molekül, 55-70% der Lymphozyten sind CD4-positive Zellen. CD8-positive Lymphozyten haben eine zytotoxische Funktion und zerstören infizierte oder entartete Zellen. Sie reagieren mit dem MHC I-Komplex der Makrophagen (Janeway et al., 1997).

Die Funktion der CD4-positiven Lymphozyten oder T-Helferzellen (inflammatorische oder TH1- bzw. TH2-Lymphozyten) besteht unter anderem in der Aktivierung von Makrophagen und in der zellvermittelten Immunantwort. CD4-positive Lymphozyten reagieren mit dem MHC II-Komplex der Makrophagen.

Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren eine Reihe von Lymphokinen wie IL 2, TNFα und INFγ, die andere Zellen wie beispielsweise Makrophagen beeinflussen. T-Lymphozyten können durch das Freisetzen von Zytokinen weitere Effektorzellen und Makrophagen an den Entzündungs- oder Infektionsherd locken. Bei einer Fremdkörperreaktion fördert der Makrophagenfusionsfaktor der T-Lymphozyten den Zusammenschluß von Makrophagen zu sogenannten Riesenzellen. Diese Fremdkörperriesenzellen können sich an Implantatoberflächen anheften. Während der Anheftung erkennen membranständige Rezeptoren (oftmals Integrine) die auf der Oberfläche befindlichen Biomoleküle. Nachdem die Zellen angeheftet sind, ergeben sich die verschiedensten Möglichkeiten der Zellaktivität wie Ausbreitung, Wanderung, Proliferation und biosynthetische Aktivität.

Man geht davon aus, dass das Schema, nach dem T-Lymphozyten auf ein Biomaterial reagieren, dem einer Infektion entspricht. Makrophagen und antigenpräsentierende Zellen (APZ) agieren interaktiv mit den T-Lymphozyten. APZs nehmen wahrscheinlich kleine Teile oder Abriebpartikel des Biomaterials auf und präsentieren es vermutlich wie ein Antigen über ihren MHC II-Komplex den T-Lymphozyten. Daraufhin können T-Lymphozyten aktiviert werden und IFNγ produzieren, was wiederum die Phagozytoseaktivität der Makrophagen steigern kann, so dass diese versuchen können, das Biomaterial abzubauen. Eine Übersicht über die Interaktion zwischen einem Biomaterial, T-Lymphozyten und Makrophagen ist in Abbildung 4 dargestellt.



Abb. 4: Darstellung der Reaktion und Interaktionen von Antigen präsentierenden Zellen (APZ).

Makrophagen (MØ) und T-Lymphozyten (T) auf ein Biomaterial (BM) (nach van Luyn et al., 1998). Partikel des Biomaterials werden durch den MHC II-Komplex der APZ den T-Lymphozyten wie ein Fremdantigen präsentiert. Dadruch kann es zur Aktivierung der T-Lymphozyten kommen, die darauf hin Interferon produzieren, was wiederum die Makrophagen zur Phagozytose der Biomaterialpartikel anregen kann.

IFN = Interferon, MHC II = major histocompatibility complex class II

3.2.1. T-Lymphozyten und Wundheilung

Die Gewebeverletzung, die das Einsetzen eines Biomaterials verursacht, initiiert eine Reihe von Reaktionen wie Entzündung, zelluläres Einwandern, Proliferation und Reparation (DiPietro, 1995; Schaffer et al., 1998). T-Lymphozyten werden nicht für notwendig gehalten, um den Prozess der Wundheilung zu initiieren. Aber für den normalen Ablauf der Gewebereparation scheint eine intakte zelluläre Immunantwort wichtig zu sein. T-Lymphozyten sind dabei an der Regulierung des Wundheilungsprozesses beteiligt (Schaffer et al., 1998; Park et al., 2004). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass eine zwar eingeschränkte Wundheilung trotz fehlender T-Lymphozyten stattfand (Davis et al., 2001).

Im normalen Verlauf der Wundheilung treten T-Lymphozyten in der späten Entzündungsphase um den 7. Tag auf (Barbul et al., 1990). Aktivierte Lymphozyten sezernieren Lymphokine wie fibroblast activation factor, macrophage chemotactic factor, macrophage activation factor, IFN γ , TGF α , IL1, IL2 (Davis et al., 2001) welche die Chemotaxis, Proliferation und Kollagenproduktion von Fibroblasten und die Funktion der Makrophagen beeinflussen. Diese beiden Zelltypen spielen eine wichtige Rolle in der Wundheilung (Barbul et al., 1990; Davis et al., 2001). Fibroblasten sind die eigentlich verbindenden Zellelemente und vor allem an der Kollagensynthese während der Wundheilung beteiligt. T-Lymphozyten regulieren die Aktivität der Fibroblasten während dieser Zeit (Peterson et al., 1987). Makrophagen säubern die Wunde von Debris (DiPietro, 1995) und sind essentiell für die Aktivität der Fibroblasten (Barbul et al., 1995). Aktivierte Makrophagen beeinflussen die Gewebereparation (Hunt et al., 1984), die Angiogenese und die Kollagensynthese (DiPietro, 1995).

Eine Übersicht über das Zusammenspiel von T-Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten ist in Abbildung 5 zu sehen.



Abb. 5: Darstellung der Interaktionen zwischen Immunzellen (T = T-Lymphozyten, $M\emptyset$ = Makrophagen) und Fibroblasten (F) im Wundgebiet (nach Barbul et al., 1990).

Aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen im Wundgebiet schütten verschiedene Zytokine aus, welche die Funktion der Fibroblasten beeinflussen. Die Fibroblasten im Wundgebiet können darauf hin proliferieren, an der Kollagensynthese beteiligt sein und Enzyme produzieren. Lymphozyten im Wundgebiet produzieren viele Lymphokine, welche die Chemotaxis, Proliferation und Kollagenproduktion der Wundfibroblasten beeinflussen.

bFGF = bacic Fibroblast Growth Factor, FAF = Fibroblast Activator Factor, IFN = Interferon , IL 1 = Interleukin 1, TGF , = Transforming Growth Factor , Es wurde gezeigt, dass eine verminderte Zellzahl beider Subpopulationen, der CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten, in vivo zu einer beeinträchtigten Wundheilung führen kann, die sich z.B. in einer veränderten Reißfestigkeit der Wunde und einer beeinträchtigten Kollagensynthese äußert (Barbul et al., 1990; Efron et al., 1990)

Eine fehlende regulatorische Wirkung der Lymphokine beeinflußte die Aktivität der Fibroblasten und Makrophagen. Dies beeinflußte den Kollagen- und Proteoglycangehalt der Extrazellulärmatrix der Wunde und resultierte in veränderten biomechanischen Eigenschaften (Davis et al., 2001). Wunden in Mäusen mit verminderter Zahl aller T-Lymphozyten zeigten sich in ihrer Reißfestigkeit vermindert und in ihrem Hydroxyprolingehalt, einem Index der reparativen Kollagensynthese, beeinträchtigt (Efron et al., 1990; Schaffer et al., 1998; Davis et al., 2001). T-Lymphozyten haben die Fähigkeit, die Gewebereparation zu erleichtern. Studien zeigten, dass T-Lymphozyten angiogene und fibrogene Wachstumsfaktoren produzieren können, was die Gewebereparation fördern kann (DiPietro, 1995; Mor et al., 2004)

Patienten mit einer HIV-Infektion wiesen eine verminderte Anzahl an CD4-positiven Lymphozyten auf (Davis et al., 2000). Man stellte bei diesen Patienten eine beeinträchtigte und verzögerte Wundheilung fest. Dabei hing der Grad der Verzögerung und Beeinträchtigung von der Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten ab (Burns et al., 2000).

Davis stellte in einer Studie fest, dass sich die Entwicklung der Wunde und biomechanische Kennwerte des Narbengewebes von HIV Patienten von den Werten einer Kontrollgruppe unterschieden. Wunden von Patienten mit HIV Infektion heilten mit einer Verzögerung von 3 bis 4 Wochen und das Narbengewebe hatte eine verminderte Spannkraft und Stärke (Burns et al., 2000; Davis et al., 2000). Bei HIV-Patienten resultierte diese Schwächung des Narbengewebes aus einer beeinträchtigten Bildung und Vernetzung von Kollagen während der Wundheilung. Grund dafür scheint die verminderte Anzahl von CD4 Lymphozyten und deren regulatorischen Einfluss auf Kollagenbildungsprozesse während der Wundheilung zu sein (Davis et al., 2000).

3.2.2. Biomaterialien und Allergie Typ IV

Ein Wirkungsmechanismus der T-Lymphozyten, der zu einer ungenügenden Akzeptanz und Integration eines Biomaterials führen kann, ist die Hypersensibilitätsreaktion auf Bestandteile des eingesetzten Materials. Es kommt zu einer verzögerten Allergie vom Typ IV und damit zu einer zellulären, T-Lymphozyten-spezifischen Reaktion. Solche Unverträglichkeitsreaktionen wurden beispielsweise im Zusammenhang mit Nickel-Verbindungen (Thomas et al., 2000) oder zementierten Prothesen mit Polyethylen-Bestandteilen (Farber et al., 2001) im orthopädischen Bereich beobachtet.

Die Aktivierung der T-Lymphozyten kann nach der Antigenpräsentation durch Makrophagen mit Hilfe des MHC II-Komplexes, der nach der Prozessierung des Fremdantigens exprimiert wird, erfolgen (van Luyn et al., 1998) (Abb. 4, II Literaturübersicht, Kapitel 3.2.).

Die Hypersensibilitätsreaktion Typ IV basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Antigenpräsentierende Zellen (APZ) phagozytieren Fremdmaterial und präsentieren es mit Hilfe des MHC II-Komplexes den T-Lymphozyten als Antigen. Die T-Lymphozyten bilden darauf hin einen Komplex mit den APZ. Die Lymphozytenaktivierung erfolgt durch ein Signal vom Antigen-MHC II-Komplex und durch ein costimulierendes Signal der APZ (Janeway et al., 1997).

Bei einer Unverträglichkeitsreaktion auf Biomaterialien geht man von einem identischen Reaktionsweg aus. Die Expression des MHC II-Komplexes wurde bei Materialien wie Poly (llactid), Polymethylsiloxan, mit Hydroxylapatit beschichteten Prothesen und Titan beobachtet (van Luyn et al., 1998). Man geht davon aus, dass Materialfragmente mittels MHC II-Komplex so präsentiert werden wie Fremdantigene (Petillo et al., 1994; van Luyn et al., 1998). Lösliche Metallionen, die von einem Implantat freigesetzt werden, wie beispielsweise Nickel, Cobalt und Chrom (Budinger et al., 2000) oder kleine Prothesenfragmente (Thomas et al., 2000) fungieren als unvollständige Antigene, als Haptene. Ein Hapten kann sich mit endogenem Protein zu einem Vollantigen verbinden und über den Kontakt mit dem MHC II-Komplex kann es zur Aktivierung der T-Lymphozyten und der zellvermittelten Immunantwort kommen (Granchi et al., 2000; Budinger et al., 2001; Goodman, 2007). Neben der Interaktion mit den proteinären Wirtsprodukten kann freigesetztes Material auch direkt mit den Oberflächenmolekülen der Zellen interagieren und so als Neuantigen eine immunologische Antwort hervorrufen (Weyand et al., 1998).

Die Folgen sind chronische Entzündungen im periimplantären Gewebe, Lockerung der Prothesen oder Abstoßungen des Biomatrials (Thomas et al., 2000; Bainbridge et al., 2001; Farber et al., 2001).

3.2.3. T-Lymphozyten und aseptische Lockerung sowie Osteolyse

Auch die aseptische Lockerung kann im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündungsreaktion auf ein Biomaterial unter Beteiligung von T-Lymphozyten stehen. Die aseptische Lockerung und der Abbau von Knochen sind häufige Komplikationen bei Prothesen im Knochenkontakt (Farber et al., 2001). Sie wird z.B. beobachtet bei der Verwendung metallischer und polymerer Implantate im Knochen (Gil-Albarova et al., 1992; Weyand et al., 1998). Der Abrieb von Polyethylen aus Hüftgelenkspfannen stellte danach einen Hauptgrund für das Versagen von Implantaten dar (Tang et al., 1995; Wooley et al., 1996). So sind bei gelockerten, zementierten Prothesen und osteolytischem Knochen hohe Anzahlen an T-Lymphozyten und Makrophagen beschrieben worden (Goodman et al., 1998).

Die Abriebpartikel können zur Aktivierung von Makrophagen mit nachfolgender Zytokinsekretion führen. Zusätzlich kann es zur partikelinduzierten Aktivierung von Zellen des Immunsystems kommen (Gil-Albarova et al., 1992). Durch Polyethylenpartikel wurde das Gewebe angeregt, Zytokine und Entzündungsmediatoren wie IL1, IL6, TNF α , PGE₂ zu bilden, welche die Knochenresorption vermitteln und zu einer Lockerung des Implantates führen können (al Saffar et al., 1994; Tang et al., 1995; Haynes et al., 2001; Ingham et al., 2005)

T-Lymphozyten sind beteiligt am Bone remodelling und an der Aktivierung von Osteoklasten z.B. bei chronischen Entzündungen wie Rheumatischer Arthritis (Weitzmann et al., 2000) und anderen Autoimmunerkrankungen. Sie können direkt über die Expression von RANKL oder indirekt durch die Ausschüttung von speziellen Zytokinen wie IL1 und IL7 die Aktivierung von Osteoklasten und möglicherweise einen Knochenverlust induzieren (Theill et al., 2002; Toraldo et al., 2003). RANKL ist ein Mitglied der TNFα-Familie und Schlüsselregulator des Knochenremodelling und ist rezeptorvermittelt essentiell für die Entwicklung und Aktivierung

von Osteoklasten. Die Produktion von RANKL steigt durch IL1, IL6, TNFα und PGE₂. Gebildet wird RANKL durch aktivierte T-Lymphozyten (Saidenberg Kermanac'h et al., 2002). Zusätzlich sind T-Lymphozyten essentielle Vermittler des IL7-induzierten Knochenverlustes in vivo. Durch IL7 konnte kein Knochenverlust in vivo in Abwesenheit von T-Lymphozyten induziert werden.

Im Zuge chronischer Entzündungen und einer zellulären Immunantwort auf Degradations- und Abriebpartikel von Prothesenmaterial kann es zur aseptischen Lockerung der Prothesen und zur Osteolyse kommen. In einer Studien wurde ein erhöhter Nachweis von RANKL im periimplantären Gewebe bei gescheiterten Implantaten geführt (Crotti et al., 2004). Chronische systemische Aktivierung von T-Lymphozyten oder lokale Entzündungen innerhalb der Knochen bei Metastasen, Infektionen, Frakturen oder Gelenkentzündung ziehen wahrscheinlich T-Lymphozyten an, die dann aktiv durch die Produktion von RANKL am Bone Remodelling teilnehmen.

3.3. Biomaterialien: fremdkörperassoziierte Tumorbildung

Auch wenn implantierte Biomaterialien biokompatibel sind, stellen sie Fremdkörper im Organismus dar (Morehead et al., 1994). Sie können unerwünschte Reaktionen wie chronische Entzündungen hervorrufen und sogar tumorfördernd sein (Brand et al., 1973, 1976; Tsuchiya et al., 1995, 1996; van Luyn et al., 1998; Moizhess, 2008). In der Literatur sind Tumorbildungen im Tiermodell und beim Menschen beschrieben, die im Zusammenhang mit Fremdkörpern verursacht wurden.

So beschreibt Pistner et al. (1993) eine fremdkörperinduzierte Tumorbildung nach Langzeitimplantation von Poly(l-lactid) im Rattenmodell. Im Rattenmodell entwickelte sich auch bei der Untersuchung verschiedener Plastikmaterialien ein fibröses Histiozytom (Maekawa et al., 1984). Beim Menschen werden Brustimplantate aus Silikon dafür verantwortlich gemacht, Brustkrebs zu erzeugen (Kasamaki et al., 2000). Jennings (Jennings et al., 1988) beschreibt in einzelnen Fällen die Entwicklung eines Angiosarkoms in Verbindung mit implantiertem Material.

4. Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen

Es gibt verschiedene Methoden, Kollagen auf Grund seiner Eigenschaften lichtmikroskopisch darzustellen. Kollagene Fasern stellen sich mittels H.E. Färbung rot dar. Mit einer Trichromfärbung lassen sie sich selektiv anfärben und im polarisierten Licht leuchten sie aufgrund ihrer Doppelbrechung auf.

4.1. Doppelbrechung von Kollagen

Die Wundheilung beinhaltet die Bildung von Granulationsgewebe, welches durch die Anwesenheit von dünnen unorganisierten Kollagenfibrillen charakterisiert ist (Williams, 1970). Die Proliferationsphase, die in den 10-14 Tagen nach Wundsetzung abläuft, ist bestimmt von der Proliferation von Fibroblasten und der anschließenden Synthese von Kollagenen. In Hautwunden gibt es eine progressive Zunahme des Kollagengehalts während der Proliferationsphase und es kommt zur Bildung von Kollagenfibrillen mit kleinem Durchmesser. Der vorherrschende Typ an Kollagen, der früh in der Wunde gebildet wird, ist Kollagen III (Bailey et al., 1975). Kollagen III, das ein lockeres retikuläres Netzwerk bilden kann (Jozsa et al., 1984) erscheint um den 2. bis 3. Tag der Wundheilung und wird zwischen Tag 5 und 7 maximal synthetisiert (Kanzler et al., 1986).

Während der Remodellingphase wird Kollagen III durch Kollagen I ersetzt (Kanzler et al., 1986). Es kommt in dieser Zeit zu einer Zunahme des Durchmessers der Kollagenfibrillen (Williams, 1970). Erst viel später, um den 180. Tag nach Wundsetzung, haben sich die Verhältnisse denen der normalen Haut angepasst.

Mittels polarsiertem Licht kann man im Lichtmikroskop die Doppelbrechung von Kollagenstrukturen darstellen (Wolman, 1975). Untersuchungen der Kollagenstruktur mit polarisiertem Licht wurden seit dem frühen 19. Jahrhundert durchgeführt.

Erstmals wurde die Doppelbrechung von Kollagen 1815 von Sir David Brewster, einem schottischen Naturwissenschaftler und Geistlichen beschrieben und 1847 durch Müller weitergehend betrachtet. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden einige Kriterien für typisches Sehnenkollagen (Kollagen I) etabliert. Ein Kriterium ist seine doppelbrechende Eigenschaft. (Schmidt, 1934; Wolman, 1975).

Kollagen I soll aufgrund der Länge seiner Fibrillen intensiv positiv doppelbrechend sein. Kollagen III hingegen soll nicht doppelbrechend sein aufgrund der langen Seitenketten und der Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen interstitieller Proteoglycane und anderer Moleküle (Wolman et al., 1986)

Aufgrund dieser unterschiedlich doppelbrechenden Eigenschaften der Kollagene soll man mittels polarisiertem Licht das Alter einer Entzündung bzw. der Wundheilung bestimmen können. Allerdings beschreibt Messow das Auftreten der Doppelbrechung kollagener Fasern bei der Altersbestimmung von Granulationsgewebe vom Menschen erst nach zwei Monaten (Messow, 1960), während Doillon et al. (1985) ein Auftreten der Doppelbrechung im Wundgebiet bereits ab dem 6. Tag angibt im Zusammenhang mit der Implantation von Kollagengerüsten. Dagegen beschreiben Wolman und Gillman keine Doppelbrechung in Wunden mit einem Alter von einer bis 4 Wochen (Wolman et al., 1972).

Junges, neu geformtes Kollagen ist weniger oder gar nicht anisotrop und schwach doppelbrechend (Wolman et al., 1972). Zunehmende Doppelbrechung, wie sie bei Streckung beobachtet wird, wird durch intermolekulare Veränderungen verursacht. Das Gleiche gilt wahrscheinlich für die Änderungen im Kollagen während seiner Alterung (Wolman et al., 1986). Tonna and Hatzel beschreiben, dass die Intensität der Doppelbrechung mit zunehmendem Alter des Kollagens steigt (Tonna et al., 1967).

Josza (1983) beschreibt eine starke Doppelbrechung von Sehnen, die charakteristisch ist für Kollagen I, während Kollagen III durch dünne Fasern charakterisiert ist, die nur schwach doppelbrechend sind (Jozsa et al., 1984).

Polarisations-Lichtmikroskopie kann selektiv anisotrope Komponenten oder Strukturen sichtbar machen, und mit einer guten Optik und exakter Anordnung erscheinen diese Objekte hell und leuchtend auf dunklem Untergrund und stellen sich somit doppelbrechend dar (Wolman et al., 1972)

4.2. Selektive Anfärbung: Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Ein charakteristisches Merkmal von Kollagen ist seine Azidophilie, für die man die Anwesenheit von basischen Aminosäuren für ursächlich hält. Kollagen lässt sich lichtmikroskopisch durch diese Azidophilie, also die Anfärbarkeit mit sauren Farbstoffen darstellen. Sie wird auch veranwortlich gemacht für die selektive Anfärbung bei der Trichrom-Methode (Wolman et al., 1972). Kollagen wird durch die Anwendung von beispielsweise der Trichromfärbung nach Masson-Goldner selektiv grün dargestellt (Romeis, 1989).

5. pH-Wert im Implantatlager

Bei der Implantation eines Biomaterials kommt es häufig zu einer Verletzung des Gewebes.

Darauf folgend treten primäre Reaktionen wie Entzündung mit anschließender Wundheilung ein.

Die Wundheilung ist ein sehr komplexer Prozess, in deren Verlauf es auch zu Veränderungen des pH-Wertes im Wundgebiet kommt (Struck, 1987).

Die Wundsetzung führt zu Schädigung und Absterben von Zellen. Als unmittelbare Folge der Wundsetzung wurde eine primäre Gewebsazidose beschrieben. Sie gilt als Folge des lokalen Sauerstoffmangels und Erhöhung des CO₂-Partialdruckes im Wundgebiet. Als Folge der anaeroben Glykolyse und durch eine lokale Konzentrationserhöhung von beispielsweise Milchsäure kommt es zur sekundären Azidose. In Folge erscheint eine Störung der gesamten des Säure-Basen-Gleichgewichtes und der gesamten pH-Wert-Regelung, die sich in Form einer pH-Wert-Senkung darstellt (Lindner, 1987; Lardner, 2001).

Ab dem zweiten Tag der Wundheilung kommt es zu einer Normalisierung des pH-Wertes.

Bei zunehmender Blut- und Sauerstoffversorgung des Wundfeldes wird die posttraumatische pH-Absenkung des Wundfeldes normalisiert (Lindner, 1987). Dabei wurden in der Proliferationsphase pH-Werte im alkalischen Bereich gemessen. Die pH-Wertänderung könnte auch eine Bedeutung für den in dieser Zeit stattfindenden Kollagenaufbau und –abbau haben. Während der Reparationsphase wird zunächst Kollagen III und dann Kollagen I gebildet.

Eine pH-Wertverschiebung im Implantatlager in den sauren Bereich hat nicht nur Einfluß auf die Kollagensynthese. Ein saurer Überstand aus niedermolekularen Degradationsprodukten oder Monomeren eines Polymers kann toxisch sein (Hoffmann et al., 1997).
6. Endotoxin-Nachweis (LAL-Test)

Die Konzentration von Endotoxin Gram-negativer Bakterien läßt sich mit Hilfe des Limulus-Amöbozyten-Lysats (LAL) bestimmen. Diese Untersuchung ist praktisch wichtig für den Einsatz eines Biomaterials als Medical Device. Grundsätzlich müssen Implantate frei von Bakterien und anderen Mikroorganismen sein.

Der Gebrauch von Limulus-Amöbozyten-Lysat zum Nachweis von Endotoxin entwickelte sich aus der Beobachtung von Bang (1956), dass eine Infektion mit gram-negativen Bakterien von Limulus polyphemus, dem Pfeilschwanzkrebs, zu tödlicher intravaskulärer Blutgerinnung führt. Später wurde gezeigt, dass die Gerinnung das Resultat der Interaktion von Endotoxin mit einem gerinnungsfähigen Protein der zirkulierenden Amöbozyten im Blut von L. polyphemus darstellte (Levin et al., 1964a, 1964b). Nach der Entwicklung eines geeigneten Antikoagulans wurde ein Lysat aus ausgewaschenen Amöbozyten derart behandelt, dass es sich als extrem empfindlicher Indikator für die Gegenwart von Endotoxin erwies (Levin et al., 1968), der auf der Basis einer enzymatischen Reaktion funktioniert (Solum, 1970; Young et al., 1972). Diese Aktivierung des Lysats läßt sich photometrisch überwachen (Teller et al., 1979).

III Material

1. Versuchstiere

1.1. Maus

Bei der Maus als Versuchstier wurden zwei Linien eingesetzt. Zum einen wurden NMRI-Mäuse verwendet. Es handelt sich um Auszuchttiere, d.h. es wird eine Zucht betrieben, die Verwandschaftspaarung vermeidet. Damit wird eine gute genetische Heterogenität erreicht. Der NMRI Auszuchtstamm wurde gewählt, da es zu diesem Stamm ein Inzuchtmodell gibt. Bei dem Inzuchtstamm handelt es sich um NMRI nu/nu-Mäuse. Die Tiere sind athymisch, d.h. sie haben keinen vollständigen Thymus, sondern nur ein Thymusrudiment. Im Zusammenhang damit bilden sie keine oder nur wenige T-Zellen aus. Auch haben sie kein oder kaum Fellwachstum, so dass es sich hier um Nacktmäuse handelt. Da diese Tiere durch ihr eingeschränktes Immunsystem und ihr fehlendes Fell sehr empfindlich auf ihre Umgebung reagieren, müssen sie unter besonderen Bedingungen gehalten werden.

Zu den weiteren Haltungsbedingungen siehe Tabellen 3 und 4 (Anhang).

Für den Versuch wurden 72 Nackt- und 72 Auszuchtmäuse eingesetzt. Züchter und Lieferant war M&B Breeding aus Dänemark. Die Auszuchttiere wurden am Tierforschungszentrum der Universität Ulm (Bereich Safranberg, Leiter Prof. Dr. B. Jilge) unter konventionellen Bedingungen gehalten, die Nacktmäuse im Überdruckisolator. In den Tierräumen herrscht Klimakonstanz, d.h. eine bestimmte vorgegebene Raumtemperatur wird mit einer Regeltoleranz von +/- 1 °C ganzjährig eingehalten. Die Luft wird, bei 100% gefilterter Frischluft, ca. 20 mal pro Stunde ausgetauscht. Die Luftführung ist zugfrei.

Die Raumbeleuchtung erfolgt ausschließlich über tageslichtfarbene Beleuchtungskörper. Der Licht-/Dunkelwechsel ist über eine Zeitschaltuhr geregelt. Die Lichtintensität ist niedrig genug, um zu gewährleisten, dass die dunkelaktiven Ratten und Mäuse keine phototoxische Retinopathie (Degeneration der Photorezeptoren durch zuviel Licht) erleiden.

Verwendet wurden männliche Mäuse, die zum Zeitpunkt des Experiments ein Alter von ca. 10 Wochen hatten. Die Tiere wurden nach ihrer Lieferung in beschriebener Gruppenzahl in die jeweiligen Käfige verteilt. Die Käfige sind zuvor einschließlich Einstreu autoklaviert worden. Bis zum Einsatz im Versuch hatten die Tiere eine Adaptationszeit von zwei Wochen. Dabei wurden der Gesundheitszustand und das Verhalten der Tiere regelmäßig kontrolliert.

2. Polymer

Bei dem verwendeten Material handelte es sich um ein Polymernetzwerk auf der Basis von Oligo(ε -hydoxycaproat)-dimethacrylaten und Butylacrylat. Das Polymer bestand zu 40% aus Polycaprolacton, dessen Ausgangsmonomer ε -Caprolacton ist, und zu 60% aus Butylacrylat. Es bestand aus semikristallinen und amorphen Anteilen, die dem Material eine Netzstruktur verleihen (Schmidt, 2002)

Das Polymer wurde im Deutschen Wollforschungsinstitut (DWI) der RWTH Aachen von Frau S. Steuer im Rahmen ihrer Dissertation (Steuer, 2003) hergestellt. Das aus den einzelnen Bestandteilen produzierte Polymernetzwerk wurde zu einem 0,4 mm dünnen Polymerfilm gegossen, aus dem runde Polymerscheiben mit einem Durchmesser von 4 mm ausgestanzt wurden (Abb. 7 Anhang). Die ausgestanzten Polymerscheiben wurden mit Ethylenoxid bei 45 °C sterilisiert und danach mittels der *Headspace*-GC/MS-Analyse auf flüchtige Bestandteile wie beispielsweise Lösungsmittel untersucht. Es wurden keine Lösungsmittelreste oder andere flüchtige, organische Bestandteile nachgewiesen (Steuer, 2003).

In *in vitro*-Versuchen hat sich das Polymer als hydrolytisch abbaubar und biokompatibel erwiesen (Lendlein, 1999; Lendlein et al., 2001). Der Abbau erfolgten dabei sehr langsam (Lendlein et al., 2001; Steuer, 2003). Bezüglich seiner Biokompatibilität wurde das Polymer im HET-CAM-Test an der Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern und im Agarose-Overlay-Test an der von Mausfibroblasten abgeleiteten Zelllinie L929 untersucht und als zellkompatibel und nicht-toxisch eingestuft (Lendlein et al., 2001; Schmidt, 2002; Rickert et al., 2003). Bis zum Einsatz im Tierversuch wurde das Polymer steril verpackt im Gefrierschrank bei – 80 °C aufbewahrt.

Eine detaillierte Auflistung aller verwandten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang.

V Methoden

1. Subkutane Implantation der Polymerproben

1.1. OP-Vorbereitung

Ein Tier wurde aus dem Käfig genommen und gewogen. Anhand des Gewichtes wurde die Prämedikation mit Atropin (0,05 mg/kg) und die Narkose mit Ketamin (100 mg/kg) und Rompun 2% (5 mg/kg) berechnet. Ketamin und Rompun wurden zu 1 ml Ketamin und 0,25 ml Rompun in einer Spritze gemischt, davon wurden 0,02-0,03 ml/10 g Maus verabreicht. 1 ml Atropin wurde als 1:10 Verdünnung mit 9 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung in einer Dosierung von 0,01 ml/10 g Maus subkutan in eine Hautfalte am Nacken gespritzt. Etwas später wurden Ketamin und Rompun in oben genannter Dosierung intraperitoneal verabreicht.

Sobald das Tier narkotisiert war, erfolgte zunächst eine Ohrmarkierung zur eindeutigen postoperativen Identifikation. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern wurde eine Augensalbe verabreicht.

Für die subkutane Implantation am Hals wurde das Tier mit dem Rücken auf das OP-Brett gelegt und die Vorderbeine wurden mit Tapeband am Brett fixiert. Der Halsbereich wurde großzügig geschoren (außer NMRI nu/nu Maus) und desinfiziert.

1.2. OP-Durchführung

Im mittleren ventralen Halsbereich erfolgte mit dem Skalpell ein ca. 0,6 cm großer Hautschnitt. Mit einer Irisschere wurde die Haut vollständig durchtrennt. Die Pinzette wurde eingeführt und durch Spreizen der Pinzettenschenkel eine subkutane Tasche gebildet. Dort hinein wurde das Implantat gelegt. Die Inzision wurde mit zwei Nahtheften verschlossen. Atemfrequenz und Reflexe wurden während der OP überprüft.

Die Polymerproben wurden für jeweils 1, 2, 5 und 9 Wochen im Tier belassen. Jedes Tier erhielt eine fortlaufende Nummer, die zusammen mit den Gewichten des Tieres und des Implantates, der Kennzeichnung des Tieres und der Implantationsdauer protokolliert wurde.

1.3. OP-Nachsorge

An den ersten drei Tagen wurden die Tiere einmal täglich kontrolliert und Haltung, Verhalten sowie Zustand der Operationsnaht protokolliert. Danach erfolgte die Kontrolle einmal pro Woche.

2. Explantation:

Das Tier wurde wie bereits oben beschrieben narkotisiert und für die Explantation des Polymers vorbereitet.

Die Inzision erfolgte im Halsbereich seitlich der ersten Schnittführung. Die Haut wurde angehoben. Bei Erkennen des Implantates wurde dieses vorsichtig mit der Pinzette gegriffen. Es erfolgte die pH-Wertmessung mit pH-Indikatorpapier, indem das Indikatorpapier in den direkten Bereich zwischen Gewebe und Implantat eingebracht wurde. Der gemessene pH-Wert wurde notiert, dann wurde das Polymer aus dem umgebenden Gewebe herausgezogen. Das periimplantäre Gewebe und das Polymer wurden für die verschiedenen Untersuchungsmethoden aufgearbeitet.

Zur Messung des pH-Wertes:

Der pH-Wert sollte ursprünglich mit einer feinen pH-Sonde gemessen werden. Vorherige Vergleiche der pH-Sonde mit pH-Indikatorpapier in Kochsalz ergaben gleiche pH-Werte. Im Laufe der Untersuchungen der ersten beiden Mausgruppen (NMRI Maus, Implantationszeitpunkt 1 und 2 Wochen) zeigte sich jedoch durch Bruch der feinen Glassondenspitzen und Verschmutzungen durch Proteinablagerung eine hohe Störungsanfälligkeit der Sonden und große Ungenauigkeit in den Messergebnissen. Die folgenden pH-Werte wurden daraufhin mittels pH-Indikatorpapier ermittelt (Tabellen 15 und 16 im Anhang). Definition des Grades der Integration:

Bei der Explantation des Polymers wurde das Polymer mit einer Pinzette gefaßt und aus dem umgebenden Gewebe der Maus herausgezogen. Dabei wurde nach dem Kraftaufwand beim Herausziehen des Polymers aus dem umliegenden Gewebe die Integration definiert und nach folgenden Kriterien ein Score aufgestellt:

+ leichte Integration

Durch leichten Zug schnelles Ablösen und Herausziehen des Polymers aus dem umgebenden Gewebe

++ mittlere Integration

Durch kräftigen Zug am Polymer läßt sich das Polymer noch vom Gewebe lösen.

+++ starke Integration

Das Polymer läßt sich durch starken Zug mit der Pinzette schwer aus dem umgebenden Gewebe lösen. Es liegt eine höhere Integration des Polymers mit dem umgebenden Gewebe vor.

++++ sehr starke Integration

Das Polymer läßt sich durch Zug mit der Pinzette nicht mehr aus dem umliegenden Gewebe lösen. Es liegt eine sehr feste Integration des Polymers in das Gewebe vor.

Der Grad der Ablösbarkeit und damit der Integration wurde immer durch den gleichen Experimentator festgelegt.

Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Integration des Polymers in das periimplantäre Gewebe der Mäuse wurde der Score in die Zahlen 1 bis 4 übertragen und pro Gruppe der Minimal- und Maximalwert sowie der Median ermittelt und gegen die Implantationszeit aufgetragen (Tab. 8, 8a; Abb. 6, 6a, Anhang)

2.1. Probenbearbeitung

2.1.1. Periimplantäres Gewebe

Das periimplantäre Gewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Blöcke geschnitten, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Gefrierschrank bei –80 C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.2. Polymer

Entnommene Polymerproben wurden mit 2%igem Paraformaldehyd für 3 Minuten fixiert. Danach wurden sie 3x5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend in PBS bei 4° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.3. LichtmikroskopischeUntersuchung der Polymerproben

Die entnommenen und mit 2%igem Paraformaldehyd fixierten Polymerproben wurden bei 200facher Vergrößerung lichtmikroskopich betrachtet und Bilder der Oberfläche der Polymerproben mittels einer Kamera aufgenommen.

Dabei wurde auf das Auftreten von Gewebe, Blutgefäßen oder Zellen geachtet. Ein positiver Effekt wurde mit 1 für ja, kein Auftreten mit 0 für nein codiert, die Häufigkeit pro Gruppe und Zeit ermittelt und im Balkendiagramm aufgetragen (Abb. 11 – 13, Anhang).

3. Anfertigung histologischer Präparate

3.1. Periimplantäres Gewebe

3.1.1. Objektträgerbeschichtung

Zur besseren Haftung der histologischen Schnitte auf den Objektträgern wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Objekträger für 15 Minuten in einer 0,1% Poly-L-Lysin-Lösung gebadet. Anschließend erfolgt die Trocknung der Objektträger bei Raumtemperatur über Nacht.

3.1.2. Erstellung von Kryostatschnitten

Das tiefgefrorene periimplantäre Gewebe wurde mit Tissue Tek Gewebekleber auf dem Probenteller fixiert. An einem Kryostat wurden Gefrierschnitte von 5 µm Dicke angefertigt, die auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Raumtemperatur) gezogen wurden. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2. Polymerproben

3.2.1. Paraffineinbettung

Die explantierten Polymere wurden zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Polymere mit PBS gespült, entwässert und eingebettet. Das Protokoll der Paraffineinbettung ist im Anhang aufgeführt.

3.2.2. Schneiden der Paraffinblöcke

Die Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom geschnitten und im Wasserbad bei zirka 37 °C gestreckt und auf den Objektträger gezogen. Die Schnittdicke betrug 5 μ m. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet.

4. Immunhistologische Färbungen

4.1. Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte des periimplantären Gewebes wurden immunhistologisch gefärbt. Dabei werden Antigene im Gewebe mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen und lokalisiert. Durch das Enzym Alkalische Phosphatase kann der sich bildende Immunkomplex sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt durch eine Substratumsetzung mit Hilfe von Chromogenen. Durch eine chemische Reaktion werden diese Chromogene in unlösliche und farbige Produkte umgewandelt. Sie präzipitieren am Ort ihrer Entstehung und markieren so die Lage des gesuchten Antigens. In diesem Fall wurde die Alkalische Phosphatase mit Hilfe von Neu Fuchsin in einen roten Farbstoff umgesetzt. Zum Blocken der endogenen Alkalischen Phosphatase im Gewebe wird der Farblösung Levamisol zugegeben.

4.1.1. Neu Fuchsin Färbelösung

0,5 g Neu Fuchsin werden in 10 ml 2 molarer Salzsäure gelöst. 20 µl dieser Neu Fuchsin Lösung werden mit 50 14% igem Natriumnitrit gut vermischt und in 10 ml 0,05 molaren TRIS-Puffer (pH 8,7) gegeben. Dazu werden 50 µl 1 molares Levamisol (0,24 g/ml) gegeben. 5 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat werden mit 60 µl N, N -Dimetylformamid vermischt und zur restlichen Lösung gegeben. Die fertige Lösung wird filtriert und auf die Präparate gegeben. Das Protokoll der Antikörperfärbung ist im Anhang aufgeführt.

4.1.2. Kontrollschnitte

Die Positivkontrollen für den Antikörper gegen den MHC II-Komplex wurden mit Thymusgewebe aus der immunkompetenten Maus nach oben angegebenem Protokoll angefertigt. Der Antikörper für die Makrophagen wurde an Lebergewebe aus der immunkompetenten Maus ausgetestet. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen und durch TBS ersetzt.

4.2. Polymer

4.2.1. Entparaffinierung und Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Die H.E.-Färbung ist eine Übersichtsfärbung und das Prinzip beruht auf der Verwendung zweier Farbstoffe, Hämatoxylin und Eosin. Hämatoxylin färbt den Kern und andere sauren Strukturen blau. Eosin färbt das Zytoplasma rot.

Die Protokolle der Entparaffinierung und der H.E.-Färbung sind im Anhang aufgeführt.

4.2.2. Entparaffinierung und Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die Masson-Goldner-Färbung ist eine Trichromfärbung und das Prinzip beruht auf der Verwendung mehrerer Farbstoffe. Bei dieser Färbemethode wird das Bindegewebe kontrastreich dargestellt. Das Bindegewebe färbt sich grün an. Die Muskulatur erscheint blaßrot, der Zellkern blauschwarz, das Zytoplasma rot und Erythrozyten werden leuchtend rot-orange dargestellt (Romeis, 1989).

Das Protokoll der Trichromfärbung nach Masson-Goldner ist im Anhang aufgeführt.

5. Histologische/Immunhistologische Auswertung

5.1. Auswahl der Präparate

5.1.1. Gefrierschnitte

Pro Implantationszeitpunkt und Mausstamm wurde das Gewebe von 6 Mäusen untersucht. Bei der Gruppe der NMRI nu/nu Mäuse zum Implantationsalter von 5 Wochen sind es aufgrund des Verlustes eines Tieres nur fünf Mäuse.

Dabei wurden pro Maus jeweils 2 Schnitte mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. 2 Schnitte dienten als Negativkontrolle und wurden an Stelle des Primärkörpers mit TBS inkubiert.

Von den zwei Positivschnitten wurde in der Auswertung jeweils nur ein Schnitt beurteilt. Dabei wurde der von seiner Histologie her besser erhaltene Schnitt ausgewählt.

5.1.2. Polymer

Pro Implantationszeitpunkt wurden die Polymere von drei Mäusen ausgewählt. Jeweils zwei Schnitte pro Paraffinblock wurden H.E. und mittels Trichromfärbung nach Masson-Goldner gefärbt. Auch hier wurde nur der bessere Schnitt in die Auswertung genommen.

5.2. Aufnahme der Bilder

Die histologischen Untersuchungen wurden mit einem Leitz DMRX betrachtet und mit einer Sony 3CCD Color Video Camera aufgenommen. Als Software für die Aufnahme und das Speichern der Bilddateien wurde das Programm Optimas 6.5. benutzt.

5.2.1. Gefrierschnitte

Von den histologischen Schnitten wurden jeweils bei einer 200fachen Vergrößerung sechs Gesichtsfelder im Mikroskop eingestellt, so dass der gesamte periimplantäre Rand untersucht und als Bilddatei gespeichert wurde. Die Gesichtfelder lagen dabei am implantatnahen Geweberand (Interface). Dabei wurden pro Gesichtsfeld die positiv gefärbten Zellen und die abgelösten Polymerpartikel ausgezählt.

5.2.2. Polymer/Paraffinschnitte

Die gefärbten Paraffinschnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Dabei wurden folgende Kriterien beachtet:

Polymerrand (H.E.-Färbung):

Der Polymerrand wurde bei Auflicht mit einer 500fachen Vergrößerung betrachtet und auf Unregelmäßigkeiten sowie Aufrauhungen speziell an der dem Gewebe anliegenden Seite hin untersucht. Der Grad der Aufrauhung wurde in einem vom Untersucher festgelegten Score beschrieben.

+	leichte Aufrauhung:	am Polymerrand sind wenig Unebenheiten zu erkennen
++	mittlere Aufrauhung:	der Polymerrand ist unregelmäßig
+++	starke Aufrauhung:	der Polymerrand weist deutliche Unebenheiten auf
++++	sehr starke Aufrauhung:	der Polymerrand ist stark zerklüftet, Polymerstücke sind
		herausgebrochen

Periimplantäres Gewebe am Polymer (H.E.-Färbung):

Die Paraffinschnitte des periimplantären Gewebes, welches direkt am Polymer lag, wurden mit Durchlicht bei einer 500fachen Vergößerung betrachtet und hinsichtlich auftretender Zellen, besonders Entzündungszellen, und Art des Gewebes untersucht.

Zusätzlich wurde mittels polarisiertem Licht auf doppelbrechende Strukturen im periimplantären Gewebe geachtet. Die Einteilung der Doppelbrechung im periimplantären Gewebe wurde durch einen vom Untersucher festgelegten Score beschrieben.

Keine Doppelbrechung:	0	keine doppelbrechenden Strukturen feststellbar
Geringe Doppelbrechung: -	÷	vereinzelt doppelbrechende Strukturen feststellbar
Mittlere Doppelbrechung: -	++	mindestens die Häflte des Gewebes zeigt Doppel-
		brechung
Starke Doppelbrechung: +	-++	mehr als die Hälfte des Gewebes weist
		doppelbrechende Strukturen auf

Zusätzlich wurde das periimplantäre Gewebe mittels Trichromfärbung nach Masson-Goldner auf Bindegewebe und Kollagen hin untersucht.

Die histologischen Bilder der H.E.- und der Antikörperfärbung wurden in den Computer eingescannt, die Bilder der Trichromfärbung nach Masson-Goldner mit einer Photokamera aufgenommen.

6. Optical Coherence Tomography (OCT) Messung

OCT steht für Optical Coherence Tomography.

Das Grundprinzip dieser Methode besteht in der Überlagerung von Lichtstrahlen, die eine kurze Kohärenz aufweisen. Das ermöglicht die sehr genaue Messung von Abständen durch eine Selektion von Photonen nach der von ihnen zurückgelegten Weglänge. Da die Streuung und Absorption der Photonen in unterschiedlichen Gewebetypen verschieden ist, kann man diese Eigenschaft des Gewebes bei der Erzeugung tomographischer Schnittbilder ausnutzen.

Mit einem fokussierten Lichtstrahl einer Superlumineszenzdiode wurde die Gewebe- oberfläche beleuchtet. Die aus der Tiefe des Gewebes zur Oberfläche zurückgestreuten Photonen wurden durch kohärente Überlagerung selektiv detektiert. Dabei wurde durch die Veränderung der Referenzlänge die von den Photonen zurückgelegte Weglänge abgescannt. Durch das Zusammensetzen einer Folge von Tiefenscans in lateraler Richtung enstand ein tomographisches Schnittbild. Das tomographische Bild der Polymere wurde untersucht bezüglich Vorhandensein von Gewebe an der Polymeroberfläche und Einwachsen des Gewebes in das Polymer. Dabei wurden von NMRI und NMRI nu/nu Mäusen jeweils drei Polymerproben der Implantationszeiten von 1, 3 und 9 Wochen untersucht. Pro Polymer wurden drei Stellen ausgewählt.

7. Endotoxin-Nachweis (LAL-Test)

Die Untersuchung der Polymere auf Endotoxine wurde mit einem quantitativen, chromogenen Endpunkttest für gram negative Bakterien durchgeführt. In dieser Methode wurden ein modifiziertes Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) und ein synthetisches, chromogenes Substrat zur Endotoxinbestimmung eingesetzt. Die beschriebene Methode wurde gemäß den FDA-Richtlinien (1987) durchgeführt.

Durch die einmalige Waschung der Polymere mit 1ml pyrogenfreiem LAL-Wasser wurde eine flüssige Testlösung hergestellt. Diese Probe wurde mit dem LAL-Reagenz gemischt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des chromogenen Substrates wurde die Probe weitere 6 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Stop-Reagenz beendet.

Bei Vorhandensein von Endotoxin in der Probe entsteht eine gelbe Färbung. Dabei wird ein Enzym aktiviert, das p-Nitroanilin aus dem synthetischen Substrat freisetzt und das Reaktionsgemisch gelb färbt. Die Absorption der Probe kann spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen werden. Da diese Absorption direkt proportional zu der vorhandenen Endotoxinmenge ist, kann die Endotoxinkonzentration mittels einer Standardkurve berechnet werden.

8. Statistik

Nach Rücksprache mit der Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm wurden die Ergebnisse in deskriptiver Form dargestellt. Die ermittelten Zellzahlen und Abriebpartikel im Gefrierschnitt wurden mittels Rangsummentest nach Wilcoxon, Mann und Whitney ausgewertet.

V Ergebnisse

1. Klinische Ergebnisse und Einheilung des Polymers

1.1. Allgemeine klinische Beobachtungen:

Während der gesamten Implantationszeit von bis zu 9 Wochen waren an keinem Tier klinische Veränderungen zu beobachten. Postoperativ sind keine Tiere verstorben, eine NMRI nu/nu Maus verstarb intraoperativ. Haltung und Verhalten der Tiere waren bereits drei Stunden postoperativ normal und tierartspezifisch. Innerhalb einer Woche nach Implantation war die Operationsnaht bei beiden Tiergruppen (NMRI Maus, NMRI nu/nu Maus) vollständig und komplikationslos verheilt.

1.2. Makroskopische Beschreibung des Implantatlagers:

Nach dem Öffnen der Haut lag das Implantat gut sichtbar im Gewebe. Es wurde von einer feinen Gewebeschicht bedeckt. Eine typische Kapselbildung im Sinne einer Fremdkörperreaktion war zu keinem Zeitpunkt zu beobachten. Anzeichen von Entzündung oder Nekrose im periimplantären Gewebe waren makroskopisch während der gesamten Untersuchungszeit von maximal 9 Wochen nicht zu beobachten.

1.3. Festigkeit des Polymers im Implantatlager:

Die implantierten Polymerproben ließen sich bei der NMRI Maus nach einer Implantationszeit von einer Woche mit Hilfe einer Pinzette nur mit kräftigem Zug (++) aus dem Gewebe entfernen. Die Integration der Polymerproben mit dem umliegenden Gewebe nahm mit steigender Implantationszeit zu und war nach fünf Wochen nur mit kräftigerem bis starkem Zug aus dem Gewebe zu ziehen (++-+++). Bei einer Implantationszeit von sieben Wochen war im Vergleich zu 5 Wochen eine geringere Festigkeit des Polymers im Implantatlager zu bemerken.

Nach 9 Wochen ließ sich das Polymer nicht mehr durch starken Zug mit der Pinzette am Implantat aus dem Implantatlager entfernen. Die Basalseite des Implantates war dabei sehr fest (++++) mit dem darunterliegenden Gewebe der Maus verbunden.

Bei der NMRI nu/nu Maus war die Integration des Polymers in das Gewebe nach einer Implantationszeit von einer und zwei Wochen nur leicht ausgeprägt (+ bis ++). Das Polymer ließ sich leicht aus dem umgebenden Gewebe mit Hilfe einer Pinzette herausziehen. Während der Implantationszeit nahm der Grad der Integration zu, war ebenfalls bei fünf Wochen am stärksten und ging in der siebten Woche auch leicht zurück. Bei einer Implantationszeit von 9 Wochen war die Integration des Polymers in das Gewebe nahezu vollständig. Die Polymerprobe konnte mit der Pinzette entweder gar nicht oder nur mit starkem Zug aus dem Gewebe herausgezogen werden.

Um Verluste des periimplantären Gewebes zu vermeiden, wurden die Polymerproben bei sehr starker Festigkeit im Implantatlager mittels Skalpell herauspräpariert.

Im Vergleich der beiden Mauspopulationen ließ sich beobachten, dass der Grad der Integration unterschiedlich stark ausgeprägt war. Er war bei der NMRI nu/nu Maus im Vergleich zur NMRI Maus nach Implantationszeiten von 1, 2 und 3 Wochen geringer ausgeprägt. Erst ab einer Implantationszeit von fünf Wochen näherten sich die Werte an und waren bei einer Implantationszeit von neun Wochen praktisch gleich (Tabelle 8, Abb. 6, 6.1, Anhang).

2. Polymer

2.1 Makroskopische Beobachtung

Während der gesamten Implantationszeit zeigte das Polymer makroskopisch keine Veränderungen in Größe, Form und Beschaffenheit.

Eine zusammenfassende Übersicht der makroskopischen Ergebnisse ist in Tabelle 9 (Anhang) dargestellt.

2.2. Lichtmikroskopische Beobachtung

Bei der Betrachtung der Proben unter dem Lichtmikroskop bei 200facher Vergrößerung konnten folgende Beobachtungen gemacht werden.

NMRI Maus:

Ab der ersten Implantationswoche lag bei einigen Polymerproben eine dünne Gewebeschicht auf der Polymerprobe auf (Abb. 8, Anhang). Die Ansammlung von Gewebe nahm während der gesamten Implantationszeit von 9 Wochen zu. Zusätzlich konnten mit zunehmender Implantationszeit Zellen auf der Implantatoberfläche beobachtet werden, die phänotypisch Fettzellen ähnlich waren. In der ersten und zweiten Woche waren diese runden Zellen sehr klein und auf der Implantatoberfläche verstreut. Ab der dritten Woche wurden diese Zellen größer und bildeten Cluster (Abb. 9, Anhang). Das Auftreten dieser Zellen nahm bis zur Implantationszeit von 3 Wochen zu und ab der 5. Woche wieder leicht ab. Zusätzlich konnten während der gesamten Implantationszeit Gefäße auf der Polymeroberfläche beobachtet werden, die von den fettzellähnlichen Zellen umgeben waren. Bereits nach 1 Woche wurden Gefäße im umgebenden Gewebe beobachtet (Abb. 10, Anhang). Das Auftreten von Gefäßen nahm bis zur 7. Woche zu und war noch in der 9. Woche nachweisbar, aber in geringerem Ausmaß (Abb. 11-13, Anhang).

NMRI nu/nu Maus:

Ab der ersten Implantationswoche konnte unter dem Lichtmikroskop auf einigen Implantaten eine feine Gewebeschicht auf dem Polymer beobachtet werden (Abb. 8.1, Anhang). Auch bei der Nacktmaus nahm das Auftreten von Gewebe mit zunehmender Implantationsdauer zu. Nach einer Implantationszeit von drei Wochen konnten auch hier auf der Implantatoberfläche kleine runde Zellen beobachtet werden, bei einem Implantat mit Clusterbildung. Das erste massive Auftreten von runden fettzellähnlichen Zellen trat nach einer Implantationszeit von 7 Wochen auf und war auch noch in Woche 9 gehäuft zu beobachten. Nach einer Implantationszeit von 5 Wochen wurden Gefäßen beobachtet.

(Abb. 11-13, Anhang)

3. Darstellung histologischer Ergebnisse

3.1. H.E. Färbung der Paraffinschnitte des Polymers

3.1.1. Periimplantäres Gewebe

HE-gefärbte Paraffinschnitte des Polymers und der direkt angrenzenden Gewebe wurden lichtmikroskopisch auf Entzündungszellen, Fibroblasten und Kollagenbildung hin untersucht. Nach einer Implantationszeit von einer Woche konnten bei beiden Mauspopulationen einige Zellen (vom Aspekt her Histiozyten) beobachtet werden, die sich in den Polymerrand eingegraben hatten. In der zweiten Woche konnte auf dem Polymer bereits Gewebe bei beiden Mauspopulationen dargestellt werden, das aber sehr zellarm war.

In der fünften Woche nach Implantation stellte sich das Gewebe bei der NMRI Maus direkt angrenzend an das Polymer als dichtes, zellarmes kollagenreiches Band mit einer Dicke von ca. 50 bis 70 μ m dar (Abb. 14, Anhang). Bei der NMRI nu/nu Maus war zu diesem Zeitpunkt lockeres Bindegewebe mit einer Dicke von 20 bis 70 μ m zu beobachten. Zusätzlich enthielt das angrenzende Gewebe bei der Nacktmaus eine große Anzahl an Fibroblasten (Abb. 15, Anhang). Neun Wochen nach der Implantation fand sich bei der NMRI Maus ein straffes zellarmes kollagenreiches Band von ca. 5 bis 10 μ m direkt angrenzend an das Polymer. Ähnliches wurde bei der NMRI nu/nu Maus gefunden. Die Dicke des Gewebes betrug ca. 10 bis 15 μ m. Daran angrenzend war lockeres Bindegewebe zu beobachten.

Bei der Auswertung der Paraffinschnitte war lichtmikroskopisch zu keinem Zeitpunkt ein Einwachsen von Gewebe in das Polymer festzustellen.

3.1.2. Doppelbrechende Kollagenfasern im periimplantären Gewebe

NMRI Maus:

Nach Implantationszeiten von einer und von 2 Wochen war keine Doppelbrechung im periimplantären Gewebe zu beobachten (0). Doppelbrechung im periimplantären Gewebe trat bei der NMRI Maus zum ersten Mal nach einer Implantationszeit von fünf Wochen auf (++). Sie nahm danach mit fortlaufender Implantationszeit zu und war nach 9 Wochen am stärksten (+++). Dabei war das unmittelbar an das Polymer angrenzende periimplantäre Gewebe am stärksten doppelbrechend. Es stellte sich als eine geordnete, längsgerichtete Struktur dar mit einer Dicke von ca. 5-10 µm (Abb. 17, 17.1, Anhang).

NMRI nu/nu Maus:

Doppelbrechung des periimplantären Gewebes der NMRI nu/nu Maus war nach einer und nach zwei Wochen Implantation ebenfalls nicht zu beobachten (0). Eine Doppelbrechung im Gewebe trat erstmals nach 5 Wochen auf, war aber schwächer als bei der NMRI Maus (+). Die Doppelbrechung im periimplantären Gewebes war nach einer Implantationszeit von 9 Wochen am stärksten ausgeprägt (++). Die doppelbrechende Struktur hatte eine Dicke von ca. $10 \,\mu\text{m}$.

Im Vergleich der beiden Mauspopulationen zum Zeitpunkt von 5 und 9 Wochen nach Implantation war das periimplantäre Gewebe der NMRI Maus stärker doppelbrechend als das der NMRI nu/nu Maus zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 18, 18.1, Anhang).

3.1.3 Aufrauhung des Polymerrandes

Bei der Untersuchung des Polymerrandes konnte beobachtet werden, dass sich die Randstruktur im Laufe der Implantationszeit veränderte. Mit zunehmender Zeit nach Implantation konnte bei beiden Mauspopulationen eine zunehmende Aufrauhung des Polymerrandes beobachtet werden. Diese Aufrauhung war nach neun Wochen so stark als wären kleine Polymerstückchen aus dem Polymerrand herausgebrochen (Abb. 16, Anhang). Bei der NMRI nu/nu Maus trat diese Aufrauhung des Polymerrandes früher und stärker auf als bei der NMRI Maus (Tabellen 13, 14, Anhang).

Zusätzlich konnte lichtmikroskopisch mit zunehmender Untersuchungsdauer eine Veränderung in der Oberflächenstruktur der Polymerproben beobachtet werden. Dabei stellten sich die vorher glatte Oberfläche zunehmend stärker strukturiert im Sinne von unebener dar. Dieses Phänomen trat bei der NMRI nu/nu Maus früher auf als bei der NMRI Maus und nahm bei beiden Mauspopulationen bis zur Implantationszeit von neun Wochen zu.

3.2. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

NMRI Maus:

Die Paraffinschnitte des Polymers wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine deutliche Grünfärbung des umliegenden Gewebes auf und liessen damit den Nachweis von Kollagen zu. Dabei erschien das Kollagen mit zunehmender Implantationszeit straffer und stärker organisiert. Nach der ersten und neunten Implantationswoche waren zusätzlich Gefäße, teilweise mit Erythrozyten gefüllt, im periimplantären Gewebe darstellbar (Abb. 19, Anhang).

NMRI nu/nu Maus:

Die Paraffinschnitte des Polymers wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine deutliche Grünfärbung des umliegenden Gewebes auf und liessen damit einen Nachweis von Kollagen zu. Dabei erschien das Kollagen in den ersten Wochen nach der Implantation locker organisiert. Erst mit weiter zunehmender Implantationszeit erschien es am implantatnahen Rand straffer und stärker organisiert. Nach einer Implantationszeit von 5 Wochen waren viele Fibrozyten zu beobachten. Gefäße waren ebenfalls nachweisbar.

3.3 Nachweis von Makrophagen und MHC II-Komplex mittels Immunhistologie

Pro Implantationszeitraum und Tiergruppe wurden 6 Mäuse, auf Grund eines Verlustes in der Gruppe der NMRI nu/nu Mäuse zum Implantationszeitraum von 5 Wochen 5 Mäuse, histochemisch auf die Anwesenheit von Alkalischer Phosphatase untersucht. Je 6 Felder mit jeweils 440 x 300 µm wurden am implantatnahen Geweberand ausgewertet.

Makrophagen

In gesunder Haut gab es 1-2 Makrophagen pro mm². Gewebsmakrophagen wurden bei der NMRI Maus nach einer Implantationszeit von 2 Wochen, bei der NMRI nu/nu Maus zu jedem Zeitpunkt vereinzelt im periimplantären Gewebe gefunden (Tabelle 10, Anhang).

MHC II-Komplex

Zellen, die MHC II–Komplex-positiv waren wurden im periimplantären Gewebe bei beiden Mauspopulationen bereits nach einer Implantationszeit von 1 Woche gefunden. Im Verlauf der Implantationszeiten von 1, 2, 5 und 9 Wochen war bei beiden Mauspopulationen eine Zunahme dieser MHC II-positiven Zellen zu beobachten. Diese Zellen waren immer unmittelbar in dem an das Implantat angrenzenden Geweberand (Interface) zu beobachten (Abb. 20 Anhang). Beim Vergleich der beiden Mauspopulationen konnte man feststellen, dass die Anzahl der MHC II-positiven Zellen bei der NMRI nu/nu Maus deutlich größer war als bei der NMRI Maus (Tabelle 10, Anhang).

3.4. Isolierte Polymerpartikel im periimplantären Gewebe

Bei der Untersuchung der Gefrierschnitte von periimplantären Geweben konnten isolierte Polymerpartikel im implantatrandnahen Gewebe bei beiden Mauspopulationen bereits ab der ersten Woche beobachtet werden. Dabei konnten bei der NMRI nu/nu Maus größere Mengen an isolierten Polymerpartikeln beobachtet werden als bei der NMRI Maus. Die Größe dieser Partikel lag zwischen 5 und 45 µm bei der NMRI nu/nu Maus und zwischen 10 bis 50 µm bei der NMRI Maus (Tabellen 13 und 14, Abb. 20, Anhang).

4. Optical Coherence Tomography (OCT) Messung

Sieben Proben aus der Gruppe der NMRI Mäuse und acht Proben aus der Gruppe der NMRI nu/nu Mäuse der insgesamt 18 untersuchten Polymerproben zeigten Gewebe unterschiedlicher Dicke auf ihrer Oberfläche. Die Dicke der Gewebe betrug 10 µm bis 100 µm und hatte unmittelbar an das Implantat angrenzend straffe, mit zunehmender Implantationsdauer zum Teil bandartige Struktur denen nach außen folgend teils lockere Strukturen angelagert waren (Abb. 25, Anhang). Alle Polymerproben mit Gewebe auf der Oberfläche zeigten, dass das Gewebe auf der Oberfläche auflag, aber nicht in die Probe eingewachsen war. Stellenweise war das Gewebe vom Polymer gelöst. Der Rand der Polymerproben schien teilweise unregelmäßig und durchbrochen (Abb. 23-25.1, Anhang).

5. pH-Wert im Implantationslager

Die pH-Werte, die bei der Explantation der Polymere ermittelt wurden, bewegten sich im Bereich zwischen 8 und 9. Die bei der Explantation mittels pH-Indikatorpapier gemessenen pH-Werte sind in den Tabellen 15 und 16 (Anhang) dargestellt.

Zu Tabelle 15: Die pH-Werte der NMRI Maus zu den Implantationszeiten von 1 und 2 Wochen wurden mit einer anderen Messmethode ermittelt, die sich als nicht mit ausreichender Konstanz durchführbar erwies. Die Werte sind aber zur Vollständigkeit in der Tabelle mit aufgeführt.

6. Endotoxin-Nachweis (LAL-Test)

Die Bestimmung der Endotoxinkonzentrationen mittels quantitativem, chromogenen LAL-Test war negativ. In keinem Fall wurden damit oberflächenassoziierte Endotoxine gefunden.

VI Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einwachsverhaltens und der Biokompatibilität eines neuen Polymers in Abhängigkeit vom T-Lymphozyten-spezifischen Immunsystem. T-Lymphozyten sind an Prozessen wie Hypersensibilitätsreaktion (Thomas, 2003), Wundheilung (Schaffer et al., 1998; Park et al., 2004) Autoimmunerkrankungen, Angiogenese und aseptischer Lockerung von Implantaten und Knochenumbau beteiligt (Blotnick et al., 1994; Farber et al., 2001; Goodman, 2007).

Unsere Untersuchungen wurden am Mausmodell durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses des T-Lymphozyten-spezifischen Immunsystems wurde ein congenitales athymisches Mausmodell (NMRI nu/nu) ausgewählt, das durch eine T-Lymphozyten-Defizienz charakterisiert ist. Als Vergleichsgruppe wurde die entsprechende immunkompetente Auszuchtpopulation (NMRI) verwendet. Runde Proben eines glatten, hydrophoben Polymers, das zuvor in vitro auf seine Biokompatibilität getestet wurde, wurden subkutan in den Halsbereich der beiden Mauspopulationen implantiert. Das neue Polymer zeichnet sich zusätzlich dadurch aus, dass sich seine Eigenschaften wie z.B. die Degradationsgeschwindigkeit in wässrigen Systemen polymer-chemisch variieren lassen (Lendlein et al., 2001; Schmidt, 2002; Steuer, 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass die Einheilung und die Integration bei der NMRI nu/nu-Population verzögert, der degradative Prozess am Polymer und das Aufttreten von MHC IIpositiven Zellen aber verstärkt waren. Die vorliegende Untersuchung weist darauf hin, dass das spezifische Immunsystem vermutlich Einfluß hatte auf das Einwachsverhalten eines Polymers im Weichgewebe der Maus.

56

1. Tiermodell und Implantationsmethode

Tiermodelle spielen in der Untersuchung der Biokompatibilität neuer Implantatmaterialien eine wichtige Rolle. An ihnen läßt sich die Gesamtreaktion des Organismus auf ein implantiertes Material untersuchen.

In der Biomaterialforschung ist die Maus ein etabliertes Tiermodell. Bei der Untersuchung der Biokompatibilität und zellbiologischer Fragestellungen stellt sie ein repräsentatives Versuchstier für den menschlichen Organismus dar (van Luyn et al., 1998; Kidd et al., 2002).

Das Versuchsprojekt untersucht den Einfluss des spezifischen Immunsystems unter besonderer Berücksichtigung von T-Lymphozyten beim Einsatz von einem Copolymer bestehend aus Poly-ɛ-caprolacton und Butylacrylat als Biomaterial.

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Unverträglichkeitsreaktionen wie der Allergie Typ IV auf Implantatmaterialien (Thomas, 2003) sowie bei der aseptischen Lockerung und Osteolyse von Implantaten im Knochenkontakt (Arora et al., 2003). Zusätzlich haben T-Lymphozyten durch die Expression von Zytokinen die Fähigkeit, andere Zellen des Immunsystems, die an einer Fremdkörperreaktion beteiligt sind, wie beispielsweise Makrophagen, zu aktivieren (Ingham et al., 2005). Schließlich haben sie eine regulierenden Funktion bei der Wundheilung (Peterson et al., 1987; Schaffer et al., 1998; Park et al., 2004).

Zur Überprüfung des Einflusses der T-Lymphozyten und des spezifischen Immunsystems wurden congenital athymische NMRInu/nu Mäuse eingesetzt. Dieses Mausmodell ist ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der spezifischen Immunantwort (Rasik et al., 2000; Chircop et al., 2002). Congenital athymische Mäuse bilden durch das Fehlen des Thymus keine funktionellen T-Lymphozyten aus, weisen aber sogenannte Progenitor-T-Lymphozyten, Makrophagen und MHC II-positive Zellen auf (Fortemeyer, 1981; Kindred, 1979). Ab einem Alter von 7 Monaten bis zu einem Jahr können athymische Mäuse T-Lymphozyten mit typischen Oberflächenmarkern ausbilden, die jedoch nicht funktionell sind (Fortmeyer, 1981; MacDonald et al., 1981). Die Tiere unserer Untersuchung waren zum letzten Untersuchungszeitpunkt maximal 6 Monate alt, so dass ein Auftreten dieser extrathymischen T-Lymphozyten unwahrscheinlich war. Bereits in früheren Versuchen wurde dieses Mausmodell zur Untersuchung der Bedeutung der T-Zellen im Biomaterialeinsatz in unserem Institut verwendet. Als Kontrollgruppe wurde der immunkompetente Auszuchtstamm dieser Mauslinie (NMRI Maus) verwendet. An diesem Modell war es möglich, den normalen Ablauf der Wundheilung und der Gewebereaktionen auf ein Polymer bei normalem Immunsystem zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Reaktion auf das Polymer im Weichgewebe wurden die Proben subkutan am Hals der Mäuse implantiert. Die Implantationsstelle am Hals wurde unter dem Aspekt ausgesucht, da sie hier das Einzugsgebiet der Halslymphknoten mit dem Lymphocentrum mandibulare und den Lymphknoten Ln. cervicale superficiale befindet (Vollmershaus, 1984). Die subkutane Implantation ist eine oft benutzte Methode, um die Gewebereaktion auf ein Biomaterial zu untersuchen. Die subkutane Implantation gibt dabei einen guten Hinweis auf die Integration der Biomaterialien in den Körper (Kidd et al., 2002)

2. Integration des Polymers (Wechselwirkung zwischen Gewebe und Implantat)

Für den Einsatz und den Erfolg eines Biomaterials ist eine funktionelle Integration in das umliegenden Gewebe besonders wichtig (Vogel et al., 2003). Die erfolgreiche Integration eines synthetischen Materials wird durch seine chemische Zusammensetzung, Oberflächentopographie, Poren und Porengröße, Größe und Form des Materials (Morehead et al., 1994; Dalu et al., 2000; Tang et al., 2005), aber auch durch die Tierart, in die implantiert wird, Implantationstechnik und Implantationststelle bestimmt (Bakker et al., 1988, 1990). Die zelluläre Interaktion am Gewebe-Biomaterial-Interface ist ein wichtiger Faktor, der die Biokompatibilität eines Biomaterials in vivo bestimmt. Diese Interaktion ist komplex und beinhaltet die Zell-Polymer- und Zell-Zell-Interaktion.

Die Fixierung eines Polymers im Gewebe basiert auf einer chemischen Bindung oder einer Bindung durch physikalische Kräfte (Hench et al., 1971; Bakker et al., 1990). Weitere Komponenten, welche die Integration eines Polymers beeinflussen, sind die Größe und die relative Verschieblichkeit im Gewebe. Zu vermeiden ist zu großer Druck auf das umgebende Gewebe, da es sonst zu Ischämie, Nekrose und chronischer Entzündung kommt (Morehead et al., 1994). Bewegung des Polymers im Implantatlager verursacht u.a. eine anhaltende Gewebeverletzung, die wiederum zu einer chronischen Entzündung oder Störung des Gewebewachstums und damit zu ungenügender Einheilung und Akzeptanz führen (Morehead et al., 1994; Rosengren et al., 1997). Auch hochbewegliche Bereiche als Implantationsorte prädisponieren zu solch einem Verhalten (Costantino et al., 1994).

Da es sich um ein glattes, nicht poröses Polymer handelt, war eine feste Integration in der NMRI Maus bereits nach einer Implantationszeit von einer Woche nicht zu erwarten.

Im Laufe der Implantationszeit nahm der Grad der Integration zu, so dass das Polymer nach 9 Wochen kaum noch aus dem umliegenden Gewebe zu lösen war.

Neben Materialien wie Bioglas (Hench et al., 1971), Glaskeramic (Brömer, 1973), gesintertem Hydroxylapatit (Jarcho et al., 1977) und Titan (Yan et al., 1997) zeigte beispielsweise ein Copolymer aus Polyethylen und Polybutylenterephtalat eine starke Gewebeintegration (Radder et al., 1995)

Eine feste Integration mit zellulärem Einwachsen in das Polymer wurde bisher für poröse

Oberflächen beschrieben. Die Integration poröser Materialien entspricht einer mechanischen Bindung und resultiert aus dem Wachstum von fibrösem Gewebe in die Poren des Materials (Bakker et al., 1990). Für Polymere mit glatter Oberfläche hingegen, wie beispielsweise Silikon, ist beschrieben, dass sie eine fibröse Kapsel entwickeln, die nicht adhärent ist (Campbell et al., 1989; Bakker et al., 1990). In unseren Untersuchungen konnten wir trotz der Verwendung eines glatten Materials eine feste Zelladhäsion an die Oberfläche des Polymers feststellen. Es hatte sich eine dünne fibröse Kapsel um die Polymere bei beiden Mauspopulationen gebildet, die adhärent war. Eine optimale Gewebekompatibilität ist durch eine dünne fibröse Einkapselung charakterisiert (Morehead et al., 1994) und wird als normale Antwort auf ein Biomaterial betrachtet (Tang et al., 1995, 1999). Abkapselungsreaktionen und überschießende Fibrosierung sollen aber vermieden werden (Thomas, 2003). Ein Durchwachsen von Gewebe und Zellen durch das Material hindurch konnten wir während der Implantationszeit von maximal neun Wochen aber nicht beobachten.

Für die Wechselwirkung zwischen Polymer und Gewebe ist die Reaktion an der Implantatoberfläche entscheidend (Tang et al., 1993; Thomas, 2003). Die erste Interaktion, die ein Polymer mit dem Organismus hat, geschieht an Implantatoberflächen über die Anlagerung einer Proteinschicht unmittelbar nach dem initialen Gewebe- oder Blutkontakt (Tang et al., 1999, 2005). Besonders Fibrinogen lagert sich schnell z.B. an hydrophobe Oberflächen von Polymeren an (Tang et al., 1995, 1999). Erwünscht sind eine dichte Oberflächenbenetzung sowie eine Oberflächenstruktur, die Zelladhäsion und Gewebeintegration fördert (Thomas, 2003). Die Oberflächeneigenschaften eines Implantates regulieren in hohem Maße die Proteinadsorption (von Recum et al., 1995; Dalu et al., 2000). Die Proteinadsorption erleichtert die Adhäsion der Zellen (von Recum et al., 1995) und kann die Reaktion der Entzündungszellen und der Fibroblasten und damit auch die fibröse Antwort auf ein Polymer beeinflussen (Tang et al., 1993, 1995; Dalu et al., 2000)

Auch bei der athymischen Maus konnte eine Integration des Polymers in das umgebende Gewebe beobachtet werden. Sie trat im Vergleich zur Normalmaus jedoch zeitlich verzögert ein. Sie nahm ebenfalls mit der Implantationzeit zu, der Grad war aber zum vergleichbaren Zeitpunkt etwas geringer als bei der NMRI Maus. Erst nach 9 Wochen war der Grad der Integration bei beiden Mauspopulationen vergleichbar.

Die Verzögerung im Grad der Integration könnte durch das Fehlen der T-Lymphozyten bei der athymischen NMRI nu/nu Maus bedingt sein. Die zellulären Reaktionen nach der Implantation eines Biomaterials zeigen Ähnlichkeit zu denen bei Wundheilung. Bei jeder Implantation kommt es zu einer Zerstörung des Gewebes und anschließend zur Wundheilung. Der Ablauf der Wundheilung beeinflußt auch die Integration und das Einwachsen eines Implantates.

Unter bestimmten Umständen wie beispielsweise Immunsuppression ist die Heilung beinträchtigt und verzögert (Rasik et al., 2000; Chircop et al., 2002). Auch die Wundheilung bei athymischen Mäusen ist gestört und verzögert und durch eine verminderte Wundstärke charakterisiert (Barbul et al., 1990; Efron et al., 1990).

T-Lymphozyten sind möglicherweise nicht nötig, um Wundheilung zu initiieren, aber sie haben v.a. in der späten Proliferationsphase mindestens eine regulatorische Wirkung (DiPietro, 1995). T-Lymphozyten haben u.a. eine regulatorische Funktion auf Fibroblasten (Barbul et al., 1990). Fibroblasten innerhalb der Wunde sind die Hauptelemente für die Produktion und Reorganisation der Strukturproteine, die für die Wundreparation benötigt werden. Die vorherrschenden Zellen, die sich an die Proteinschicht an der Polymeroberfläche anlagern, sind Fibroblasten. Sie bilden unreifes Kollagen auf der Polymeroberfläche und eine fibröse Kapsel oder verursachen das Eindringen von Kollagenfasern, und sichern damit das Polymer an der Implantationstelle (Morehead et al., 1994). Fibroblasten ersetzten Fibrin und produzieren Kollagen als Basis für das Wachstum von anderen Zellen wie beispielsweise Endothelzellen (Beahan et al., 1982). Dabei wird das zuvor neu gebildete Kollagen reorganisiert, was in einer zunehmenden Wundstärke resultiert (Barbul et al., 1990, 1995).

Diese Umbildung des Wundgewebes und die Zunahme der Festigkeit der Wunde ist bei der NMRI nu/nu Maus beeinträchtigt.

Kollagen I zeichnet sich optisch dadurch aus, dass es doppelbrechend ist, im Gegensatz zu Kollagen III. Zusätzlich nimmt aufgrund der Strukturänderung die Doppelbrechung mit zunehmendem Alter des Kollagens zu. Die Stärke der Doppelbrechung des Reparationsgewebes korreliert mit der Menge des Kollagens. Aufgrund der Änderungen der Doppelbrechung des Kollagens läßt sich eine Altersbestimmung des Wundgewebes durchführen.

Untersuchungen im Lichtmikroskop unter polarsiertem Licht ergaben, dass nach 3 Wochen bei beiden Mauspopulationen keine Doppelbrechung im Gewebe zu beobachten war. Erst nach 5 Wochen zeigte sich bei der NMRI Maus eine Doppelbrechung, die bis zur Implantationszeit von 9 Wochen zunahm. Die Doppelbrechung bei der NMRI nu/nu Maus war geringer als bei der NMRI Maus, nahm aber ebenfalls zu. Erklären läßt sich dies mit dem unterschiedlichen Kollagenalter des periimplantären Gewebes, das bei der NMRI nu/nu Maus jünger war als bei der NMRI Maus. Zusätzlich erschien das periimplantäre doppelbrechende Gewebe straffer und kollagenfaserreicher als bei der NMRI nu/nu Maus zum vergleichbaren Zeitpunkt. Dass es sich bei beiden um Kollagen handelte, hat die selektive Grünfärbung mittels Trichromfärbung nach Masson-Goldner und die H.E. Färbung der Gewebeschnitte gezeigt. Dass es sich um Kollagen I handelte, zeigte die Doppelbrechung. Zusätzlich wurden bei der NMRI nu/nu Maus zum Zeitpunkt von 5 Wochen im periimplantären Gewebe zahlreiche Fibroblasten beobachtet.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei beiden Mauspopulationen eine Integration des Polymers ins Gewebe stattfand. Die verzögerte und anfangs weniger starke Integration bei der athymischen NMRI nu/nu Maus könnte dabei durch das Fehlen der T-Lymphozyten verursacht sein, da diese u.a. die Bildung und Alterung des Kollagen regulieren.

3. Periimplantäre Mikrovaskularisation

Für die funktionelle Integration eines Biomaterials in das Gewebe sind Gefäße sehr wichtig. Ein ungenügender Transport zwischen der Mikrovaskularisation und dem implantierten Polymer setzt der biomedizinischen Anwendungen von Polymeren wie beispielsweise beim Tissue Engineering häufig Grenzen (Sieminski et al., 2000). Die Integration eines Biomaterials in das umgebende Gebwebe wird wahrscheinlich gefördert, wenn Gefäße in der periimplantären Umgebung sind (Sanders et al., 2002). Gefäße sind wichtig für die Versorgung des neu gebildeten Gewebes mit Nährstoffen, Signalstoffen und Atemgasen (Sieminski et al., 2000; Kidd et al., 2002) und für den Abtransport von Degradationsprodukten. Zudem können Blutgefäße im periimplantären Gewebe die Integration eines Biomaterials erleichtern, in dem Degradationsprodukte des Biomaterials effektiv aus dem Implantatlager entfernt werden können und damit das physiologische Milieu im Implantatlager reguliert wird (Kidd et al., 2002; Binzen et al., 2003).

Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der ein Zusammenspiel zwischen Zellen und Wachtumsfaktoren beinhaltet und der durch die Neubildung von Gefäßen aus bestehenden Gefäßen charakterisiert ist (Liekens et al., 2001; van Amerongen et al., 2002). Pathophysiologisch geschieht dies beispielsweise bei der Wundheilung und bei einer Fremdkörperreaktion. Die Revaskularisation erfolgt im Rahmen der Wundheilung parallel zur Fibroplasie. Die Mediatoren für endotheliales Zellwachstum und zur Chemotaxis sind u.a. Zytokine, die z.B. durch Thrombozyten, Makrophagen und Lymphozyten in der Wunde sezerniert wurden. Potentielle Mediatoren der Angiogenese sind beispielsweise bFGF, IL1 und VEGF (Barbul et al., 1995). Das Eindringen von neuen Gefäßen in ein Biomaterial und ins periimplantäre Gewebe ist ein wichtiges Kriterium der Fremdkörperreaktion (Padera et al., 1996; Pieper et al., 2000). Komponenten, die die Fremdkörperreaktion, die Struktur und Funktion der Mikrovaskularisation beeinflussen, sind die Mikroarchitektur des Biomaterials, die physiko-chemischen Eigenschaften sowie der Implantationsort (Sieminski et al., 2000).

Besonders die Mikroarchitektur der Oberfläche eines Implantates beeinflußt das Ausmaß der Gewebereaktion. Die Porengröße beeinflußt die Bildung einer vaskulären Kapsel, deren Blutgefäße in direktem Kontakt mit der Materialoberfläche stehen. Untersuchungen zeigten, dass nicht-poröse Materialien dichte Gewebekapseln mit einer geringen Gefäßanzahl induzierten (Sharkawy, 1998).

Materialien, die zuvor untersucht worden sind, zeigten nur Blutgefäße in der Nähe der Oberfläche eines Biomaterials, wenn dieses Material porös (Florey, 1962; Clowes et al., 1986) und degradierbar war (Greisler et al., 1986). Die physiko-chemischen Eigenschaften des Biomaterials beeinflussen die Proteinadsorption an die Implantatoberfläche und damit die weitere Oberflächenanlagerung von Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten, die durch eine Ausschüttung angiogener Wachstumsfaktoren die Neubildung von Gefäßen fördern (Tang et al., 1998b; Sieminski et al., 2000). Unterschiede in der Fremdkörper- und Entzündungsreaktion können in einer unterschiedlichen Gefäßantwort auf das Biomaterial resultieren (Kidd et al., 2002). Entzündungszellen produzieren chemotaktische und angiogene Faktoren, die beide die Langzeitfunktion eines Biomaterials beeinflussen können (Kidd et al., 2002). Neben Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beeinflussen auch T-Lymphozyten die Angiogenese. Diese wird vermittelt durch spezifische Wachstumsfaktoren, wie VEGF, bFGF und HB-EGF, die die Wanderung und Proliferation von Gefäßzellen stimulieren (Blotnick et al., 1994; Chircop et al., 2002). Durch die Ausschüttung von Zytokinen regulieren T-Lymphozyten die Proliferation und Migration der Endothelzellen (Lutty et al., 1983; Naldini et al., 2003). Zytokine der T-Lymphozyten können die Angiogenese direkt oder indirekt beinflussen (Liekens et al., 2001; Naldini et al., 2003). Lymphozyten spielen eine Rolle als Effektorzellen für die Angiogenese und sind verantwortlich für die lymphozyteninduzierte Angiogenese (Kaminski et al., 1988; Mor et al., 2004). CD4- und CD8-positive Lymphozyten produzieren VEGF (Freeman et al., 1995) und bFGF (Blotnick et al., 1994), während HB-EGF nur von CD4-positiven Lymphozyten ausgeschüttet wird (Blotnick et al., 1994). Von T-Lymphozyten abstammendes HB-EGF stimuliert u.a. die Proliferation der glatten Muskelzellen während bFGF die Proliferation der Endothelzellen fördert (Blotnick et al., 1994).

In unserer Untersuchung konnten bereits nach einer Woche in der Gruppe der NMRI-Mäuse Gefäße auf der glatten, nicht-porösen Polymeroberfläche beobachtet werden. Zusätzlich konnten Cluster von runden, durchsichtigen Zellen um und entlang der Gefäße beobachtet werden. In Gebieten ohne diese Zellen, die phänotypisch Fettzellen sehr ähnlich sind (Jung et al., 1995), waren auch keine Gefäße zu beobachten. Das Auftreten von Zellclustern und Gefäßen nahm mit steigender Implantationszeit zu. Im Gegensatz dazu konnten bei der T-Lymphozyten-defizienten NMRI nu/nu Maus erst zu einem späteren Zeitpunkt Gefäße und auch Zellcluster auf der Polymeroberfläche beobachtet werden. Die Gefäße bei beiden Mauspopulationen wiesen teilweise Erythrozyten auf, ein Hinweis darauf, dass sie perfundiert waren.

Die Unterschiede zwischen den beiden Mauspopulationen bezüglich der Neubildung der Gefäße im Implantatlager weisen darauf hin, dass die Angiogenese im Rahmen der Einheilung und Integration eines Polymers durch T-Lympozyten beeinflußt wird. Neben den von den T-Lymphozyten direkt produzierten angiogenen Wachstumsfaktoren kann die Angiogenese auch indirekt beeinträchtigt sein. T-Lymphozyten regulieren die Aktivität der Endothelzellen und haben u.a. auch eine regulierende Funktion auf Makrophagen, die ebenfalls angiogene Faktoren wie bFGF und IGF-1 produzieren (Chircop et al., 2002). Daher kann bei athymischen Tieren die Produktion angiogener Wachstumsfaktoren und die Aktivität anderer Zellen, wie beispielsweise der Endothelzellen und Makrophagen, reduziert sein, so dass, wie in unserem Fall, auch ein zeitlich verzögertes Auftreten von Gefäßen zu beobachten ist.

4. Zelluläre Reaktionen auf das Polymer

Ein Polymer als Biomaterial ist ein Fremdkörper und löst je nach Größe, Gestalt und Beschaffenheit verschiedene Abwehrreaktionen wie Phagozytose und Entzündung aus (Anderson et al., 2008). Ausgelöst werden die Reaktionen zum einen durch das Biomaterial selber und zum anderen durch Substanzen, die aus dem Fremdkörper herausgelöst werden oder durch Abrieb bzw. Abbau entstehen.

Biodegradierbare Polymere können, wie das von uns verwendete Polymer, hydrolytisch oder enzymatisch abgebaut werden (Kelch et al., 2007). Abriebpartikel können aber auch durch mechanischen Streß entstehen (Tang et al., 1995) . Das Verhalten im Interface kann zu morphologischen Änderungen an der Oberfläche des Materials führen. Die Vorgänge können zu einer Aufrauhung glatter Oberflächen führen (Bakker et al., 1990). In unserer Untersuchung konnten wir ebenfalls einen degradativen Prozess am Polymer beobachten, der bei der NMRI nu/nu Maus stärker war als bei der NMRI Maus.

Die durch solche degradativen Prozesse entstandenen Abriebpartikel eines Biomaterials fördern die Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen (Hoffmann et al., 1997; Bainbridge et al., 2001). In unserer Untersuchung haben wir einen stärkeren degradativen Prozess bei den athymischen Mäusen beobachtet, der vermutlich auf einer verstärkten Aktivierung der Makrophagen beruht. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Anzahl von MHC II-positiven Zellen im periimplantären Gewebe der athymischen Mäuse beobachtet werden. MHC II-Expression und Antigenpräsentation sind Charakteristika von aktivierten Makrophagen.

Ein weiterer Mechanismus der MHC II-Expression läuft über die an das Polymer angelagerten Proteine. Der Mechanismus der Entzündungsantwort beginnt mit der sehr frühen Interaktion zwischen Biomaterial und den umgebenden Wirtsproteinen. Beim Einsetzen eines Materials wird dessen Oberfläche direkt mit einer Schicht von Proteinen wie Fibrinogen, Albumin und Immunglobulin G bedeckt (Tang et al., 1995, 1998b). Diese Proteinschicht beeinflußt die Antwort des Organismus auf ein Biomaterial. Fibrin adsorbiert leicht an hydrophoben Oberflächen. (Tang et al., 1995, 1999). Die Interaktion von Fibrin mit der hydrophoben Oberfläche führt zu einer Freisetzung vorher versteckter Epitope. Es kann zur Bildung von Neuantigenen durch die Interaktion des Materials mit Wirtsproteinen kommen. Materialpartikel, die sich durch Abbau aus dem Biomaterial gelöst haben oder durch Abrieb entstanden sind, werden mittels MHC II-Komplex so präsentiert wie Fremdantigene (Petillo et al., 1994; van Luyn et al., 1998). Dies wurde auch schon bei anderen Materialien beobachtet (Bainbridge et al., 2001; Thomas, 2003).

Die zellspezifische Immunantwort beinhaltet das Zusammenspiel verschiederner Zellarten. Neben den Makrophagen sind dies B-Lymphozyten, Natural Killer Cells und die spezifischen T-Lymphozyten (Sharp et al., 1984; Underhill et al., 1999). Aktivierte T- Lymphozyten können durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon γ die Expression von MHC II verstärken (Bancroft et al., 1986).

In vorherigen Versuchen mit immuninkompetenten Mäusen konnte eine MHC II-Expression beobachtet werden, und man geht davon aus, dass athymische Mäuse für die MHC II-Induktion keine Anwesenheit von reifen T-Lymphozyten benötigen (Lu et al., 1981; Sharp et al., 1984), sondern dass ein T-Lymphozyten unabhängiger Mechanismus in der athymischen Maus vorliegt (Sharp et al., 1984; Bancroft et al., 1986). Zudem scheint die Aktivität und Funktion der Makrophagen verstärkt (Sharp et al., 1984) und die Antigen präsentierende Kapazität der Makrophagen bei athymischen Mäuse identisch mit derjeniger immunkompetenter Tiere zu sein (Lu et al., 1981; Miyazaki et al., 1983).

Es gibt Hinweise auf einen suppressiven Effekt der T-Lymphozyten auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen (Zinkernagel et al., 1975; Sharp et al., 1984). Dies könnte die verstärkte Polymerdegradation der athymischen T-Lymphozyten-defizienten Maus erklären.

Die MHC II-Expression ist abhängig von der Art der Entzündung und kann somit auch durch das Biomaterial bestimmt sein (Lu et al., 1981). Im Falle von Fremd- bzw. Biomaterialien gibt es einige Materialien, die eine MHC II-Expression induzieren. Dazu gehören beispielsweise Bariumsulfat und synthetische Blockpolymere, wie z.B Copolymere aus Polyoxypropylen und Polyoxyethylen (Howerton et al., 1990). Außerdem wurde eine MHC II-Expression oft nach der Applikation von Materialien wie Poly(l-lactid-acid), mit Hydroxylapatit beschichteten Materialien, Polymethylsiloxanen und Titan beschrieben (Santavirta et al., 1991; Petillo et al., 1994; Torgersen et al., 1995; van Luyn et al., 1998).
Normalerweise benötigt die Zunahme von MHC II-positiven Zellen an der Infektionsstelle eine T-Lymphozytenaktivität, v.a. die Produktion eines T-Lymphozyten-abhängigen löslichen Proteins, MIRF, dem Makrophagen-Ia-recruiting-faktor (Lu et al., 1981).

Jiranek (Jiranek et al., 1995) und Khouw (Khouw et al., 2000c) zeigten, dass Mäuse mit verschiedenen Immundefiziten auf partikuläres PMMA in ähnlicher Weise reagierten wie immunkompetente Mäuse und die Makrophagen beider Mauspopulationen IL1 produzierten. Sie schlossen daraus, dass die Fremdkörperreaktion durch Makrophagen initiiert ist und dass T-Lymphozyten und von T-Lymphozyten produzierte Zytokine für diese Antwort nicht notwendig sind.

4.1. Polymer und isolierte Polymerpartikel

Kleine Partikel werden von Phagozyten aufgenommen. Sind diese Substanzen nicht chemisch aktiv und geht von diesen Substanzen keine schädigende Wirkung aus, dann werden sie ohne weitere Gewebereaktion im Zytoplasma der Phagozyten abgelagert und schließlich mit der Lymphe abtransportiert. Feindisperse, unlösliche, anorganische Stoffe werden in Phagolysosomen gespeichert. Unlösliche Materialien werden von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen phagozytiert oder umgeben und in Fremdkörpergranulationsgewebe eingebettet und schließlich durch ein Narbengewebe von der Umgebung abgekapselt. Eine solche Abkapselung findet auch bei größeren Partikeln chemisch inaktiver Materialien statt. Die Fremdkörperreaktion wird dann nur durch den mechanischen Reiz unterhalten und läuft weniger stark ab. Größere Fremdkörper, die nicht phagozytiert werden können, können einerseits durch die Freisetzung von Abrieb- oder Abbauprodukten, andererseits rein mechanisch das umgebende Gewebe schädigen.

Isolierte Polymerpartikel können unterschiedliche Reaktionen im Gewebe hervorrufen. So können Abbauprodukte auftreten, die durch Akkumulation im Implantatlager zur Entzündung führen (Hoffmann et al., 1997). Neben lokalen, potentiell toxischen oder karzinogenen Wirkungen können isolierte Polymerpartikel auch zu Allergenen werden, die zu Wundheilungsstörung, Implantatlockerung und T-lymphozytenvermittelter Hypersensibilitätsreaktion führen (Bainbridge et al., 2001; Thomas, 2003; Goodman, 2007).

Im Rahmen der biodegradativen Prozesse, in deren Verlauf die polymere Matrix angegriffen wird, können polymere Partikel phagozytiert werden. Die Oberflächeneigenschaft der Partikel kann dabei die Phagozytose deutlich beeinflussen. Studien zeigen, dass die chemische Zusammensetzung der Partikel die biologische Antwort beeinflusst, und Makrophagen auf PMMA anders reagieren als auf Polystyrol (Tomazic-Jezic et al., 2001).

Ob Partikel von Biomaterialien phagozytiert werden, hängt, wie schon beschrieben, auch von ihrer Größe ab (Morehead et al., 1994; Khouw et al., 2001; Tomazic-Jezic et al., 2001). Tomazic-Jezic beobachtete, dass Biomatrialpartikel, die kleiner waren als 6 µm, von residenten Mausmakrophagen phagozytiert wurden, während sich die Makrophagen an größere Partikel nur anlagerten. Khouw hingegen beobachtete Phagozytose von Partikeln bei einer Größe unter 20 µm. Zusätzlich hat die Größe der Partikel eine Bedeutung hinsichtlich der Aktivierung der Makrophagen. Nicht-phagozytierbare Partikel sollen nicht in der Lage sein, Makrophagen zu stimulieren (Tomazic-Jezic et al., 2001). Green et al. (1998) beschrieb eine Aktivierung der Makrophagen nur bei Partikelgrößen zwischen 3 und 10 µm.

In unserem Falle wurden polymere Partikel in unterschiedlicher Größe von 5 µm bis 50 µm im periimplantären Gewebe beider Mauspopulationen gefunden. Die Partikel waren z.T. von MHC II-positiven Zellen umgeben oder lagen frei im Gewebe. Phagozytose konnte zu keiner Zeit in keiner Mauspopualtion beobachtet werden. Auch andere Untersucher berichten von fehlender oder kaum stattfindender Phagozytose im Rahmen der Testung verschiedener Biomaterialien bei Mäusen (Khouw et al., 2000a; van Amerongen et al., 2002), so dass es möglich ist, dass Mausmakrophagen nicht in der Lage sind, jedes Fremdmaterial zu phagozytieren oder die Makrophagen im Falle der NMRI nu/nu Mäuse nicht vollständig funktionell aktiviert waren.

Dieses Phänomen beschrieb Bancroft et al. (1986). Er fand zwar bei seinen Versuchen ein verstärktes Auftreten von MHC II-positiven Zellen bei der Nacktmaus, aber keine funktionelle Aktivierung, die zur Eliminierung von Bakterien führte.

5. pH-Wert im Implantatlager

Die Wundheilung nach einer Implantation ist ein sehr komplexer Prozess, in dessen Verlauf es auch zu Veränderungen des pH-Wertes im Wundgebiet kommt. Die Wundheilung läuft in verschiedenen Phasen ab. In der exsudativen Phase kommt es zu einer akuten Entzündung. Messungen des pH-Wertes der Extrazellulärflüssigkeit im Entzündungsgebiet ergaben für akute Entzündungen pH-Werte um 6,0 (Lardner, 2001). In der proliferativen und regenerativen Phase kommt es zu einer Normalisierung des pH-Wertes. Bei zunehmender Blut- und Sauerstoffversorgung des Wundfeldes wird die posttraumatische pH-Absenkung des Wundfeldes normalisiert. Dabei werden in der Proliferationsphase pH-Werte im alkalischen Bereich gemessen. Die pH-Wertänderung hat auch eine Bedeutung für den in dieser Zeit der Wundheilung stattfindenden Kollagenaufbau und –abbau. Während der Reparationsphase wird dabei zunächst Kollagen III und dann Kollagen I gebildet. Spezifische Kollagenasen, die am Kollagenabbau und –aufbau beteiligt sind, haben ein Wirkungsoptimum bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 (Lindner, 1987).

Das Gewebe ist ein gepuffertes System, aber nicht so stark gepuffert wie das Blut. Bei einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren oder basischen Bereich, kann der Körper diese Verschiebung abpuffern und regulieren. Wird die während der Wundheilung auftretende pH-Wert-Verschiebung nicht mehr ins physiologische Milieu reguliert, hat dies Auswirkungen auf die Heilung und Regeneration des Gewebes und somit auf das Einwachsen des Implantates. Dies wiederum kann den Erfolg bzw. Mißerfolg eines Materials bedeuten. So hat ein zu saurer pH-Wert auf Zellen und Gewebe einen toxischen Effekt (Hoffmann et al., 1997). Zum anderen kann die pH-Wert Verschiebung auch Auswirkungen auf das Implantat haben, in dem es seine chemischen Eigenschaften verändern kann.

Bei dem verwendeten Polymer handelte es sich um ein elastisches, langzeitresorbierbares Polymer auf der Basis von Poly-ɛ-caprolacton und Butylacrylat. Bei der pH-Wert-Messung direkt im Implantatlager der NMRI und NMRI nu/nu Mäuse wurde ein basischer pH-Wert von durchschnittlich 8 bis maximal 9 gemessen Bei dem Abbau speziell dieser Polymerverbindungen erwartet man jedoch leicht saure Abbauprodukte (Chen et al., 1997), so dass man ein leicht saures Milieu an der Implantatoberfläche vermuten würde. Auch bei zementfixierten Hüftprothesen wurde ein gleichzeitiges Auftreten von Korrosionsphänomenen und niedrigen lokalen pH-Werten beschrieben (Thomas et al., 2000). In früheren Untersuchungen eines Polymers im Rattenmodell wurden allerdings ebenfalls basische pH-Werte im Implantatlager gemessen (Lendlein, 1996). Bei der Herstellung des Materials wurde jedoch mit Trimetylamin eine starke Base verwendet, die sich aus dem Material in vivo herausgelöst haben kann und so die hohen pH-Werte verursacht haben könnte. Die genaue Ursache und der genaue Mechanismus des Auftretens der basischen pH-Werte ist jedoch nicht vollständig geklärt.

Da eine zunehmende und feste Integration des Polymers in das umgebende Gewebe beobachtet wurde, ist ein negativer Einfluß dieser pH-Werte auszuschließen. Inwieweit die basischen pH-Werte im Implantatlager einen positiven oder förderlichen Einfluss auf die Integration des Polymers in das umgebende Gewebe haben ist jedoch unklar und muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

6. Polymere Biomaterialien: Nutzen und Risiken

Polymere finden heute in der Medizin eine weit verbreitete Verwendung (Suh 1998; Lendlein, 1999; Langer, 2000; Neffe et al., 2007). Das von uns verwendete glatte Polymer zeigte sich in den Untersuchungen als sterilisierbar, bioverträglich und über den untersuchten Zeitraum von neun Wochen als schwach abbaubar. Die Fremdkörperreaktion war gering und die Integration ins Bindegewebe der Maus fest. Eine mögliche Anwendung des Polymers wäre beispielsweise als Matrix zum Gewebeersatz oder Gefäßersatz, da es eine starke Anlagerung der Zellen/Zelladhäsion an das Implantat zeigte, was für diesen Einsatz wichtig ist (Sieminski et al., 2000).

Von anderen Polymeren, wie Silikon, ist bekannt, dass sie über lange Zeit zu Entzündungen und Unverträglichkeiten führten. Man vermutet eine immunologische Reaktion, aber der Mechanismus der Silikon- induzierten Entzündung ist unklar (Tang et al., 1995, 1999). Ein weiteres Problem bei glatten Polymeren, wie Silikon, ist die Kontraktion der implantatumgebenden Kapsel, wie sie häufig bei Brustimplantaten beschrieben wird (Campbell et al., 1989).

An porösen Materialien wurden oft mehr Makrophagen mit erhöhter Aktivität und das Vorliegen einer chronischen granulomatösen Entzündung festgestellt. Glatte Materialien werden dagegen mit einer besseren Gewebekompatibilität verbunden (Tang et al., 1998a).

Die Risiken bei der Verwendung von Polymeren als Biomaterial können in der Langzeitanwendung liegen. Es kann zu materialbedingten Komplikationen kommen. So sind beispielsweise fremdkörperinduzierte Tumorbildungen beschrieben worden (Dalu et al., 2000; Moizhess 2008). Der Mechanismus der Tumorentstehung ist nicht ganz klar, aber vermutlich liegt die Ursache in der chronischen Irritation des Gewebes durch den Fremdkörper.

Die Entwicklung von Sarkomen nach der Implantation von Polymeren bei Ratte und Maus wurde bereits in den 50er Jahren beschrieben (Oppenheimer et al., 1955). Dabei scheint auch die Oberfläche der Materialien eine Rolle zu spielen. Glatte Formen unterschiedlicher Polymere wie Polyvinylchlorid oder Polyethylen scheinen nach subkutaner Implantation bei Ratten mehr Tumore zu induzieren als eine rauhe oder textile Form (Oppenheimer et al., 1955). Brand et al. (1973) und Dalu et al. (2000) berichten von Sarkomentwicklung, die bei Nagern durch glatte Materialien wie Polydimethylsiloxan induziert wurde. Maekawa et al. (1984) und Pistner et al. (1993) berichten von Tumorbildung bei Nagern durch glatte Biomaterialien aus Poly-l-lactid. Auch Korrosionspartikel haben das Potential, Veränderungen an den Immunzellen zu induzieren, verbunden mit einem Anstieg der Karzinogenität (Bainbridge et al., 2001).

Fremdkörperassoziierte Tumore sind beim Mensch selten (Moore, 1991) und es dauert lange, bis sich ein Tumor entwickelt. Kasamaki et al. (2000) beschreibt beispielsweise einen Fall von Brustkrebs nach einer Silikonimplantation in die Brust und Brinkley et al. (1980) stellte den Fall einer Tumorbildung um eine Kontaktlinse vor.

Das untersuchte Polymer zeigte ein gutes Einwachsverhalten und eine milde Fremdkörperreaktion. Das Auftreten der Korrosionspartikel im periimplantären Gewebe könnte möglicherweise ein Risikopotential darstellen. Auch der Untersuchungszeitraum von in unserem Fall maximal 9 Wochen ist verhältnismäßig kurz, da das Auftreten von Tumoren nach subkutaner Implantation von polymeren Biomaterialien in Nager erst nach längerer Implantationszeit eintrat (Oppenheimer et al., 1955). Daher müsste das Potential einer tumorfördernden Wirkung des Polymers, seiner glatten Oberfläche und das seiner Abbauprodukte und Korrosionspartikel über einen längeren Zeitraum hin untersucht werden.

VII Zusammenfassung

Polymere Biomaterialien finden in der Human- und Tiermedizin eine breite Anwendung beispielsweise in Form von Nahtmaterialien, als Bestandteile künstlicher Gelenke, im Rahmen des Tissue Engineering und in der Pharmakotherapie (Controlled Drug Delivery).

Ein Biomaterial, das als Implantat in den Organismus eingesetzt werden soll, muß biokompatibel sein. Biokompatibilität berücksichtigt chemische und physikalische Wechselwirkungen des Biomaterials mit dem umgebenden Gewebe sowie die biologischen Reaktionen auf das Implantat. Sie charaktersiert ein Biomaterial bezüglich der Gewebereaktionen nach einer Implantation z.B. als nicht pyrogen, zytotoxisch, antigen, mutagen, karzinogen oder teratogen.

Die Wechselwirkungen eines Biomaterials mit dem Gewebe sind abhängig von der Mikroarchitektur, den physiko-chemischen Eigenschaften und der lokalen Umgebung des Polymers. Die Reaktion des Organismus auf ein Biomaterial hängt auf der einen Seite vom Biomaterial und auf der anderen Seite vom Wirt ab. Dabei spielen T-Lymphozyten als Teil der spezifische Immunantwort eine wichtige Rolle. T-Lymphozyten sind an Prozessen wie Wundheilung, Autoimmunerkrankungen, Bone remodelling, Transplantatabstoßung und Allergie beteiligt. Beim Einsatz von Biomaterialien sind sie wahrscheinlich an der allergischen Unverträglichkeitsreaktion auf Implantatmaterialien und an der periimplantären Osteolyse um und der aseptische Lockerung von Knochenimplantaten beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biokompatibilität und Gewebeintegration eines neuen elastischen, glatten und langzeitstabilen Polymers im Tiermodell unter dem Aspekt der T-Lymphozyten-Defizienz. Bei dem Biomaterial handelt es sich um ein Polymernetzwerk aus Butylacrylat und Poly-ɛ-caprolacton, dessen Eigenschaften bezüglich Degradationskinetik und mechanischer Festigkeit während der Synthese beeinflußbar sind.

Runde Polymerscheiben wurden subkutan in die congenital athymische NMRI nu/nu Maus und den entsprechenden Auszuchtstamm für Implantationszeiträume von bis zu 9 Wochen eingesetzt. Danach wurden die Polymerproben und das periimplantäre Gewebe explantiert und histologisch aufgearbeitet. Es wurden Unterschiede bezüglich des Integrations- und Abbauverhaltens und der zellulären Reaktionen auf das Polymer zwischen der immunkompetenten NMRI Maus und der T-Lymphozyten-defizienten NMRI nu/nu Maus festgestellt. Die Integration des Polymers war angesichts der glatten Oberflächen überraschend gut, erfolgte in der NMRI nu/nu Maus im Vergleich zur immunkompetenten Maus aber zeitlich verzögert.

Bei beiden Mauspopulationen wurden eine milde Fremdkörperreaktion und das Auftreten von isolierten Polymerpartikeln im umgebenden Gewebe beobachtet. Der degradative Prozess war bei der NMRI nu/nu Maus jedoch deutlich stärker. Ebenso deutlich war das Auftreten von MHC II-positiven Zellen, die meist um isolierte Polymerpartikel zu finden waren. Subtile Unterschiede wurden zwischen beiden Mauspopulationen bezüglich des Heranwachsens von Gewebe und der ermittelten pH-Werte im periimplantären Gewebe festgestellt.

Die verzögerte Integration, das verstärkte Auftreten der MHC II-positiven Zellen und die höhere Degradationsrate des Polymers im T-Lymphozyten-defizienten Mausmodell könnte T-Lymphozyten abhängig sein. Dies müsste aber noch genauer untersucht werden.

Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Polymer biokompatibel und auf Grund seiner Eigenschaften für den Einsatz in der Medizin geeignet ist.

VIII Summary

Polymer biomaterials are of increasing importance in human and veterinary medicine. They are used as sutures, part of joint prostheses, tissue engineering and as materials for controlled drug delivery.

The primary requirement of implantable materials in medicine is to be biocompatible with the bodily system. Biocompatibility includes the chemical and physical interaction between biomaterial and periimplant tissue as well as the biological reaction to the biomaterial. Biocompatibility characterizes a biomaterial relating to tissue reaction after an implantation as e.g. not having pyrogenic, cytotoxic, mutagenic, oncogenic or teratogenic characteristics. Factors that influence the extent of the host reaction are the microarchitecture, the physico-chemical properties and the local environment of the biomaterial. The host reaction to an implantable biomaterial is determined by the material itself and the host. In this interaction T-lymphocytes play an important role in the specific immune system. They are involved in wound healing, autoimmune diseases, bone remodelling, transplant rejection and hypersensibility reactions. Concerning the use of biomaterials as medical devices, T-lymphocytes probably participate in allergic reactions to the biomaterial substance and aseptic prosthetic loosening, accompanied by bone destruction adjectent to the prosthesis-bone interface.

The aim of this study was the investigation of the biocompatibility and the integration in the periimplant tissue of a new, elastic, non-porous polymer in an athymic mouse model with T-lymphocyte deficency. The biomaterial is a polymer network composed of butylacrylat and poly- ϵ -caprolacton.The degradation kinetics and the mechanical stability of this new material during synthesis are susceptible.

Round polymer samples were implanted subcutaneously in congenitally athymic NMRI nu/nu mice and the immunocompetent NMRI mice for up to nine weeks. After implantation time, polymer samples and the periimplant tissue were explanted and examined histologically. There were differences between the two mouse populations concerning integration and degradation of the polymer and the cellular reaction to the polymer. The integration of the polymer into the periimplantational tissue was surprisingly very strong, but was delayed in the NMRI nu/nu mice. In both mouse populations a mild foreign body reaction and the appearance of isolated polymer particles in the surrounding tissue could be observed. In the NMRI nu/nu

mice, the process of degradation of the polymer was stronger and the number of MHC IIpositive cells was significantly higher. These cells were observed near isolated polymer particles. There were only subtile differences between the two mouse populations concerning the tissue ingrowth into the polymer samples and the pH in the periimplantational tissue.

The delayed integration, the increased appearance of MHC II-positive cells and the higher rate of degradation of the polymer in the T-lymphocyte deficient mouse model could be T-lymphocyte dependend. This needs further investigation.

Our studies demonstrate out the biocompatibility of the polymer and the applicability for medical use.

IX Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bidest.	bidestillata
BM	Biomaterial
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAM	Chorioallantoismembran
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DWI	Deutsches Wollforschungsinstitut
F	Fibroblasten
FAF	Fibroblast Activation Factor
FDA	Federal Drug Administration
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
H.E.	Hämatoyxlin Eosin
HET	Hühnereitest
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFNγ	Interferon gamma

Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
mg	Milligramm
M.G.	Trichromfärbung nach Masson-Goldner
MHC II	major histocompatibility complex class II
MHC I	major histocompatibility complex class I
MIRF	Macrophage Ia recruiting factor
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
MØ	Makrophagen
nm	Nanometer
NMRI	Naval Medical Research Institute
nu	nude
OCT	Optical Coherence Tomography
OP	Operation
PA	Polyamid
PET	Polyethylenterephthalat.
PBS	phosphat buffered saline
PDS	Poly(p-dioxanon)
PGA	Polyglycolid
PGE ₂	Prostaglandin E2

pН	pondus hydrogenii
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
%	Prozent
RANKL	Rezeptor-Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SPF	spezifisch pathogen frei
TCR	T Cell Receptor
TGFα	Transforming Growth Factor α
TH	T Helfer Zellen
Thy	Thymus
TBS	Tris buffered saline
ΤΝFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
u.a.	unter anderem
UHMWPE	ultrahochmolekulares Polyethylen
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

X Literaturverzeichnis

- Abromson-Leeman, S.R., Jayaraman, S., Dorf, M.E., 1990. Characterization of T cell clones from an athymic mouse. J Immunol 144, 2451-8.
- al Saffar, N., Revell, P.A., 1994. Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. Br J Rheumatol 33, 309-16.
- 3. Anderson, J.M., 1988. Inflammatory response to implants. ASAIO Trans 34, 101-7.
- 4. Anderson, J.M., Rodriques, A., Chang, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol **20**, 86-100.
- Arora, A., Song, Y., Chun, L., Huie, P., Trindade, M., Smith, R.L., Goodman, S., 2003. The role of the TH1 and TH2 immune responses in loosening and osteolysis of cemented total hip replacements. J Biomed Mater Res 64A, 693-7.
- Bailey, A.J., Bazin, S., Sims, T.J., Le Lous, M., Nicoletis, C., Delaunay, A., 1975. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. Biochim Biophys Acta 405, 412-21.
- Bainbridge, J.A., Revell, P.A., Al-Saffar, N., 2001. Costimulatory molecule expression following exposure to orthopaedic implants wear debris. J Biomed Mater Res 54, 328-34.
- Bakker, D., van Blitterswijk, C.A., Hesseling, S.C., Daems, W.T., Grote, J.J., 1990. Tissue/biomaterial interface characteristics of four elastomers. A transmission electron microscopical study. J Biomed Mater Res 24, 277-93.
- Bakker, D., van Blitterswijk, C.A., Hesseling, S.C., Grote, J.J., 1988. Effect of implantation site on phagocyte/polymer interaction and fibrous capsule formation. Biomaterials 9, 14-23.
- Bancroft, G.J., Bosma, M.J., Bosma, G.C., Unanue, E.R., 1986. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. J Immunol 137, 4-9.
- Bang, F.B., 1956. A bacterial disease of Limulus polyphemus. Bull Johns Hopkins Hosp 98, 325-51.

- Barbul, A., Regan, M.C., 1995. Immune involvement in wound healing. Otolaryngol Clin North Am 28, 955-68.
- 13. Barbul, A., Regan, M.C., 1990. The regulatory role of T lymphocytes in wound healing. J Trauma **30**, S97-100.
- 14. Beahan, P., Hull, D., 1982. A study of the interface between a fibrous polyurethane arterial prosthesis and natural tissue. J Biomed Mater Res **16**, 827-38.
- Binzen, E., Rickert, D., Kelch, S., Fuhrmann, R., 2003. Angiogenesis around new ABpolymer networks after one week of implantation in mice. Clin Hemorheol Microcirc 28, 183-8.
- 16. Blotnick, S., Peoples, G.E., Freeman, M.R., Eberlein, T.J., Klagsbrun, M., 1994. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA **91**, 2890-94.
- Brand, K.G., Buoen, L.C., Brand, I., 1973. Brief communication: foreign-body tumorigenesis in mice: most probable number of originator cells. J Natl Cancer Inst 51, 1071-4.
- Brand, K.G., Buoen, L.C., Brand, I., 1976. Multiphasic incidence of foreign bodyinduced sarcomas. Cancer Res 36, 3681-3.
- Brinkley J.R., Zappia R.J., 1980. An eyelid tumor caused by a migrated hard contact lens. Ophthalmic Surg 11, 200-2.
- 20. Brömer, H., Pfeil, E., Käs H.H., 1973. Glas-ceramic material. German patent 2, 326
- Bruck, S.D., 1980. Problems and artefacts in the evaluation of polymeric materials for medical uses. Biomaterials 1, 103-7.
- Burns, J., Pieper, B., 2000. HIV/AIDS: impact on healing. Ostomy Wound Manage 46, 30-40
- Campbell, C.E., von Recum, A.F., 1989. Microtopography and soft tissue response. J Invest Surg 2, 51-74.

- 24. Chen, J., Ma, A., Lai, Y., Chen, Y., Cui, M., 1997. The mechanism of degradation for the absorbable biomaterials poly(epsilon-caprolactone) in vitro and in vivo. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 14, 334-7.
- 25. Chen, G., Sato, T., Ohgushi, H., Ushida, T., Tateishi, T., Tanaka, J., 2005. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. Biomaterials **26**, 2559-66.
- Chircop, M.P., Yu, Y., Berney, C.R., Yang, J.L., Crowe, P.J., Walsh, W.R., 2002.
 Wound healing and growth factor expression in T lymphocyte deficiency. ANZ J Surg 72, 491-5.
- 27. Clowes, A.W., Kirkman, T.R., Reidy, M.A., 1986. Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. Am J Pathol **123**, 220-30.
- 28. Costantino, P.D., Friedman, C.D., 1994. Soft-tissue augmentation and replacement in the head and neck. General considerations. Otolaryngol Clin North Am **27**, 1-12.
- Crotti, T.N., Smith, M.D., Findlay, D.M., Zreiqat, H., Ahern, M.J., Weedon, H., Hatzinikolous, G., Capone, M., Holding, C., Haynes, D.R., 2004. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. Biomaterials 25, 565-73.
- Dalu, A., Blaydes, B.S., Lomax, L.G., Delclos, K.B., 2000. A comparison of the inflammatory response to a polydimethylsiloxane implant in male and female Balb/c mice. Biomaterials 21, 1947-57.
- Damas, J., Bourdon, V., Remacle-Volon, G., Adam, A., 1990. Proteinase inhibitors, kinins and the inflammatory reaction induced by sponge implantation in rats. Eur J Pharmacol 175, 341-6.
- Davis, P.A., Corless, D.J., Aspinall, R., Wastell, C., 2001. Effect of CD4(+) and CD8(+) cell depletion on wound healing. Br J Surg 88, 298-304.
- Davis, P.A., Wastell, C., 2000. A comparison of biomechanical properties of excised mature scars from HIV patients and non-HIV controls. Am J Surg 180, 217-22.
- DeFife, K.M., Yun, J.K., Azeez, A., Stack, S., Ishihara, K., Nakabayashi, N., Colton,
 E., Anderson, J.M., 1995. Adhesion and cytokine production by monocytes on poly(2-

methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-alkyl methacrylate)-coated polymers. J Biomed Mater Res **29**, 431-9.

- 35. DiPietro, L.A., 1995. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. Shock **4**, 233-40.
- 36. Doherty P.J., 1991. Biomaterial-tissue interface Proceeding of the Ninth European Conference of Biomaterials, Chester, UK., September 9-11,. In: European Conference of Biomaterials, Elsevier: Chester, UK., Amsterdam.
- Doillon, C.J., Dunn, M.G., Berg, R.A., Silver, F.H., 1985. Collagen deposition during wound repair. Scan Electron Microsc 897-903.
- Efron, J.E., Frankel, H.L., Lazarou, S.A., Wasserkrug, H.L., Barbul, A., 1990. Wound healing and T-lymphocytes. J Surg Res 48, 460-3.
- 39. Farber, A., Chin, R., Song, Y., Huie, P., Goodman, S., 2001. Chronic antigen-specific immune-system activation may potentially be involved in the loosening of cemented acetabular components. J Biomed Mater Res 55, 433-41.
- 40. FDA 1987. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological Products ang medical devices. US department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Dec. 1987
- 41. Flanagan, S.P., 1966. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.Genet Res 8, 295-309.
- 42. Florey, H.W., 1962. The development of the pseudointima lining fabric grafts of the aorta. Br J Exp Pathol **43**, 655-60.
- 43. Fortmeyer, H.P., 1981. Thymusaplastische Maus (nu/nu), thymusaplastische Ratte (rnu/rnu): Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. Paul Parey: Berlin.
- 44. Freeman, M.R., Schneck, F.X., Gagnon, M.L., Corless, C., Soker, S., Niknejad, K., Peoples, G.E., Klagsbrun, M., 1995. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. Cancer Res 55, 4140-5.

- 45. Gil-Albarova, J., Lacleriga, A., Barrios, C., Canadell, J., 1992. Lymphocyte response to polymethylmethacrylate in loose total hip prostheses. J Bone Joint Surg Br 74, 825-30.
- Goodman, S.B., Huie, P., Song, Y., Schurman, D., Maloney, W., Woolson, S., Sibley,
 R. 1998 Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. J Bone Joint Surg Br 80, 5319.
- 47. Goodman, S.B., 2007. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. Biomaterials **28**, 5044-8.
- 48. Green, T.R., Fisher, J., Stone, M., Wroblewski, B.M., Ingham, E., 1998. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. Biomaterials **19**, 2297-302.
- 49. Greisler, H.P., Schwarcz, T.H., Ellinger, J., Kim, D.U., 1986. Dacron inhibition of arterial regenerative activities. J Vasc Surg **3**, 747-56.
- 50. Haynes, D.R., Crotti, T.N., Potter, A.E., Loric, M., Atkins, G.J., Howie, D.W., Findlay, D.M., 2001. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. J Bone Joint Surg Br 83, 902-11.
- Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C., Greenlee T.K.,1971. Bonding mechanism of the interface of ceramic prosthesis materials. J Biomed Mater Res Symposium 2, 117-141.
- 52. Hoffmann, R., Weller, A., Helling, H.J., Krettek, C., Rehm, K.E., 1997. Local foreign body reactions to biodegradable implants A classification. Unfallchirurg. **100**, 658-66.
- 53. Holder, W.D.J., Gruber, H.E., Moore, A.L., 1997. Increased vascularization and heterogeneity of vascular structures occuring in polyglycolide matrices containing aortic endothelial cells implanted in the rat. Tissue Engineering **3**, 149-60.
- Howerton, D.A., Hunter, R.L., Ziegler, H.K., Check, I.J., 1990. Induction of macrophage Ia expression in vivo by a synthetic block copolymer, L81. J Immunol 144, 1578-84.
- 55. Hunt, T.K., Knighton, D.R., Thakral, K.K., Goodson, W.H., 3rd, Andrews, W.S., 1984. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen

synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. Surgery **96**, 48-54.

- 56. Ingham, E., Fisher, J., 2005. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. Biomaterials **26**, 1271-86.
- 57. Janeway, C., Travers, P., 1997. Immunologie. Kap.4 123-171, Kap.6 207-284, Spektrum Akadem. Verlag: Heidelberg.
- Jarcho, M., Kay, J.F., Gumaer, K.I., Doremus, R.H., Drobeck, H.P., 1977. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. J Bioeng 1, 79-92.
- 59. Jenney, C.R., Anderson, J.M., 2000. Adsorbed IgG: a potent adhesive substrate for human macrophages. J Biomed Mater Res **50**, 281-90.
- Jennings, T.A., Peterson, L., Axiotis, C.A., Friedlaender, G.E., Cooke, R.A., Rosai, J.,
 1988. Angiosarcoma associated with foreign body material. A report of three cases.
 Cancer 62, 2436-44.
- Jiranek, W., Jasty, M., Wang, J.T., Bragdon, C., Wolfe, H., Goldberg, M., Harris, W., 1995. Tissue response to particulate polymethylmethacrylate in mice with various immune deficiencies. J Bone Joint Surg Am 77, 1650-61.
- 62. Jozsa, L., Reffy, A., Balint, J.B., 1984. Polarization and electron microscopic studies on the collagen of intact and ruptured human tendons. Acta Histochem **74**, 209-15.
- Jung, F., Mrowietz, C., Gordz, S., Beller, K.D., Wenzel, E., 1995. Influence of sonographic contrast media on microcirculation in rats. Arzneimittelforschung 45, 1138-41.
- 64. Kaminski, M., Auerbach, R., 1988. Angiogenesis induction by CD 4-positive lymphocytes. Proc Soc Exp Biol Med **188**, 440-3.
- 65. Kanzler, M.H., Gorsulowsky, D.C., Swanson, N.A., 1986. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. J Dermatol Surg Oncol **12**, 1156-64.
- 66. Karp, J.M., Langer, R. 2007. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. Curr Opin Biotechnol **18**, 454-9.

- 67. Kasamaki, S., Tsurumaru, M., Kamano, T., Kobayashi, S., Hino, M., Kuwatsuru, R., 2000. A case of inflammatory breast cancer following augmentation mammoplasty with silicone gel implants. Breast Cancer **7**, 71-4.
- Kelch, S., Steuer, S., Schmidt, A.M., Lendlein, A., 2007. Shape-memory polymer networks from oligo[(epsilon-hydroxycaproate)-co-glycolate]dimethacrylates and butyl acrylate with adjustable hydrolytic degradation rate. Biomacromolecules 8, 1018-27.
- Khouw, I.M., van Wachem, P.B., Molema, G., Plantinga, J.A., de Leij, L.F., van Luyn,
 M.J., 2000a. The foreign body reaction to a biodegradable biomaterial differs between
 rats and mice. J Biomed Mater Res 52, 439-46.
- Khouw, I.M., van Wachem, P.B., Plantinga, J.A., Haagmans, B.L., de Leij, L.F., van Luyn, M.J., 2000b. Foreign-body reaction to dermal sheep collagen in interferongamma-receptor knock-out mice. J Biomed Mater Res 50, 259-66.
- 71. Khouw, I.M., van Wachem, P.B., van der Worp, R.J., van den Berg, T.K., de Leij, L.F., van Luyn, M.J., 2000c. Systemic anti-IFN-gamma treatment and role of macrophage subsets in the foreign body reaction to dermal sheep collagen in rats. J Biomed Mater Res 49, 297-304.
- 72. Khouw, I.M., van Wachem, P.B., Plantinga, J.A., de Leij, L.F., van Luyn, M.J., 2001. Enzyme and cytokine effects on the impaired onset of the murine foreign-body reaction to dermal sheep collagen. J Biomed Mater Res 54, 234-40.
- 73. Kidd, K.R., Dal Ponte, D.B., Kellar, R.S., Williams, S.K., 2002. A comparative evaluation of the tissue responses associated with polymeric implants in the rat and mouse. J Biomed Mater Res **59**, 682-9.
- 74. Kindred, B., 1979. Nude mice in immunology. Prog Allergy **26**, 137-238.
- 75. Langer, R., 1995. 1994 Whitaker Lecture: polymers for drug delivery and tissue engineering. Ann Biomed Eng 23, 101-111.
- Langer, R., 2000. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. Acc Chem Res 33, 94-101.
- 77. Langer, R., Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. Science 260, 920-6.

- Lardner, A., 2001. The effects of extracellular pH on immune function. J Leukoc Biol
 69, 522-30.
- Leenen, P.J., de Bruijn, M.F., Voerman, J.S., Campbell, P.A., van Ewijk, W., 1994. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. J Immunol Methods 174, 5-19.
- Lendlein, A., 1999. Polymere als Implantatwerkstoffe. Chemie in unserer Zeit 5, 279-95
- 81. Lendlein, A. 1996. Synthese, Charakterisiserung, Abbauverhalten und Gewebekompatibilität neuer Polyesterurethane mit variierbarer Abbaugeschwindigkeit für Anwendungen in der Medizin. Eidgenössische Technische Hochschule: Zürich.
- Lendlein, A., Kelch, S., 2002. Formgedächtnispolymere. Angewandte Chemie 114, 2138-62.
- Lendlein, A., Schmidt, A.M., Langer, R., 2001. AB-polymer networks based on oligo(epsilon-caprolactone) segments showing shape-memory properties. Proc Natl Acad Sci USA 98, 842-847.
- 84. Levenson, S., Geever, EF., Crowley LV., Oates, JF., Berard, CW, Rosen, H., 1965. The healing of rat skin wounds. Ann Surg 293-308.
- 85. Levin, J., Bang, F.B., 1968. Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorth **19**, 186-97.
- Levin, J., Bang, F.B., 1964a. A Description of Cellular Coagulation in the Limulus. Bull Johns Hopkins Hosp 115, 337-45.
- Levin, J., Bang, F.B., 1964b. The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood. Bull Johns Hopkins Hosp 115, 265-74.
- Liekens, S., De Clercq, E., Neyts, J., 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. Biochem Pharmacol 61, 253-70.
- Lindner, J., 1987. Neue Ergebnisse der biochemischen Morphologie der Wundheilung,
 In: Wundheilung: Theoretische und praktische Aspekte. Wokalek, H.S., Schöpf E. (Hrsg), 15-65, Springer Verlag: Berlin; Heidelberg; New York.
- 90. Lu, C.Y., Peters, E., Unanue, E.R., 1981. Ia-bearing macrophages in athymic mice: antigen presentation and regulation. J Immunol **126**, 2496-8.

- Lutty, G.A., Liu, S.H., Prendergast, R.A., 1983. Angiogenic lymphokines of activated T-cell origin. Invest Ophthalmol Vis Sci 24, 1595-601.
- 92. MacDonald, H.R., Lees, R.K., Sordat, B., Zaech, P., Maryanski, J.L., Bron, C., 1981. Age-associated increase in expression of the T cell surface markers Thy-1, Lyt-1, and Lyt-2 in congenitally athymic (nu/nu) mice: analysis by flow microfluorometry. J Immunol 126, 865-70.
- 93. Maekawa, A., Ogiu, T., Onodera, H., Furuta, K., Matsuoka, C., Ohno, Y., Tanigawa, H., Salmo, G.S., Matsuyama, M., Hayashi, Y., 1984. Foreign-body tumorigenesis in rats by various kinds of plastics-induction of malignant fibrous histiocytomas. J Toxicol Sci 9, 263-72.
- 94. Malorny, U., Michels, E., Sorg, C., 1986. A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes. Cell Tissue Res 243, 421-8.
- Messow, C., 1960. Regeneration und Entzündung vom Standpunkt der vergleichenden Pathologie., Schaper Verlag: Hannover.
- 96. Minuth, W.W., Sittinger, M., Kloth, S., 1998. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. Cell Tissue Res **291**, 1-11.
- 97. Miyazaki, H., Osawa, T., 1983. Accessory functions and mutual cooperation of murine macrophages and dendritic cells. Eur J Immunol **13**, 984-9.
- Moizhess, T.G., 2008. Carcinogenesis induced by foreign bodies. Biochemistry 73, 763-776.
- 99. Moore, G.E., 1991. Foreign body carcinogenesis. Cancer **67**, 2731-2.
- Mor, F., Quintana, F.J., Cohen, I.R. 2004. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. J Immunol 172, 4618-23.
- 101. Morehead, J.M., Holt, G.R., 1994. Soft-tissue response to synthetic biomaterials.Otolaryngol Clin North Am 27, 195-201.
- Naldini, A., Pucci, A., Bernini, C., Carraro, F., 2003. Regulation of angiogenesis by Th1- and Th2-type cytokines. Curr Pharm Des 9, 511-9.

- 103. Neffe, A.T., Lendlein, A. 2007. Tailoring established polymers for medical applications. Med Device Technol **18**, 14-6, 18-9.
- Nickol, A.D., Bonventre, P.F., 1977. Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens. Infect Immun 18, 636-45.
- 105 Oppenheimer B.S., Oppenheimer E.T., Danishefsky I., Stout A.P., Eirich F.R., 1955. Further studies of polymers as carcinogenic agents in animals. Cancer Res **15**, 333-40.
- 106. Ottaviani, R.A., Wooley, P., Song, Z., Markel, D.C. 2007. Inflammatory and immunological responses to hyaluronan preparations. Study of a murine biocompatibility model. J Bone Joint Surg Am 89, 148-57.
- Padera, R.F., Colton, C.K., 1996. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. Biomaterials 17, 277-84.
- 108. Pantelouris, E.M., 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217, 370-1.
- Park, J.E., Barbul, A., 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. Am J Surg 187, 11-16.
- Parker, J.A., Walboomers, X.F., Von den Hoff, J.W., Maltha, J.C., Jansen, J.A., 2002.
 Soft-tissue response to silicone and poly-L-lactic acid implants with a periodic or random surface micropattern. J Biomed Mater Res 61, 91-8.
- 111. Patel, N., Padera, R., Sanders, G.H., Cannizzaro, S.M., Davies, M.C., Langer, R., Roberts, C.J., Tendler, S.J., Williams, P.M., Shakesheff, K.M., 1998. Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces. FASEB J 12, 1447-54.
- 112. Peterson, J.M., Barbul, A., Breslin, R.J., Wasserkrug, H.L., Efron, G., 1987.Significance of T-lymphocytes in wound healing. Surgery 102, 300-5.
- 113. Petillo, O., Peluso, G., Ambrosio, L., Nicolais, L., Kao, W.J., Anderson, J.M., 1994. In vivo induction of macrophage Ia antigen (MHC class II) expression by biomedical polymers in the cage implant system. J Biomed Mater Res 28, 635-46.
- 114. Pieper, J.S., van Wachem, P.B., van Luyn, M.J.A., Brouwer, L.A., Hafmans, T., Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H., 2000. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. Biomaterials 21, 1689-99.
- Pistner, H., Gutwald, R., Ordung, R., Reuther, J., Muhling, J., 1993. Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. I. Biological results. Biomaterials 14, 671-7.

- 116. Radder, A.M., Leenders, H., van Blitterswijk, C.A., 1995. Bone-bonding behaviour of poly(ethylene oxide)-polybutylene terephthalate copolymer coatings and bulk implants: a comparative study. Biomaterials 16, 507-13.
- 117. Raff, M.C., 1973. Theta-bearing lymphocytes in nude mice. Nature 246, 350-1.
- 118. Rasik, A.M., Shukla, A., 2000. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. Int J Exp Pathol 81, 257-63.
- 119. Remes, A., Williams, D.F., 1992. Immune response in biocompatibility. Biomaterials 13, 731-43.
- 120. Rickert, D., Lendlein, A., Schmidt, A.M., Kelch, S., Roehlke, W., Fuhrmann, R., Franke, R.P., 2003. In vitro cytotoxicity testing of AB-polymer networks based on oligo(epsilon-caprolactone) segments after different sterilization techniques. J Biomed Mater Res 67B, 722-31.
- 121. Romeis, B., 1989. Mikroskopische Technik. Böck, P. (Hrsg), 497-499, Urban&Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore.
- 122. Rosengren, A., Danielsen, N., Bjursten, L.M., 1997. Inflammatory reaction dependence on implant localization in rat soft tissue models. Biomaterials **18**, 979-87.
- 123. Ryan, W.L., Stenback, F., Curtis, G.L., 1981. Tumor promotion by foreign bodies (IUD). Cancer Lett 13, 299-302.
- Saidenberg Kermanac'h, N., Bessis, N., Cohen-Solal, M., De Vernejoul, M.C., Boissier, M.C., 2002. Osteoprotegerin and inflammation. Eur Cytokine Netw 13, 144-53.
- 125. Salthouse, T.N., 1984. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface.J Biomed Mater Res 18, 395-401.
- 126. Sanders, J.E., Baker, A.B., Golledge, S.L., 2002. Control of in vivo microvessel ingrowth by modulation of biomaterial local architecture and chemistry. J Biomed Mater Res **60**, 36-43.
- 127. Santavirta, S., Nordstrom, D., Ylinen, P., Konttinen, Y.T., Silvennoinen, T., Rokkanen, P., 1991. Biocompatibility of hydroxyapatite-coated hip prostheses. Arch Orthop Trauma Surg 110, 288-92.

- Schaffer, M., Barbul, A., 1998. Lymphocyte function in wound healing and following injury. Br J Surg 85, 444-60.
- 129. Schmidt, A.M, 2002. Bioabbaubare Polymernetzwerk-Systeme mit Formgedächtniseffekt und kristallisierbarem Schaltsegment, In: Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. RWTH Aachen: Aachen.
- Schmidt, W., 1938. Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben, In: Abderhalden E. (Hrsg): Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt.V, Teil 10/I, 435–665, Urban & Schwarzenberg Verlag: Berlin.
- 131. Sharkawy, A.e.a., 1998. Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants: III. Effective tissue response times. J Biomed Mater Res 598-605.
- 132. Sharp, A.K., Colston, M.J., 1984. The regulation of macrophage activity in congenitally athymic mice. Eur J Immunol **14**, 102-5.
- 133. Sieminski, A.L., Gooch, K.J., 2000. Biomaterial-microvasculature interactions. Biomaterials 21, 2232-41.
- Singh R., Dahotre, N.B., 2007. Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. J Mater Sci Mater Med 18, 725-51
- 135. Smetana, K., Jr., Holub, M., Slavcev, A., 1989. Foreign body reaction against cellophane in the athymic nude mice. J Biomed Mater Res 23, 947-51.
- Solum, N.O., 1970. Some characteristics of the clottable protein of limulus polyphemus blood cells. Thromb Diath Haemorrh 23, 170-81.
- Sprent, J., Basten, A., 1973. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II.
 Lifespan. Cell Immunol 7, 40-59.
- 138. Steuer, S., Bioabbaubare Polymernetzwerke mit Formgedächtniseffekt als Matrix für Wirkstoff-freisetzungssysteme, In: Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. 2003, RWTH Aachen: Aachen.
- Struck, H., 1987. Biochemie der Wundheilung, In: Wundheilung: Theoretische und praktische Aspekte. Wokalek H., Schöpf E. (Hrsg), 4-14, Springer Verlag: Berlin; Heidelberg; New York.
- 140 Suh, H., 1998. Recent advances in biomaterials. Yonsei Med J **39**, 87-96.

- 141. Tamauchi, H., Tamaoki, N., Habu, S., 1988. CD4+CD8+ thymocytes develop into CD4 or CD8 single-positive cells in athymic nude mice. Eur J Immunol **18**, 1859-62.
- 142. Tang, L., Lucas, A.H., Eaton, J.W., 1993. Inflammatory responses to implanted polymeric biomaterials: role of surface-adsorbed immunoglobulin G. J Lab Clin Med 122, 292-300.
- 143. Tang, L., Eaton, J.W., 1995. Inflammatory responses to biomaterials. Am J Clin Pathol 103, 466-71.
- Tang, L., Jennings, T.A., Eaton, J.W., 1998a. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. Proc Natl Acad Sci USA 95, 8841-6.
- 145. Tang, L., Liu, L., Elwing, H.B., 1998b. Complement activation and inflammation triggered by model biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res 41, 333-40.
- Tang, L., Eaton, J.W., 1999. Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. Mol Med 5, 351-8.
- Tang, L., Hu, W, 2005. Molecular determinants of biocompatibility. Expert Rev Med Devices 2, 493-500
- Teller, J.D., Kelly, K.M., 1979. A turbidimetric Limulus amebocyte assay for the quantitative determination of Gram negative bacterial endotoxin. Prog Clin Biol Res 29, 423-33.
- Theill, L.E., Boyle, W.J., Penninger, J.M., 2002. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Annu Rev Immunol 20, 795-823.
- 150. Thomas, P., 2003. Allergien durch Implantatwerkstoffe. Orthopäde **32**, 60-4.
- 151. Thomas, P., Summer, B., Sander, C.A., Przybilla, B., Thomas, M., Naumann, T., 2000. Intolerance of osteosynthesis material: evidence of dichromate contact allergy with concomitant oligoclonal T-cell infiltrate and TH1-type cytokine expression in the peri-implantar tissue. Allergy 55, 969-72.
- 152. Tomazic-Jezic, V.J., Merritt, K., Umbreit, T.H., 2001. Significance of the type and the size of biomaterial particles on phagocytosis and tissue distribution. J Biomed Mater Res **55**, 523-9.

- Tonna, E.A., Hatzel, G., 1967. Age changes in the distribution of connective tissue elements in human material studies with polarized light microscopy. J Gerontol 22, 281-9.
- 154. Toraldo, G., Roggia, C., Qian, W.P., Pacifici, R., Weitzmann, M.N., 2003. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. Proc Natl Acad Sci USA 100, 125-30.
- 155. Torgersen, S., Moe, G., Jonsson, R., 1995. Immunocompetent cells adjacent to stainless steel and titanium miniplates and screws. Eur J Oral Sci **103**, 46-54.
- 156. Tsuchiya, T., Nakaoka, R., Degawa, H., Nakamura, A., 1996. Studies on the mechanisms of tumorigenesis induced by polyetherurethanes in rats: leachable and biodegradable oligomers involving the diphenyl carbamate structure acted as an initiator on the transformation of Balb 3T3 cells. J Biomed Mater Res **31**, 299-303.
- 157. Tsuchiya, T., Takahara, A., Cooper, S.L., Nakamura, A., 1995. Studies on the tumorpromoting activity of polyurethanes: depletion of inhibitory action of metabolic cooperation on the surface of a polyalkyleneurethane but not a polyetherurethane. J Biomed Mater Res 29, 835-41.
- 158. Tzur, I., Goodship, A.E., Steinman, A., Maltz, L., Oron, U., 1998. Enhancement of bone apposition to stainless steel cortical screws by surface modification using heat treatment: an experimental study. J Orthop Trauma 12, 504-9.
- Underhill, D.M., Bassetti M., Rudensky A., Aderem A., 1999. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. J Exp Med 20, 1909-14.
- Urry, D.W., Pattanaik, A., Xu, J., Woods, T.C., McPherson, D.T., Parker, T.M., 1998.
 Elastic protein-based polymers in soft tissue augmentation and generation. J Biomater Sci Polym Ed 9, 1015-48.
- 161. van Amerongen, M.J., Molema, G., Plantinga, J., Moorlag, H., van Luyn, M.J., 2002. Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice. Angiogenesis 5, 173-80.
- 162. van Luyn, M.J., Khouw, I.M., van Wachem, P.B., Blaauw, E.H., Werkmeister, J.A.,1998. 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 **39**, 398-406.

- 163. van Susante, J.L., Buma, P., Homminga, G.N., van den Berg, W.B., Veth, R.P., 1998. Chondrocyte-seeded hydroxyapatite for repair of large articular cartilage defects. A pilot study in the goat. Biomaterials 19, 2367-74.
- 164. van Vliet, E., Jenkinson, E.J., Kingston, R., Owen, J.J., Van Ewijk, W., 1985. Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. Eur J Immunol 15, 675-81.
- 165. van Vliet, E., Melis, M., Van Ewijk, W., 1984. Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. Eur J Immunol 14, 524-9.
- 166. Vert, M., Li, S., Garreau, H., 1992. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. Clin Mater **10**, 3-8.
- 167. Vogel, V., Baneyx, G., 2003. The tissue engineering puzzle: a molecular perspective.Annu Rev Biomed Eng 5, 441-63.
- 168. Vollmershaus, B. 1984. Lymphatisches System. In: Nickel, R., Schummer A.; Seiferle,
 E.,(Hrsg), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Vol. III, 320-25, Paul Parey: Berlin.
- von Recum, A.F., van Kooten, T.G., 1995. The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. J Biomater Sci Polym Ed 7, 181-98.
- Weigel, T., Schinkel, G., Lendlein, A., 2006. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. Expert Rev Med Devices 3, 835-51.
- 171. Weitzmann, M.N., Cenci, S., Rifas, L., Brown, C., Pacifici, R., 2000. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. Blood **96**, 1873-8.
- Weyand, C.M., Geisler, A., Brack, A., Bolander, M.E., Goronzy, J.J., 1998.
 Oligoclonal T-cell proliferation and interferon-gamma production in periprosthetic inflammation. Lab Invest 78, 677-85.
- 173. Williams, G., 1970. The late phases of wound healing: histological and ultrastructural studies of collagen and elastic-tissue formation. J Pathol **102**, 61-8.

- 174. Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K.L., Luscher, P., Mathey, M., 1996.Tissue engineering scaffolds using superstructures. Biomaterials 17, 83-91.
- 175. Wolman, M., 1975. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. J Histochem Cytochem 23, 21-50.
- 176. Wolman, M., Gillman, T., 1972. A polarized light study of collagen in dermal wound healing. Br J Exp Pathol **53**, 85-9.
- 177. Wolman, M., Kasten, F.H., 1986. Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin. Histochemistry **85**, 41-9.
- 178. Wong, W.H., Mooney, D.J., 1997. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering, In: Atala A.A., Mooney D.J., (Hrsg.): Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Birkhäuser Verlag: Basel.
- 179. Wooley, P.H., Nasser, S., Fitzgerald, R.H., Jr., 1996. The immune response to implant materials in humans. Clin Orthop 63-70.
- Yan, W.Q., Nakamura, T., Kobayashi, M., Kim, H.M., Miyaji, F., Kokubo, T., 1997.
 Bonding of chemically treated titanium implants to bone. J Biomed Mater Res 37, 267-75.
- 181. Young, N.S., Levin, J., Prendergast, R.A., 1972. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. J Clin Invest **51**, 1790-7.
- Zdrahala, R.J., Zdrahala, I.J., 1999. In vivo tissue engineering: Part I. Concept genesis and guidelines for its realization. J Biomater Appl 14, 192-209.
- Zinkernagel, R.M., Blanden, R.V., 1975. Macrophage activation in mice lacking thymus-derived (T) cells. Experientia 31, 591-3.
- 184. Zhu, Y., Chian, K.S., Chan-Park, M.B., Mhaisalkar, P.S., Ratner, B.D. 2006. Protein bonding on biodegradable poly(L-lactide-co-caprolactone) membrane for esophageal tissue engineering. Biomaterials 27, 68-78.
- Zutphen, van L.F.M., Baumanns V., Beynnen A.C. (Hrsg) 1995. Grundlagen der Versuchstierkunde. Kapitel 10, 1-341 G. Fischer: Stuttgart.

XI Anhang

Material:

1. Operationsmaterial:

Besteck:

Irisschere, kantig, gerade, 9 cm	Fa. Hermann Butsch GmbH, Tuttlingen
Gräfe Pinzetten, gerade, 10 cm	Fa. Hermann Butsch GmbH, Tuttlingen
Semken chirurgische Pinzette, 12,5 cm	Fa. Hermann Butsch GmbH, Tuttlingen
Halsey Nadelhalter, gerieft, 13 cm	Fa. Hermann Butsch GmbH, Tuttlingen
Nahtmaterial:	
Prolene monofil, 6-0, C1-Nadel 75 cm	Fa. Ethicon, Norderstedt
Kanülen:	
Einmalkanülen Sterican Größe 20, 18 und 14	B.Braun, Melsungen
<u>Spritzen</u> :	
Einmalspritzen Omnifix 1 ml, 2 ml und 10 ml	B.Braun, Melsungen
CUTFIX-Skalpelle, Größe 22, steril	B. Braun, Melsungen
Einmal-Gesichtsschutzmaske grün	Merck Qualilab, Darmstadt
Handschuhe:	
Sempermed DermaPlus, hell, gepudert	Lohmann-Rauscher, Neuwied
Gazin Tupfer, steril, pflaumengroß	Lohmann-Rauscher, Neuwied

2. Verbrauchsmaterialien Antikörperfärbung:

Poly-L-Lysin Hydrobromid, 0,1%	SIGMA, Steinheim
Neu-Fuchsin	SIGMA, Steinheim
Levamisole Hydrochlorid	SIGMA, Steinheim
Natriumnitrit reinst, 4%	Merck, Darmstadt
N, N-Dimethylformamid	Merck, Darmsatdt
Naphtol-AS-BI-Phosphat Sodium Salt	SIGMA, Steinheim
Goat Serum	SIGMA, Steinheim
TBS-Puffer 0,05 M, pH 8,7, eigene Herstellung:	
TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan z.A.	Merck, Darmstadt
6,06g TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan	
auf 1 Liter destilliertes Wasser	
pH-Wert eingestellt mit NaOH	Merck, Darmstadt

3. Paraffineinbettung der Polymere und histologische Färbung:

Alkohol, 50 %, 75 %, 96 %, 100% Isopropanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Xylolersatzmedium XEM-200	Vogel, Giessen
Mayer's Hämatoxylin	SIGMA Diagnostics, Steinheim
Eosin	SIGMA Diagnostics, Steinheim
Weigerts Eisenhämatoxylin	SIGMA Diagnostics, Steinheim
Ponceau 2R	
Säurefuchsin	Waldeck GmbH & Co KG
Phosphorwolframsäure	DivisionChroma®, Münster
Orange G	
Lichtgrün SF	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt

Paraplast Plus
Rotilabo®Einbettkassetten
Microtome Blade S35
DePex Einschlussmedium

Sherwood Medical, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe Feather, Osaka, Japan Serva, Heidelberg

4. pH-Wert-Messung

<u>pH-Sonden</u> :	
Micro-needle combination pH-Elektrode:	
MI 413 E Tip18 gauge	Fa. Microelectrod
MI 4142E Tip16 gauge	Fa. Microelectrod

pH-Meter:

Microprozessor pH-Meter "pH 95"

Fa. Microelectrodes Inc., Bedford, USA Fa. Microelectrodes Inc., Bedford, USA

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co.KG (WTW), Weilheim

pH-Pufferlösung:

WTW Technische Pufferlösung TPL 4, TPL 7 und TPL 10	WTW, Weilheim
WTW Standard (DIN/NBS) Pufferlösung PL 4 und PL 7	WTW, Weilheim
pH-Indikatorpapier "Neutralit" pH 5-10	Merck, Darmstadt

5. Sonstiges

12-, 24- und 96-Wellplatten	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Formalin 37% für Histologie	Merck, Darmstadt
Trockeneis	Merck, Ulm

Flüssigstickstoff	MIT, Ulm
Tissue-Tek Gewebekleber	Sakura, Torrance, USA
Sterilium Desinfektion	Merck, Ulm
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg
PBS-Puffer, eigene Herstellung:	
PBS-Pulver: Instamed, PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
9,55g PBS-Pulver auf 1 Liter destilliertes Wasser	
2% Paraformaldehyd (PFA), eigene Herstellung:	
PFA-Pulver: Paraformaldehyd zur Synthese	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Herstellung einer 20% igen PFA-Lösung:	
20g PFA-Pulver/100mg destilliertes Wasser	
verdünnen mit TBS bzw. PBS zur Herstellung eine	er 2%igen PFA-Lösung
Analysewaage der AG-Lini	Mettler-Toledo, Gießen
Menzel Superfrost®Plus	VWR International, Ulm
Marienfeld Objektträger	VWR International, Ulm
6. Mikroskope	
6.1. Olympus IMT-2	
<u>Objektive</u> :	
SPlan 10PL 0,30 160/0,17	Olympus, Hamburg
LWD CDPlan 20PL 0,40 160/0-2	Olympus, Hamburg

<u>Kamera</u>: Olympus OM-2N

Olympus, Hamburg

6.2. LEITZ DMRX/DMRD (Mikrophotosystem)	Leica, Wetzlar
<u>Objektive</u> :	
PL Fluotar 10x/ 0,25	Leica, Wetzlar
PL Fluotar 20x/0,45	Leica, Wetzlar
<u>Kamera:</u> Sony 3CCD Color Video Camera	Sony, Köln
7. Bildverarbeitung	
Softwareprogramm Optimas 6.5	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
8. LAL-Endotoxintest	

QCL-1000®

Biowhittaker Europe, Vervier, Belgien

Methoden

Reagenz	Temperatur	Zeit
50 % Alkohol	Raumtemperatur (RT)	10 min
75 % Alkohol	RT	10 min
75 % Alkohol	RT	10 min
96 % Alkohol	RT	10 min
96 % Alkohol	RT	10 min
100 % Alkohol	RT	15 min
100 % Alkohol	RT	15 min
Xylol	60° C	10 min
Xylol	60° C	10 min

1. Entwässerung und Einbettung der Polymerproben in Paraffin

Ausgießen in Paraffin und Lagerung der Paraffinblöcke bei 4° C im Kühlschrank.

2. Protokoll der Antikörperfärbung:

1.	Fixierung in kaltem Azeton	10 min
2.	Trocknen der Schnitte	5 min
3.	Rehydrieren mit TBS	5 min
4.	Inkubieren mit 0,5% Ziegenserum	20 min
5.	Spülen mit TBS	5 min
6.	Inkubieren mit dem Primär-Antikörper	60 min
7.	Spülen mit TBS	3x 5 min
8.	Inkubieren mit Ziege anti Ratte AP-konjugiert	30 min
9.	Spülen mit TBS	3x 5 min
10.	Neu-Fuchsin Färbelösung	5 min
- 11. Spülen mit Leitungswasser
- 12. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, Isopropanol jeweils 1 min
- 13. Eindecken mit Depex

3. Entparaffinierung

Xylolersatzmedium	5 min
96 % Alkohol	5 min
80 % Alkohol	5 min
70 % Alkohol	5 min
Aqua dest.	5 min

4. Protokoll der HE-Färbung

Hämatoxylin (nach Mayer)	7 min
Leitungswasser	3x 5 min
Eosin	5 min
Aqua dest.	kurz spülen
70 % Alkohol	10 sec
80 % Alkohol	30 sec
96 % Alkohol	1 min
Isopropylalkohol	5 min

Eindecken mit Depex

5. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

5.1 verwendete Lösungen:

a) Weigerts Eisenhämatoxylin

b) Ponceau-Säurefuchsin: 0,2 g Ponceau 2R

0,1 g Säurefuchsin

0,6 ml Essigsäure

in 300 ml aqua dest. mischen

c) Phosphorwolframsäure-Orange-G: 4 g Phosphorwolframsäure

2 g Orange G

in 100 ml aqua dest. mischen

d) Lichtgrün: 0,5 g Lichtgrün SF

0,5 ml Essigsäure

in 250 ml aqua dest. mischen

5.2. Protokoll der Trichromfärbung nach Masson-Goldner:

Weigerts Eisenhämatoxylin	2 min
kurz in Aqua dest. spülen	
in fließendem Leitungswasser bläuen	15 min
Aqua dest.	3 min
Ponceau-Säurefuchsin	5 min
in 1%iger Essigsäure auswaschen	5 min
Phosphorwolframsäure-Orange-G	10 min
in 1%iger Essigsäure auswaschen	5 min
Lichtgrün	5 min
in 1%iger Essigsäure auswaschen	5 min
Isopropylalkohol	3x 3 min
Xylolersatzmedium	3 min
Eindecken mit Depex	

Tabellen

- 1. Beispiele für Anwendungsgebiete polymerer Biomaterialien
- 2. Beispiele für Polymere und ihre medizinischen Anwendungsgebiete
- 3. Die Haltungsbedingungen der NMRI Maus
- 4. Die Haltungsbedingungen der NMRI nu/nu Maus
- 5. Narkosemittel
- 6. Primäre Antikörper Ratte anti Maus
- 7. Sekundäre Antikörper
- 8. Grad der Festigkeit des Polymers im Gewebe der NMRI und der NMRI nu/nu Maus
- 8a. Maximal-, Minimalwert- und Median des Grades der Festigkeit des Polymers im Gewebe der NMRI Maus
- 8b. Maximal-, Minimalwert- und Median des Grades der Festigkeit des Polymers im Gewebe der NMRI nu/nu Maus
- 9. Zusammenfassung der makroskopischen Ergebnisse der NMRI und NMRI nu/nu Maus
- Anzahl der positiven Zellen beim Nachweis des MHC II-Komplexes und dem Nachweis von Makrophagen (MØ) mittels Immunhistologie bei der NMRI- und der NMRI nu/nu Maus
- 11. Aufrauhung des Polymerrandes bei der NMRI Maus
- 12. Aufrauhung des Polymerrandes bei der NMRI nu/nu Maus
- Anzahl und Größe der isolierten Polymerpartikel im periimplantären Gewebe der NMRI nu/nu Maus
- 15. pH-Werte im Implantatlager der NMRI Maus
- 16. pH-Werte im Implantatlager der NMRI nu/nu Maus

Tabelle 1. Beispiele für Anwendungsgebiete polymerer Biomaterialien

Anwendungsgebiet	medizinisches Produkt
Herz – Kreislaufsystem	Herzklappen Gefäßprothesen
Dentalchirurgie	Zahnimplantate
Rekonstruktive Medizin	Brustimplantate Nasen-, Kinnprothesen
Ophtalmologie	Kontaktlinsen, Linsen
Orthopädie	Hüft-, Knieprothese Schulter-, Fingerprothesen Bandersatz Material für Osteosynthese

Polymer	Anwendung	sgebiet (Handelsname)	
1. Längerfristig abbaubar (biostabil)			
Polyethylen			
Ultrahochmolekular (UHMWPE)	Pfanne	e für Hüftgelenksprothesen	
	Knieg	elenkimplantate	
	Kathet	terschläuche	
Polyethylenterephtalat (PETP)	Nahtm	naterial (Dacron©)	
	Gefäß	ersatz	
Polyamid (PA)	Nahtm	aterial	
	Herzk	lappen	
Polymethylmethacrylat (PMMA)	Knochenzement		
	Zahnfüllmaterial		
Polytetrafluorethylen (PTFE)	Gefäßimplantate		
2. Kurzfristig abbaubar			
Polyglycolid (PGA)	Nahtmaterial	(Dexon©)	
Poly(p-dioxanon)		(PDS©)	
Poly[(l-lactid)-coglycolid]	Klemmen	(Lactomer©)	

Tabelle 2. Beispiele für Polymere und ihr medizinisches Anwendungsgebiet

Tabelle 3. Die Haltungsbedingungen der NMRI Maus

Käfige	Makrolonkäfige Typ III		
	6 Tiere pro Käfig		
Einstreu	Weichholzspäne, autoklaviert		
Futter	Pellets, Standard-Alleinfutter (Sniff GmbH, Soest),		
	autoklaviert, ad libitum		
Tränke	angesäuertes Wasser		
	(eingestellt mit Salzsäure auf pH 3,5), autoklaviert		
	ad libitum		
Temperatur	21° C		
Rel. Luftfeuchte	55 +/- 10%		
Hell/Dunkel-Rhythmus	12 h/12 h		

Tabelle 4. Die Haltungsbedingungen der NMRI nu/nu Maus

Haltung im Überdruck-Isolator

Käfige	Makrolonkäfige Typ III		
	6 Tiere pro Käfig		
Einstreu	Weichholzspäne, autoklaviert		
Futter	Pellets, Standard-Alleinfutter (Sniff GmbH, Soest),		
	autoklaviert, ad libitum		
Tränke	angesäuertes Wasser		
	(eingestellt mit Salzsäure auf pH 3,5), autoklaviert		
	ad libitum		
Temperatur Isolator	24° C, Heizdecke		
Rel. Luftfeuchte Isolator	55 +/- 10%		
Hell/Dunkel-Rhythmus	12 h/12 h		

Tabelle 5. Narkosemittel

Medikament	Konzentration	Dosierung	Hersteller
Atropinsulfat Injektionslösung	0,5 mg/m	0,05 mg/kg	Braun
Ketamin	100 mg/ml	100 mg/kg	WDT, Garbsen
Xylazin	20 mg/m	5 mg/kg	Bayer Vital GmbH Leverkusen

Tabelle 6. Primäre Antikörper Ratte anti Maus

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Clone BM8	Murine Makrophagen,,Pan"	1:100	DPC Biermann Bad Nauheim
Clone ER-TR3	Maus MHC II	1:100	DPC Biermann Bad Nauheim

Tabelle 7. Sekundäre Antikörper anti Ratte

Antikörper	Konjugation	Verdünnung	Hersteller	
Ziege anti Ratte IgG	Alkalische Phosphatase	1:200	Biozol, Eching	

Implantationszeit	Grad der	Grad der
	Festigkeit	Festigkeit
	NMRI Maus	NMRI nu/nu Maus
1 Woche	+++	++
	++	+
	++	++
	+	++
	++	+
	+++	++
2 Wochen	+++	++
	+++	++
	++	++
	+++	++
	++	+++
	++	+++
3 Wochen	+++	+++
	+++	+++
	+++	+++
	++	++
	+++	++
	++	+++
5 Wochen	++++	++
	+++	+++
	++	+++
	+++	++++
	++++	+++
	++++	-
7 Wochen	++++	++
	+++	++
	+++	++++
	+++	+++
	+++	+++
	+	-
9 Wochen	++++	+++
	++++	++++
	++++	++++
	++++	++++
	+++	++++
	++++	+++

Tabelle 8. Grad der Festigkeit des Polymers im Gewebe der NMRI und NMRI nu/nu Maus

+ = leichte, ++ = mittlere, +++ = starke, ++++ = sehr starke Festigkeit im Gewebe

Zur Definition des Grades der Festigkeit siehe V Methoden, Kapitel 2.

Tabelle 8a. Maximal-, Minimalwert- und Median des Grades der Festigkeit des Polymers im

Gewebe der NMRI Maus

Zeit(Wochen)	1	2	3	5	7	9
Maximalwert	3	3	3	4	4	4
Minimalwert	1	2,5	2	2	1	3
Median	2	2,5	3	3,5	3	4

Tabelle 8b. Maximal-, Minimalwert und Median des Grades der Festigkeit des Polymers imGewebe der NMRI nu/nu Maus

Zeit(Wochen)	1	2	3	5	7	9
Maximalwert	2	3	3	4	4	4
Minimalwert	1	2	3	2	2	3
Median	2	2	3	3	3	4

	Implantationszeit					
Polymer:	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	5 Wochen	7 Wochen	9 Wochen
Veränderungen in						
Größe	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Form	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Kapselbildung:						
NMRI Maus	nein	nein	nein	nein	nein	nein
NMRI nu/nu Maus	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Beschreibung:	Polymer sichtbar, von dünner Gewe- beschicht umgeben, kein Hinweis auf Ent- zündung oder Nekrose	Polymer sitzt zunehr webe, die Entfernun dem Gewebe erfolgt schwerer	nend fester im Ge- g des Polymers aus zunehmend	Zunehmendes Auftre dem Polymer und fes takt mit dem umgebe	ten von Gewebe auf ster werdender Kon- nden Gewebe	Sehr starke Festig- keit des Polymers in das umgebende Gewebe
Integration:	Die Integration des I	Polymers in das umge	sbende Gewebe der N	MRI Maus erfolgt ze	eitlich schneller und	
	rester als in das peri- gleicht sich der Grad	Implantare Gewebe de der Integration beider	er NMKI nu/nu Maus Mauspopulationen ar	. Erst zu einem Zeitp n.	unkt von 9 wochen	

Tabelle 9. Zusammenfassung der makroskopischen Ergebnisse der NMRI und NMRI nu/nu Maus

Tabelle 10. Anzahl der positiven Zellen beim Nachweis des MHC II-Komplexes und dem Nachweis von Makrophagen (MØ) mittels Immunhistologie bei der NMRI- und der NMRI nu/nu Maus

		NMRI nu/nu Maus		NMRI Maus	
		Anzahl positiver Ze	ellen	Anzahl positiver Ze	ellen
Zeit	Mausnr.	MHC II-Komplex	MØ	MHC II-Komplex	MØ
1 Woche	1	30	4	0	0
	2	0	0	2	0
	3	29	10	0	0
	4	2	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	17	0	30	0
2 Wochen	1	37	0	0	0
	2	57	0	4	5
	3	0	3	10	0
	4	24	0	15	1
	5	68	2	9	0
	6	0	0	2	0
5 Wochen	1	45	0	24	1
	2	58	19	0	0
	3	37	0	30	0
	4	8	0	14	0
	5	20	9	9	0
				14	0
9 Wochen	1	56	0	50	0
	2	12	0	7	0
	3	100	0	14	0
	4	60	4	20	0
	5	9	3	26	0
	6	27	0	11	0

Primärer Antikörper zum Nachweis des MHC II-Komplexes: ER-TR3

Primärer Antikörper zum Nachweis von Makrophagen: Clone BM8

Zellzahlen ermittelt nach V Methoden, Kapitel 5.1.1.

•

NMRI Maus (Nr.)	Score Rauhigkeit des Polymerrandes
1 Woche	
19	++
20	+
22	+
2 Wochen	
43	+
46	+ bis ++
44	++
5 Wochen	
56	++ bis +++
57	++ bis +++
59	++ bis +++
9 Wochen	
7	+++
8	++++
11	++++

Tabelle 11. Aufrauhung des Randes von Polymerproben in der NMRI Maus

- + leichte Aufrauhung
- ++ mittlere Aufrauhung
- +++ starke Aufrauhung
- ++++ sehr starke Aufrauhung

Zur Definition des Grades der Aufrauhung siehe V Methoden, Kapitel 5.2.2.

 Tabelle 12. Aufrauhung des Randes von Polymerproben in der NMRI nu/nu Maus

NMRI nu/nu Maus (Nr.)	Score Rauhigkeit des Polymerrandes
1 Woche	
116	+ bis ++
118	++
119	++
2 Wochen	
130	+
131	++ bis +++
132	+++
5 Wochen	
211	+++
214	+++
216	+++
9 Wochen	
163	++++
165	+++
167	++++

+ leichte Aufrauhung

- ++ mittlere Aufrauhung
- +++ starke Aufrauhung

•

++++ sehr starke Aufrauhung

Zur Definition des Grades der Aufrauhung siehe V Methoden, Kapitel 5.2.2.

Tabelle 13. Anzahl und Größe der isolierten Polymerpartikel im periimplantären Gewebe der

NMRI Maus

Implantationszeit	Maus (Nr.)	Partikelanzahl/Gewebeschnitt	Partikelgröße in µm
1 Woche	19	1	15
	20		-
	21		-
	22	1	30
	23		-
	24	2	20, 25
2 Washer	42	1	10
2 wochen	43	1	10
	44	3	- 15, 15, 25
	46		-
	47	7	50, 30, 30, 25, 25, 50, 50
	48		-
5 Wochen	55	2	40, 15
	56	2	25, 15
	57		-
	58		-
	59		-
	60		-
9 Wochen	7	3	10, 20, 40
	8		-
	9	3	25, 35, 20
	10		-
	11		-
	12		-

- = keine isolierten Polymerpartikel im periimplantären Gewebe beobachtet

Zur Ermittlung der Polymerpartikel siehe V Methoden, Kapitel 5.2.1.

Tabelle 14. Anzahl und Größe der isolierten Polymerpartikel im periimplantären Gewebe der

NMRI nu/nu Maus

Implantationszeit	Maus (Nr.)	Partikelanzahl/Gewebeschnitt	Partikelgröße in µm
1 Woche	115	3	15, 10, 20
	116	1	20
	117	1	25
	118		-
	119	1	25
	120	2	10, 20
2 Wochen	127	3	40, 25, 20
	128		-
	129	6	5, 5, 15, 15, 20, 20
	130		-
	131	4	15, 10, 8, 15
	132	3	20, 20, 30
5 Wochen	211		
	211	2	-
	212	1	15, 25
	214	2	10 10
	215	1	60
9 Wochen	163	5	30, 40, 25, 30, 45
	164	7	20, 7, 5, 8, 10, 10, 10
	165	2	20, 20
	166	2	20, 10
	167		-
	168	2	10, 20

- = keine isolierten Polymerpartikel im periimplantären Gewebe beobachtet

Zur Ermittlung der Polymerpartikel siehe V Methoden, Kapitel 5.2.1.

I Maus
MR
Ż
der
ager
nsl
tatic
Implant
m
erte i
\geq
pH.
15.
belle
Tal

Implantations- zeit	pH-Werte/NN	ARI Maus Nr. 1	bis 6				Median
1 Woche	7,18	7,14	7,18	7,32	7,13	7,5	7,18
2 Wochen	7,22	6,7	7,34	7,17	7,75	5,04	7,19
3 Wochen	8,5	6	7,5	8-8,5	8,5-9	6	8,75
5 Wochen	8,5-9	8,5	6	8,5-9	8,5-9	8,5-9	8,75
7 Wochen	8,5	6	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
9 Wochen	6	8,5	6	8,5-9	8,5-9	8,5	8,5

Zur Ermittlung des pH-Wertes siehe V Methoden, Kapitel 2.

Tabelle 16. pH-Werte im Implantationslager der NMRI nu/nu Maus

Implantations-	pH-Werte/NI	MRI nu/nu Mau	s Nr. 1 bis 6				Median
1 Woche	8,5	6	8,5	9-9,5	9-9,5	6	6
2 Wochen	6	8	6	6	8,5	8,5-9	8,75
3 Wochen	8,5	8,5	8,5-9	6	6	8,5-9	8,75
5 Wochen	6	8,5	1	8,5	8,5-9	6	8,75
7 Wochen	1	8,5-9	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
9 Wochen	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5

Zur Ermittlung des pH-Wertes siehe V Methoden, Kapitel 2.

Abbildungen

1: Strukturformel von Oligo-(ɛ-hydroxycaproat) (im Text, Kapitel II, Punkt 1.2.)

2: Strukturformel von Oligobutylacrylat (im Text, Kapitel II, Punkt 1.2.)

3: Darstellung der komplexen zellulären und humoralen Reaktionen nach subkutaner Implantation eines Biomaterials (im Text, Kapitel II, Punkt 3.1.)

4: Darstellung der Reaktionen und Interaktionen von Antigen präsentierenden Zellen, Makrophagen und T-Zellen auf ein Biomaterial (im Text, Kapitel II, Punkt 3.2.)

5: Darstellung der Interaktionen zwischen Immunzellen und Fibroblasten im Wundgebiet (im Text, Kapitel II, Punkt 3.2.1)

6: Verlauf der Integration des Polymers in das periimplantäre Gewebe bei der NMRI Maus im Verhältnis zur Zeit

6.1: Verlauf der Integration des Polymers in das periimplantäre Gewebe bei der NMRI nu/nu Maus im Verhältnis zur Zeit

7: Ausschnitt einer runden neuen Polymerscheibe (Objektivvergrößerung 10x)

8: Dünne Gewebeschicht auf einem Polymer nach 1 Woche Implantationszeit (NMRI Maus, Objektivvergrößerung 10x)

8.1: Dünne Gewebeschicht auf einem Polymer nach 1 Woche Implantationszeit (NMRI nu/nu Maus, Objektivvergrößerung 10x)

9: Cluster von fettzellartigen Zellen auf einem Polymer nach 3 Wochen Implantationszeit (Objektivvergrößerung 10x)

10: Gefäß auf der Oberfläche eines Polymers nach 1 Woche Implantationszeit, (Objektivvergrößerung 20x)

11: Balkendiagramm zum Auftreten der Häufigkeit von fettzellartigen Zellen

12: Balkendiagramm zum Auftreten der Häufigkeit von Cluster von fettzellartigen Zellen

13: Balkendiagramm zum Auftreten der Häufigkeit von Gefäße

14: Periimplantäres Gewebe um ein Polymer nach 5 Wochen Implantationszeit (NMRI Maus,

H.E. Objektivvergrößerung 50x)

15: Periimplantäres Gewebe um ein Polymer nach 5 Wochen Implantationszeit mit anheftendem Polymer-brocken (Pfeil) (NMRI nu/nu Maus, H.E., Objektivvergrößerung50x) 16: Aufgerauhter Rand eines Polymers (Pfeil) nach 9 Wochen Implantationszeit der NMRI Maus (H.E., mit Polarisation, Objektivvergrößerung 20x). Links periimplantäres Gewebe (Blockpfeil).

17: H.E.-Darstellung ohne Polarisation zu 17.1. Periimplantäres Gewebe der NMRI Maus nach 9 Wochen Implantationszeit (Objektivvergrößerung 50x)

17.1: Doppelbrechung im periimplantären Gewebe der NMRI Maus nach 9 Wochen Implantationszeit (Objektivvergrößerung 50x)

18: H.E.-Darstellung ohne Polarisation zu 18.1. Periimplantäres Gewebe der NMRI nu/nuMaus nach 9 Wochen Implantationszeit (Objektivvergrößerung 50x)

18.1: Doppelbrechung im periimplantären Gewebe der NMRInu/nu Maus nach 9 Implantationszeit (Objektivvergrößerung 50x)

19: Periimplantäres Gewebe um ein Polymer nach 9 Wochen Implantationszeit (NMRI Maus, Trichromfärbung nach Masson-Goldner, Objektivvergrößerung 50x)

20: Isolierter Polymerpartikel (Pfeil) und MHC II-positive Zellen im periimplantären Gewebe (NMRI nu/nu Maus, alkalische Phosphatase, Objektivvergrößerung 20x)

21: Kontrollschnitt zu Abb. 20, periimplantäres Gewebe ohne Primär-Antikörper (NMRI nu/nu Maus, alkalische Phosphatase, Objektivvergrößerung 40x)

22: OCT-Aufnahmen eines neuen Polymers. Darstellung eines tomographischen Schnittbildes durch ein unbenutztes Polymer. Die zwei inneren weissen Linien (Pfeile) stellen die Oberflächen des Polymers dar.

23: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 1 Woche (NMRI Maus)

Auf dem oberen Rand des Polymers ist aufliegend periimplantäres Gewebe dargestellt, der untere Rand des Polymers ist frei.

23.1: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 1 Woche (NMRI nu/nu Maus)

An beiden Oberflächen des Polymers ist dünn aufgelagrertes periimplantäres Gewebe zu sehen.

24: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 3 Wochen (NMRI Maus)

An beiden Oberflächen des Polymers ist eine dünne Schicht periimplantäres Gewebe zu erkennen, das der Polymeroberfläche aufliegt 24.1: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 3 Wochen (NMRI nu/nu Maus)

An der unteren Seite des Polymers ist eine dicke Schicht periimplantäres Gewebe, teils losgelöst von der Polymeroberfläche zu sehen.

25: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 9 Wochen (NMRI Maus)

Auf beiden Seiten des Polymers ist dichtes periimplantäres Gewebe zu erkennen, z.T.von der Polymeroberfläche abgelöst. Die hellen Kreise in dem der Unterseite des Polymers angelagerten Gewebes sind Blutgefäße.

25.1: OCT-Aufnahme eines Polymers nach 9 Wochen (NMRI nu/nu Maus)

Auf beiden Seiten des Polymers ist dichtes periimplantäres Gewebe, fest angelagert an die Oberflächen des Polymers, zu erkennen. Abb. 6: Verlauf der Intergration des Polymers in das periimplantäre Gewebe bei der NMRI Maus im Verhältnis zur Zeit





125

Abb. 6.1: Verlauf der Intergration des Polymers in das periimplantäre Gewebe bei der NMRI nu/nu Maus im Verhältnis zur Zeit



Verlauf der Integration bei der NMRI nu/nu Maus

126



Abb. 8.1





Abb. 7

Abb. 8





Abb. 10

127

Abb. 9

Abb. 11 bis 13: Balkendiagramm zum Auftreten der Häufigkeit von fettzellartigen Zellen, Clustern von fettzellartigen Zellen und von Gefäßen

fettzellartige Zellen





Abb. 14





Abb. 15

Abb. 16



Abb. 17



Abb. 17.1



Abb. 18



Abb. 18.1



Abb. 19











Abb. 22



Abb. 23



Abb. 23.1



Abb. 24



Abb. 25



Abb. 24.1





XII Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher danke ich nicht nur für die Übernahme der Thematik und für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, sondern im Besonderen auch dafür, dass diese Arbeit trotz allem erstellt werden konnte.

Danke an Herrn Dr. Dr. R.P. Franke, Zentralinstitut für Biomedizinische Forschung, Abteilung Biokompatible Materialien der Universität Ulm, für die wissenschaftliche Fragestellung.

Ich danke dem Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik der Universität Ulm, Leiter Prof. Dr. Steiner, für die Nutzung des Optical Coherence Tomographen.

Danke dem Universitätsklinikum Ulm, Abteilung für Orthopädie, Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen, Leiter Prof. Dr. Brenner für die Nutzung des Kryostates sowie dem Universitätsklinikum Ulm, Institut für Pathologie und Rechtsmedizin, Leiter Prof. Dr. P. Möller für die Bereitstellung des Microtoms.

Ich danke Herrn Alwin Kienle für seine Geduld, Ausdauer und Unterstützung bei der Untersuchung meiner Präparate.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Jilge und an seine Kollegen vom Tierforschungszentrum der Universität Ulm, dass durch den wissenschaftlichen und kollegialen Kontakt sich mir noch mehr als die praktische Tiermedizin eröffnet hat.

Einen ganz herzlichen Dank gilt meiner Freundin Yvonne, die mich mit ihrem Humor und ihrer unerschütterlichen Art nie hat aufgeben lassen. Dziekuje bardzo.

Anette und Joachim: S´gôht hald blos breggallesweis.

Einen herzlichen Dank gilt meiner Schwester Uta für die endlosen Telefonsitzungen, die mich immer wieder aufgebaut haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer und in allem unterstützt haben.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Mann Peter: ein Fels in der Brandung.

Und ein ganz spezieller Dank gilt meinem Sohn Hannes, der einen wissen lässt, warum man dies eigentlich alles macht.

XIII Publikationen und Vorträge

Publikationen:Binzen E, Rickert D, Kelch S, Fuhrmann DAngiogenesis around new AB-polymer networks after one week of implantation in mice.Clin Hemorheol Microcirc. 2003;28:183-8.

Binzen E, Lendlein A, Kelch S, Rickert D, Franke RPBiomaterial-microvasculature interaction on polymers after implantation in mice.Clin Hemorheol Microcirc. 2004;30:283-8.

Vortrag:

Binzen, E, Lendlein A, Kelch S, Rickert D, Franke RP

Angiogenesis around new AB-polymer networks after one week of implantation in mice 12th European Conference On Clinical Hemorheology, Sofia, Bulgaria, June 22-26, 2003 eurosummer school on biorheology, Varna, Bulgaria, June 29-30, 2003

XIV Erklärung

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Eva Engelhardt

