

Aus dem

Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl)

und

der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Tissue Engineering mit porösen Polyethylenimplantaten:

Effekte einer Beschichtung mit Fibroblasten auf die Integration *in vivo*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Timon Hussain

aus Wolfratshausen

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. S. Strieth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Giunta
Prof. Dr. med. R. Sodian

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2013

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	3
1. <i>Tissue Engineering</i>	3
1.1. Definition und Forschungsstand	3
1.2. Gewebe für das <i>Tissue Engineering</i>	4
2. Poröses Polyethylen als Biomaterial	7
3. Biomaterialintegration.....	8
3.1. Angiogenese	8
3.2. Immunologie.....	9
4. Fragestellungen	14
II. Material und Methoden.....	15
1. Materialien	15
1.1. Versuchstiere und Haltung	15
1.2. Poröses Polyethylen.....	16
2. Modelle und Methoden	17
2.1. Zellkultur	17
2.2. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	21
2.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	26
2.4. Messung der dynamischen Desintegrationskraft	31
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	33
2.6. Versuchsaufbau	38
2.7. Darstellung der Ergebnisse und Statistik.....	39
III. Ergebnisse.....	40
1. „Vitalisierung“ der porösen Polyethylenimplantate.....	40
2. Angiogenese und mikrohämodynamische Parameter	43

2.1. Gefäßdurchmesser	43
2.2. Funktionelle Gefäßdichte	44
2.3. Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit.....	45
3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	46
3.1. Leukozytenflux	46
3.2. Leukozytenadhärenz.....	47
4. Dynamische Desintegrationskraft	48
5. Zytokinanalyse	49
5.1. MMP-2 und -9	49
5.2. Antiinflammatorische Zytokine.....	50
5.3. Proinflammatorische Zytokine	51
IV. Diskussion	52
1. Diskussion der Methodik	52
1.1. Kultivierung der dermalen Fibroblasten auf porösem Polyethylen	52
1.2. Zellzahlanalyse mittels konfokaler Mikroskopie und digitaler Bildanalyse	54
1.3. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	55
1.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Videoanalyse	58
2. Diskussion der Ergebnisse	59
2.1. „Vitalisierung“ von porösen Polyethylenimplantaten durch Fibroblasten	59
2.2. Mikrovaskuläre Integration von porösen Polyethylenimplantaten.....	61
2.3. Bioverträglichkeit von „vitalisierten“ porösen Polyethylenimplantaten	64
2.4. Mechanische Integration der porösen Polyethylenimplantate	68
V. Zusammenfassung.....	69
VI. Literaturverzeichnis	71
VII. Anhang	82
1. Statistik.....	82
2. Danksagung	83

I. Einleitung

1. *Tissue Engineering*

1.1. Definition und Forschungsstand

Der Begriff *Tissue Engineering* wurde erstmals vor knapp 25 Jahren im Rahmen eines Treffens der *National Science Foundation* in den USA geprägt und hielt in der Folge Einzug in den wissenschaftlichen Sprachgebrauch. Bezeichnet wird damit die Entwicklung eines biologischen Gewebeersatzes, der die Funktion eines geschädigten Zielgewebes im Organismus wiederherstellen, erhalten, oder verbessern kann. Um dies zu erreichen, wird beim *Tissue Engineering* ein interdisziplinärer Ansatz gewählt, der sich Methoden aus den Ingenieurs-, ebenso wie den Naturwissenschaften zu Nutze macht (Langer and Vacanti 1993). Ausgangspunkt dieser Prozesse sind häufig Zellen oder Zellprodukte, die entweder von einem Spender oder vom Patienten selbst gewonnen werden können. Je nach Methode kann es sich hier um mehr oder weniger differenzierte Zellen handeln (Griffith 2002). Nach ihrer Isolierung werden die Zellen meistens *in vitro* amplifiziert, konditioniert und dann in den Organismus des Patienten eingebracht.

Seit 1987 hat sich das Feld zu einem bedeutenden Industriezweig entwickelt. Im Jahr 2007 wurden mit Produkten zum *Tissue Engineering* ca. 2,5 Milliarden Dollar Umsatz erwirtschaftet (Nerem 2010). Inhaltlich haben vor allem Fortschritte auf dem Gebiet der Stammzellforschung neue Perspektiven eröffnet. *Tissue Engineering* wird heute auch häufig synonym mit dem Begriff *Regenerative Medizin* verwendet.

Grundsätzlich werden verschiedene Möglichkeiten der praktischen Umsetzung unterschieden. Es besteht die Möglichkeit, *in vitro* amplifizierte Zellen direkt in die Umgebung geschädigten Gewebes zu injizieren. Ferrari et al. berichten von erfolgreichen Versuchen, bei denen aus dem Knochenmark isolierte und markierte Stammzellen nach intramuskulärer Injektion in Bereiche muskulärer Degeneration migrieren, dort zu Muskelgewebe ausdifferenzieren und an Regenerationsprozessen partizipieren (Ferrari, Cusella-De Angelis et al. 1998).

Eine weitere Option besteht darin, die Zellen auf einer biologischen Trägersubstanz zu kultivieren und gemeinsam mit dieser einzubringen (Griffith and Naughton 2002). So können größere Zellmengen strukturiert in das geschädigte Gewebe im Wirtsorganismus eingebracht werden.

Es gibt zudem Ansätze, ganze Organe *in vitro* zu rekonstruieren, mit dem Ziel, einmal Alternativen zu Organ-Transplantationen zu entwickeln (Chapekar 2000). Um eine gewebespezifische Form zu erreichen, kommen dreidimensionale Trägerstrukturen für die Zellen zum Einsatz. Hier wird zwischen resorbierbaren und nicht resorbierbaren Materialien unterschieden. Bei resorbierbaren Materialien spielt speziell die Abbaugeschwindigkeit und die potentielle Toxizität der Abbauprodukte eine wichtige Rolle (Griffith 2002). Während ihre Verwendung dem Grundgedanken des *Tissue Engineering* sehr nahe kommt, da hier langfristig Gewebe komplett durch *in vitro* konditionierte Zellen ersetzt wird, ist die klinische Anwendbarkeit bislang beschränkt. Es ist noch nicht gelungen, einen funktionsfähigen Ersatz innerer Organe herzustellen. Es gibt derzeit lediglich Hautersatzprodukte, die intakter, nativer Haut allerdings bei weitem noch nicht gleichwertig sind (Sterodimas, De Faria et al. 2009). Nicht resorbierbare Trägermaterialien, wie poröses Polyethylen (Medpor®, Porex Surgical, Newman, GA, USA), geben den Zellen sowohl *in vitro*, als auch nach Implantation eine Struktur. *Tissue Engineering* mit solchen nicht resorbierbaren Materialien verfolgt damit zwei Ziele: zum einen gibt das synthetische Material den implantierten Zellen ein Gerüst und bindet sie am Bestimmungsort. Gleichzeitig kann das stabile Material aber bei diesem Ansatz als der primäre Gewebeersatz fungieren, beispielsweise bei Knochen- oder Bindegewebsdefekten. Die Zellen oder Zellprodukte übernehmen dann eine unterstützend integrative Funktion, indem sie durch „Vitalisierung“ des Fremdmaterials dessen Biokompatibilität verbessern. Eine erfolgreiche Integration von Biomaterialien beruht auf einer raschen Vaskularisation und einer möglichst geringen initialen Entzündungsreaktion auf das Implantat (Laschke, Haufel et al. 2005). Die Implantation nicht resorbierbarer Biomaterialien zusammen mit Zellen oder Zell-Produkten mit immunmodulatorischen oder proangiogenetischen Eigenschaften kann diese Integrationsprozesse möglicherweise beeinflussen. Dieser Ansatz verspricht aufgrund der diversen schon etablierten Einsatzgebiete synthetischer Biomaterialien gute Möglichkeiten zur klinischen Umsetzung.

1.2. Gewebe für das *Tissue Engineering*

Es ist naheliegend, die spezifischen Zellen des jeweiligen Zielgewebes *in vitro* zu amplifizieren und das so entstandene „Ersatzorgan“ zu implantieren. Dieser Ansatz unterliegt jedoch Limitationen: Einerseits lassen sich voll ausdifferenzierte Zellen *in vitro* nur schwer vermehren, zudem besteht insbesondere nach langer Kultivierung die Gefahr, dass sich die Zell-Charakteristik verändert (Zippel, Schulze et al. 2010).

Als vielversprechende Alternative bieten sich Stammzellen an. Sie lassen sich leicht *in vitro* amplifizieren und sind in der Lage, sich je nach Stimulation zu verschiedenen Zellen mit gewebespezifischen Eigenschaften zu entwickeln. Pluripotente Stammzellen, erstmals 1998 aus menschlichem Embryonalgewebe isoliert (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998), können in jede Art von menschlichem Gewebe differenzieren. Deren Verwendung stellt sich jedoch vor allem aus ethischen Gründen schwierig dar und ist in vielen Ländern streng beschränkt (Zippel, Schulze et al. 2010). Eine interessante neuere Variante stellen die sogenannten *induzierten pluripotenten Stammzellen* dar. Hier werden mittels retroviraler oder adenoviraler Vektoren spezifische Transkriptionsfaktoren in somatische Zellen eingebracht, welche diese in einen pluripotenten Zustand zurückversetzen (Takahashi and Yamanaka 2006). Die Notwendigkeit der Gewinnung von Zellen aus embryonalem Gewebe wird damit umgangen. Allerdings besteht in einer möglichen Tumorigenität ein signifikantes Risiko bei der Verwendung solcher pluripotenter Zellen. Speziell die Entstehung von Teratomen ist ein Risiko der noch jungen Technologie (Rippon and Bishop 2004) und behindert bisher eine klinische Anwendung.

Die Gewinnung sogenannter multipotenter Stammzellen wirft weniger ethische Fragen auf, zudem ist das Entartungsrisiko bei diesen Zellen geringer. Hämatopoetische Stammzellen können aus dem adulten Knochenmark gewonnen werden, mesenchymale Stammzellen lassen sich ebenfalls aus Knochenmark oder Fettgewebe gewinnen (Zuk, Zhu et al. 2002). Letztere sind in der Lage unter Einfluss geeigneter Faktoren zu diversen Zellarten zu differenzieren, unter anderem zu Osteoblasten, Chondrozyten oder Myozyten (Jaiswal, Haynesworth et al. 1997; Pittenger, Mackay et al. 1999). Angesichts ihres großen Potentials werden sie häufig für das *Tissue Engineering* verwendet. Es gibt jedoch auch für den Einsatz multipotenter Linien Einschränkungen. Im Vordergrund steht hier die Frage der Immunkompatibilität. Während mit autologen Stammzellen in Studien vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, können sich Produkte zum *Tissue Engineering* nur dann langfristig etablieren, wenn sie in großer Stückzahl kommerziell produziert werden können und eine Bevorratung möglich ist. Der Einsatz von autologen Zellen, die vom jeweiligen Patienten selbst gewonnen werden müssen, entspricht diesen Voraussetzungen nicht; langfristig werden wahrscheinlich allogene Zellen bevorzugt zum Einsatz kommen. Auch bei Stammzellen kann es sein, dass sie im Rahmen von Differenzierungsprozessen letztendlich auch spenderspezifische Moleküle exprimieren. Falls die Zellen nur für einen begrenzten Zeitraum im Empfängergewebe einen Zweck erfüllen sollen, ist beispielsweise eine vorübergehende Immunsuppression wie bei Organtransplantationen denkbar, die jedoch mit Nebenwirkungen verbunden sein kann. Falls

die eingebrachten Zellen sich permanent im Organismus etablieren, oder gar vermehren sollen, müssen jedoch Methoden entwickelt werden, durch die die Expression von immunologischen Merkmalen ausreichend unterdrückt werden kann (Ahsan and Nerem 2005).

Bevor für den Einsatz von allogenen Stammzellen eine praktikable Lösungsstrategie gefunden wurde, konnte eine andere Zellart für den Einsatz beim *Tissue Engineering* etabliert werden: allogene, dermale Fibroblasten kommen bereits in den wenigen marktreifen Hautersatzprodukten zum *Tissue Engineering*, wie dem zur Deckung von schlecht heilenden Ulcera eingesetzten *Aplicraf®* (Organogenesis, Canton, MA, USA) zum Einsatz. Hierbei werden Zellen aus Vorhaut verwendet. Dermale Fibroblasten weisen Eigenschaften auf, welche die Geweberegeneration oder die Integration von Fremdmaterialien möglicherweise positiv beeinflussen können: sie sezernieren Extrazellulärmatrix, proangiogenetische Faktoren, sowie diverse Zytokine (Pu, Rhodes et al. 2010). Es wird ihnen sogar ein mit Stammzellen vergleichbares Potential zur Vermittlung der Gewebeverträglichkeit zugeschrieben, welches vor allem einen Einfluss auf die Antwort des Wirtsorganismus auf synthetische Fremdmaterialien haben könnte (Haniffa, Wang et al. 2007). Studien berichten beispielsweise von einer Supprimierung der T-Zell-Proliferation durch aktivierte Fibroblasten (Shimabukuro, Murakami et al. 1992). Andere Untersuchungen zeigen zudem, dass aus der Haut isolierte Fibroblastenpopulationen Progenitorzellen enthalten können, welche ein mit mesenchymalen Stammzellen vergleichbares Differenzierungspotential aufweisen. Beschrieben sind Differenzierungen zu Muskel- und Nervenzellen *in vitro*, sowie das Potential zur Osteogenese (Pu, Rhodes et al. 2010). Von Vorteil ist des Weiteren, dass es beim Einsatz der maler Fibroblasten zu keinen Abwehrreaktionen des Wirtsmechanismus kommt (Falanga, Margolis et al. 1998). Einer der Gründe hierfür ist, dass dermale Fibroblasten keine Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse 2-Rezeptoren aufweisen, welche für die Antigenpräsentation zuständig sind und die Immunantwort stimulieren (Theobald, Lauer et al. 1993). Zudem gehen antigenpräsentierende Zellen, wie Langerhans-Zellen *in vitro* nach einigen Passagierungen der maler Fibroblasten verloren und können somit bei Implantation keine akuten Abstoßungsreaktionen mehr stimulieren (Phillips, Manzoor et al. 2002). Da sich dermale Fibroblasten leicht *in vitro* amplifizieren lassen, stellen sie somit eine äußerst vielversprechende Zellpopulation für eine „Vitalisierung“ von synthetischem Implantatmaterial dar. In dieser Studie sollte ihr Einfluss auf den Integrationsprozess eines speziellen Biomaterials untersucht werden.

2. Poröses Polyethylen als Biomaterial

Poröses Polyethylen (Medpor®, Porex Surgical, Newman, GA, USA) ist ein poröses, alloplastisches Material, welches seit über 50 Jahren bei der Deckung diverser Gewebedefekte zum Einsatz kommt (Purdy 1997). Die poröse Struktur des Materials wird mittels eines patentierten Prozesses erreicht, bei dem Polyethylengranulat zusammengepresst, bis an seinen spezifischen Schmelzpunkt erhitzt und dann in die erwünschte Form gebracht wird. Hierbei entsteht die spezielle Porenstruktur (Blaydon, Shepler et al. 2003). Poröses Polyethylen hat sich bei knöchernen Verletzungen oder Fehlbildungen im Kopf-Hals-Bereich bewährt. Eine wesentliche Indikation ist die Rekonstruktion der Ohrmuschel bei angeborenen Fehlbildungen (Mikrotien). Erstmals 1983 von Berghaus et al. beschrieben, ist poröses Polyethylen alternativen Materialien wie Dacron oder Teflon überlegen, insbesondere aufgrund seiner Formstabilität (Berghaus, Axhausen et al. 1983). Poröses Polyethylen kommt auch bei der Reposition von Orbitabodenfrakturen oder Nasenkorrekturen zum Einsatz (Ng, Madill et al. 2001; Lee, Maronian et al. 2005; Mendelsohn 2005). Eines der Hauptkriterien für die erfolgreiche Integration von Biomaterialien ist das rasche Einwachsen fibrovaskulären Gewebes. Die poröse Struktur der Implantate beschleunigt diesen Prozess. So können bereits 14 Tage nach Implantation Ossifikationsprozesse in den Poren beobachtet werden (Spector, Flemming et al. 1975), zudem führt die raue Oberflächenstruktur zu einer besseren Verankerung im Gewebe und erleichtert damit die Gefäß einsprössung sowie die Adhärenz von Fibroblasten (Romo, Sclafani et al. 1998).

Studien belegen geringe Komplikationsraten nach Implantation von porösem Polyethylen. Dies trifft sowohl auf Infektionsraten, als auch auf die langfristige Implantatstabilität zu (Blaydon, Shepler et al. 2003; Romo, Morris et al. 2009). Allerdings berichten Gosau et al. von Implantatunverträglichkeiten und explantierten porösen Polyethylenimplantaten bei Patienten. In mehreren Fällen ließ sich histologisch ein chronisches Entzündungsgeschehen nachweisen, teilweise sogar mit lokaler phagozytierer Resorption von Polyethylenpartikeln. Zwar zeigte keiner der betroffenen Patienten klinisch akute Entzündungszeichen und es bestand kein Hinweis darauf, dass die langfristige Stabilität des jeweiligen Implantats kompromittiert war (Gosau, Schiel et al. 2006; Gosau, Draenert et al. 2008). Dennoch stellen diese Studien in Frage, ob poröses Polyethylen weiterhin als immunologisch gänzlich inert gelten kann. Ein weiterer limitierender Faktor beim Einsatz dieses rein synthetischen Materials ist, dass eine Deckung der porösen Polyethylenimplantate mit vitalem und möglichst gut vaskularisiertem Gewebe unabdingbar ist, um eine adäquate Vaskularisation

und Integration ins Wirtsgewebe zu gewährleisten (Stelter, Strieth et al. 2007). Bei Ohrmuschelrekonstruktionen, bei denen die Implantate in der Regel mit gestielten temporoparietalen Lappen gedeckt werden, sind die Ergebnisse zufriedenstellend (Braun, Gratza et al. 2010). Im Gegensatz dazu steht bei Eingriffen am knorpeligen und knöchernen Nasenskelett, insbesondere im Fall von Revisionen, oft nur limitiert Gewebe zur Deckung zur Verfügung. Hier ist die Vaskularisierung der Implantate erschwert und somit die Gefahr einer unzureichenden Integration bis hin zur Implantatabstoßung erhöht (Stelter, Strieth et al. 2007). Eine Verbesserung der Biokompatibilität von porösem Polyethylen könnte somit dazu beitragen, die Operationsergebnisse bei dieser Indikation zu optimieren.

3. Biomaterialintegration

In dieser Studie wurde poröses Polyethylen *in vitro* mit Fibroblasten im Sinne sog. *Compound grafts* „vitalisiert“, in einen Wirtsmechanismus eingebracht und die Beeinflussung des Integrationsprozesses untersucht. Zunächst galt es untersuchen, ob *in vitro* kultivierte Fibroblasten nach Implantation im Wirtsgewebe vital bleiben. Neben der mikroskopischen Kontrolle bot sich hierfür auch eine quantitative Messung von spezifischen Matrix-Metalloproteasen (MMP) bei „vitalisierten“ Implantaten im Vergleich zu nativen porösen Polyethylenimplantaten an. MMP sind in allen Lebewesen vorkommende Endopeptidasen mit einem Zinkion im katalytischen Zentrum, die unter anderem von Fibroblasten produziert werden. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Modulation und Regulation des Extrazellulärmatrixumsatzes durch Proteinabbau (Klein and Bischoff 2011). MMP-2 und MMP-9 bilden die Untergruppe der Gelatinasen, da sie in der Lage sind Kollagen abzubauen. Darüber hinaus haben sie direkte und indirekte Effekte auf diverse andere Zytokine, die bei Entzündungs- und Reparaturprozessen eine Rolle spielen. MMP-2 wird von Fibroblasten in der Regel konstitutiv exprimiert, die MMP-9-Produktion ist hingegen reguliert und wird von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren induziert (Ries, Popp et al. 2009).

3.1. Angiogenese

Die Vaskularisierung von Fremdmaterialien ist ein entscheidender Parameter für deren erfolgreiche Integration und erfolgt durch die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen. Die Angiogenese beruht auf zwei Prozessen: dem Aussprießen neuer Gefäße aus bereits bestehenden (*Sprouting*) oder der Aufspaltung von vorhandenen Gefäßen (*Splitting*). Beim *Sprouting* werden Endothelzellen durch chemotaktische Reize zur Migration

und Proliferation angeregt und formen ein neues Lumen. Beim *Splitting* wird das Gefäßlumen durch den Einbau Säulen aus Extrazellulärmatrix ins Gefäßlumen aufgespalten. In der Regel treten bei der Vaskularisierung von Geweben beide Prozesse parallel auf (Risau 1997). Die Initiation und Kontrolle der Angiogenese wird durch Wachstumsfaktoren, proangiogenetische Zytokine und andere Modulatoren reguliert. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist hierbei einer der wichtigsten, zudem zählen *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) und verschiedene *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-Varianten dazu (Norrby 1997). Es gibt prinzipiell die Möglichkeit einer systemischen Applikation der genannten Wachstumsfaktoren durch viralen Gentransfer. Bisher gelingt dies allerdings noch nicht hinreichend kontrolliert *in vivo* (Yancopoulos, Davis et al. 2000). Alternativ werden poröse Gerüste mit einer Beschichtung aus proangiogenetischen Zellprodukten, wie Extrazellulärmatrix und VEGF ins Wirtsgewebe eingebracht, um Integrationsprozesse zu stimulieren (Laschke, Rucker et al. 2008; Strieth, Weger et al. 2010). Die in dieser Studie durchgeführte „Vitalisierung“ des Materials mit Fibroblasten, welche proangiogenetische Zytokine und die genannten Faktoren produzieren können (Hurley, Balaji et al. 2010), ist die die logische Weiterentwicklung dieses Ansatzes, da sie möglicherweise eine längerfristige und nachhaltigere Produktion gewährleisten könnten. Untersucht wurden daher auch mikrohämodynamische Parameter des neugebildeten Blutgefäßsystems im zeitlichen Verlauf.

3.2. Immunologie

Bei der Implantation von Fremdmaterialien findet immer eine Reaktion des Wirtsgewebes statt, deren Ausmaß entscheidend für eine erfolgreiche langfristige Integration ist. Kurzfristig nach Implantation findet sich eine Proteinschicht auf dem Implantat, deren genaue Zusammensetzung vom Implantatmaterial abhängt (Anderson, Rodriguez et al. 2008). Die adhärenten Proteine interagieren mit den Rezeptoren der Immunzellen des Wirtsorganismus. Unter dem Einfluss von Chemokinen werden Makrophagen aktiviert und migrieren daraufhin an den Ort der Implantation, wo sie am Biomaterial ansetzen und die Oberflächenproteine biochemisch verändern (Klosterhalfen, Hermanns et al. 2003). Die aktivierten Makrophagen sezernieren dabei diverse immunmodulatorische Zytokine, die für den weiteren Verlauf der Immunreaktion eine wichtige Rolle spielen (s. Abb. 1). Im weiteren Verlauf der Gewebereaktion werden außerdem verstärkt endotheliale Oberflächenliganden exprimiert. Bei diesem Prozess spielt aus Mastzellen sezerniertes Histamin als Mediator eine Schlüsselrolle (Tang, Jennings et al. 1998). Leukozyten beginnen mit dem Endothel zu interagieren. Zunächst wird ein *Rolling*, eine verlangsamte rollende Bewegung der Zellen entlang des

Endothels - im Gegensatz zum sonst beobachtbaren ungehinderten Durchfluss -, beobachtet. Es gilt als die Vorstufe einer substanzialen Interaktion der Leukozyten am Endothel, der Adhärenz (Munro 1993; Rucker, Laschke et al. 2008).

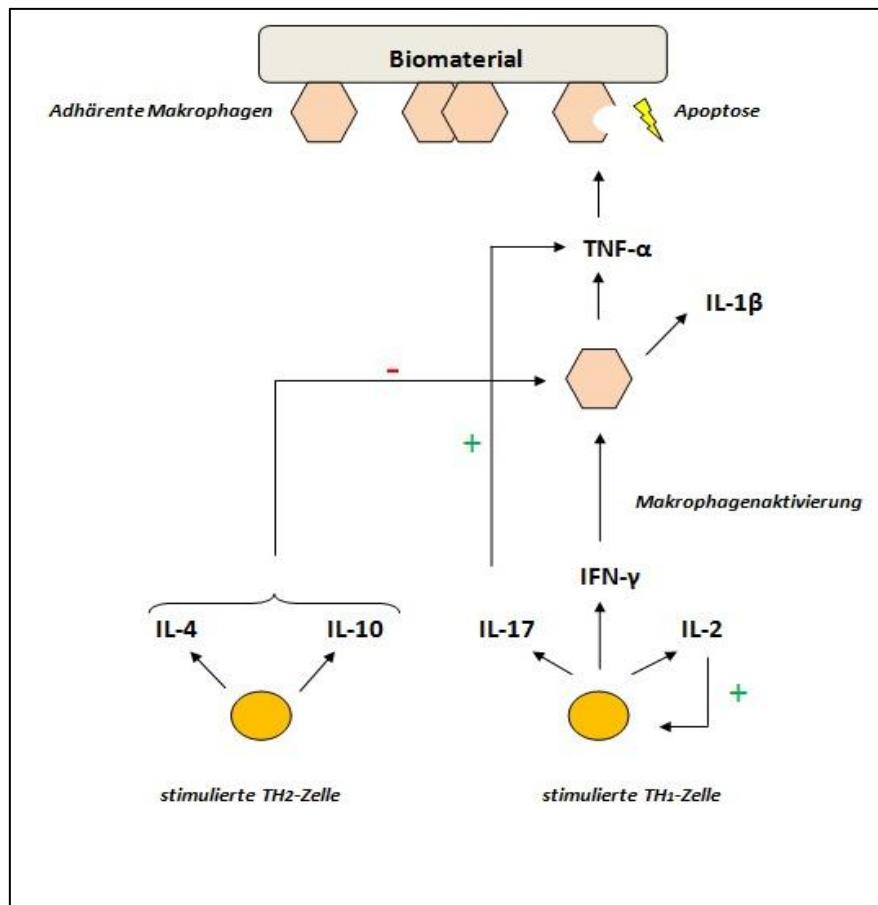


Abb. 1: Schematische Darstellung der Interaktion der gemessenen immunmodulatorischen Zytokine nach Gewebestimulation durch die Implantation eines Fremdmaterials. Hierbei ist durch vermehrte Expression von TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2 und IL-17 eine Verstärkung der inflammatorischen Reaktion zu erwarten, IL-4 und IL-10 wirken hingegen hemmend auf die Entzündungsreaktion.

Die Interaktion der adhärenten Leukozyten führt zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen können intravitalmikroskopisch dargestellt und quantifiziert werden (Vajkoczy, Ullrich et al. 2000). In der vorliegenden Untersuchung dienten sie als ein Parameter für das Ausmaß des Entzündungsgeschehens beim Vergleich fibroblastentrager Polyethylenimplantate mit unbeschichteten Implantaten.

Eine ganze Reihe von immunmodulatorischen Zytokinen kommen in Frage, die bei der Implantation von porösem Polyethylen eine Rolle spielen könnten (Tabelle 1).

proinflammatorisch	antiinflammatorisch
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α)	Interleukin-4 (IL-4)
Interferon-gamma (IFN-γ)	Interleukin 10 (IL-10)
Interleukin-1 β (IL-1β)	
Interleukin-2 (IL-2)	
Interleukin-17 (IL-17)	

Tabelle 1: Proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine von Relevanz bei der Implantation von Biomaterialien.

TNF- α ist ein Zytokin, welches primär von aktivierten Makrophagen sezerniert wird und wiederum die Expression diverser anderer proinflammatorischer Zytokine induziert (Abb. 1). In geringerem Maß produzieren auch Mastzellen, Lymphozyten und Fibroblasten TNF- α (Larrick and Wright 1990). Das Zytokin gilt als Schlüsselmediator von Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen und wirkt an verschiedenen Organsystemen zytotoxisch, unter anderem durch die Aktivierung von Phospholipasen und freien Radikalen. Insbesondere nach der Implantation von Fremdmaterialien wird TNF- α auch lokal verstärkt produziert (Cardona, Simmons et al. 1992). Hier induziert TNF- α auch die Apoptose, den programmierten Zelltod, speziell von am Biomaterial adhärenen Makrophagen (Brodbeck, Shive et al. 2002). Hierdurch kommt es zu einer kontinuierlichen Freisetzung des Zellinhalts, welcher zur Prolongation der lokalen Entzündungsreaktion führt (Anderson, Rodriguez et al. 2008).

IFN- γ wird vorrangig von aktivierten T-Zellen produziert und gilt als essentieller Induktor der Umwandlung ruhender in aktivierte Makrophagen (Abb. 1). Deren Stimulierung führt wiederum zu einer vermehrten Produktion von TNF- α , IL-1 und Sauerstoff-Zwischenprodukten und verstärkt so Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen (Billiau and Dijkmans 1990). Speziell bei der Integration von Biomaterialien spielt IFN- γ eine

entscheidende Rolle, da es die Entstehung von Riesenzellen durch die Fusion aktiverter, am Implantat adhärenter Makrophagen induziert (Khaw, van Wachem et al. 1998). Das Ausmaß der Entstehung der Riesenzellen ist ein wichtiger Faktor für die Integration von Biomaterialien, da sie eine Schlüsselrolle bei deren Zersetzung spielen (Anderson 1988).

Die IL-1-Familie besteht aus zwei potenten proinflammatorischen Zytokinen, IL-1 α und **IL-1 β** (Abb. 1). Sie werden unter anderem von Makrophagen produziert, beeinflussen Abwehrmechanismen und stimulieren andere inflammatorische Zellen wie Lymphozyten und Monozyten (Dinarello 1997). Die Konzentration von IL- β wird in Studien als Marker für die Biokompatibilität von Fremdmaterialien eingesetzt. Erhöhte Konzentrationen sprechen dabei für eine gesteigerte initiale Abwehrreaktion des Wirtsorganismus (Miller and Anderson 1988; Krause, Robertson et al. 1990). Außerdem ist IL- β an Wundheilungsprozessen beteiligt, indem es zu einer Aktivierung von Fibroblasten beiträgt (Brodbeck, Voskerician et al. 2003).

IL-17 wird vor allem von T-Zellen produziert (Abb. 1). Es handelt sich ebenfalls um ein proinflammatorisches Zytokin, da durch IL-17 die Expression von Faktoren stimuliert wird, die am Entzündungsprozess beteiligt sind, unter anderem verschiedener Interleukine, darunter IL-1 β , IL-6 und Komplementfaktoren (Fossiez, Djossou et al. 1996). IL-17 wird ein synergistischer Effekt mit TNF- α zugeschrieben. Studien zeigen, dass insbesondere die von TNF- α stimulierte Produktion von Entzündungsmediatoren unter Einfluß von IL-17 deutlich erhöht ist (Katz, Nativ et al. 2001). Damit kommt diesem Botenstoff eine wichtige Rolle bei der Eskalation von Entzündungsprozessen zu (Broxmeyer 1996).

IL-2 gilt als vorrangig proinflammatorisches Zytokin, welches im Rahmen der Immunantwort vor allem auf CD8-positive T-Zellen wirkt und deren Expansion und Differenzierung stimuliert (Abb. 1). Produziert wird IL-2 sowohl von CD8-positive T-Zellen selbst, als auch von CD4-positiven T-Zellen (Boyman and Sprent 2012). Gleichzeitig kommt IL-2 jedoch auch eine entscheidende Funktion in der Homöostase von regulatorischen T-Zellen zu. In Studien entwickelten IL-2-Knockout-Mäuse nach wenigen Wochen Autoimmunerkrankungen, die mehrere Organe betrafen und letztlich tödlich verliefen (Malek 2008). IL-2 unterdrückt über seinen Einfluss auf regulatorische T-Zellen Autoimmunreaktionen. Es wurden erfolgreich Studien durchgeführt, bei denen IL-2 im Tierversuch sowohl zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, als auch zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen von Fremdgewebe zum Einsatz kam. Dies war jedoch nur reproduzierbar,

wenn die starken proinflammatorischen Effekte von IL-2 auf zytotoxische T-Zellen durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern supprimiert werden (Webster, Walters et al. 2009).

IL-4 wird von T-Helferzellen produziert und wirkt vor allem auf Makrophagen (Abb. 1). Unter dem Einfluss von IL-4 fusionieren diese sowohl *in vitro*, also auch *in vivo* zu Riesenzellen (Kao, McNally et al. 1995). Die unter IL-4-Einfluss entstandenen Riesenzellen unterscheiden sich deutlich in ihren Eigenschaften von den Riesenzellen, die durch IFN- γ -Stimulation entstanden sind (s.o.). IL-4-induzierte Riesenzellen reduzieren die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und mindern somit die Entzündungsreaktion (Stein, Keshav et al. 1992). Studien zeigen unter IL-4 Einfluss eine signifikante Abnahme der TNF- α -Konzentration und damit der Apoptoserate unter Makrophagen an Biomaterialien (Brodbeck, Shive et al. 2002). Dadurch wird die Entzündungsreaktion limitiert.

IL-10 gilt als eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine in der menschlichen Immunantwort (Abb. 1). Es wird von CD4-positiven T-Zellen, Monozyten und B-Zellen sezerniert und inhibiert von Makrophagen produzierte Zytokine, sowie IFN- γ (Opal and DePalo 2000). Neben dem indirekten Weg über IFN- γ , hemmt IL-10 auch die Umwandlung ruhender in aktivierte Makrophagen (Katakura, Miyazaki et al. 2004).

4. Fragestellungen

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Integration poröser Polyethylenimplantate im Sinne des *Tissue Engineering* durch eine „Vitalisierung“ mit dermalen Fibroblasten *in vivo* beeinflusst werden kann. Dabei wurden allogene - murine - Fibroblasten *in vitro* auf den Implantaten kultiviert, anschließend in transparente Rückenhautkammern von männlichen C57/Bl6 Mäusen implantiert und dort mittels *in vivo*-Fluoreszenztechniken im Hinblick auf die mikrozirkulatorische Integration und eine entzündliche Aktivierung des neugebildeten Endothels untersucht. Nach 10 Tagen erfolgte die Messung der mechanischen Desintegrationskraft und anschließend eine Analyse immunmodulatorischer Zytokine im Implantatbett und im umliegenden Bindegewebe.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1) Lassen sich dermale Fibroblasten auf porösem Polyethylen kultivieren und erfolgreich *in vivo* implantieren, so dass „vitalisierte“ Implantate entstehen?
- 2) Welchen Einfluss haben die vitalen Fibroblasten auf den porösen Polyethylenimplantaten auf deren mikrovaskuläre Integration *in vivo*?
- 3) Hat die „Vitalisierung“ poröser Polyethylenimplantate mit Fibroblasten Auswirkungen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion *in vivo*?
- 4) Beeinflusst die „Vitalisierung“ der porösen Polyethylenimplantate durch dermale Fibroblasten die Expression immunologisch relevanter Zytokine?
- 5) Beeinflusst die „Vitalisierung“ durch dermale Fibroblasten die mechanische Integration der porösen Polyethylenimplantate *in vivo*?

II. Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere dienten männliche C57/Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld; Abb. 2). Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn zu mehreren (3-6) in Käfigen mit freiem Zugang zu Standardtrockenfutter (Sniff; Spezialdiäten GmbH, Soest) und Leitungswasser gehalten, nach Aufnahme in den Versuch unter gleichen Bedingungen in Einzelkäfigen. Die Umgebungstemperatur im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin (WBEx) betrug 24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Beleuchtung erfolgte durch künstliches Licht in einem 12-stündlich wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere wurden mit einem mittleren Gewicht von 25 g (23-27 g) geliefert und nach 4-6 Wochen im Tierstall des Instituts und Erreichen eines mittleren Gewichts von 30 g (27-33 g) in den Versuch aufgenommen. Als Spendertiere für die Isolierung muriner Fibroblasten (s. 2.1.1) dienten ebenfalls männliche C57/Bl6 Mäuse. Diese Tiere, wurden unmittelbar nach Anlieferung durch den Hersteller genutzt, also mit einem mittleren Gewicht von 25 g (23-27 g).



Abb. 2: C57/Bl6 Maus mit einem Körpergewicht von ca. 30 g.

1.2. Poröses Polyethylen

Poröse Polyethylenimplantate (Medpor®, Porex Surgical, Newman, GA, USA) mit einer Porengröße von 100-200 μm sollten im Sinne des *Tissue Engineering* modifiziert werden. Das Material (Abb. 3) kommt in der klinischen Anwendung bei kraniofazialen Rekonstruktionen und Augmentationen zum Einsatz und wurde vom Hersteller in Form von Implantatblättern der Größe 76 x 50 x 0,25 mm³ zur Verfügung gestellt. Vor Verwendung wurden diese auf eine Größe von 3 x 3 x 0,25 mm³ zugeschnitten. Die steril verpackt angelieferten Implantate wurden nach dem Zuschneiden und unmittelbar vor Implantation 15 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt, um Sterilität zu gewährleisten.

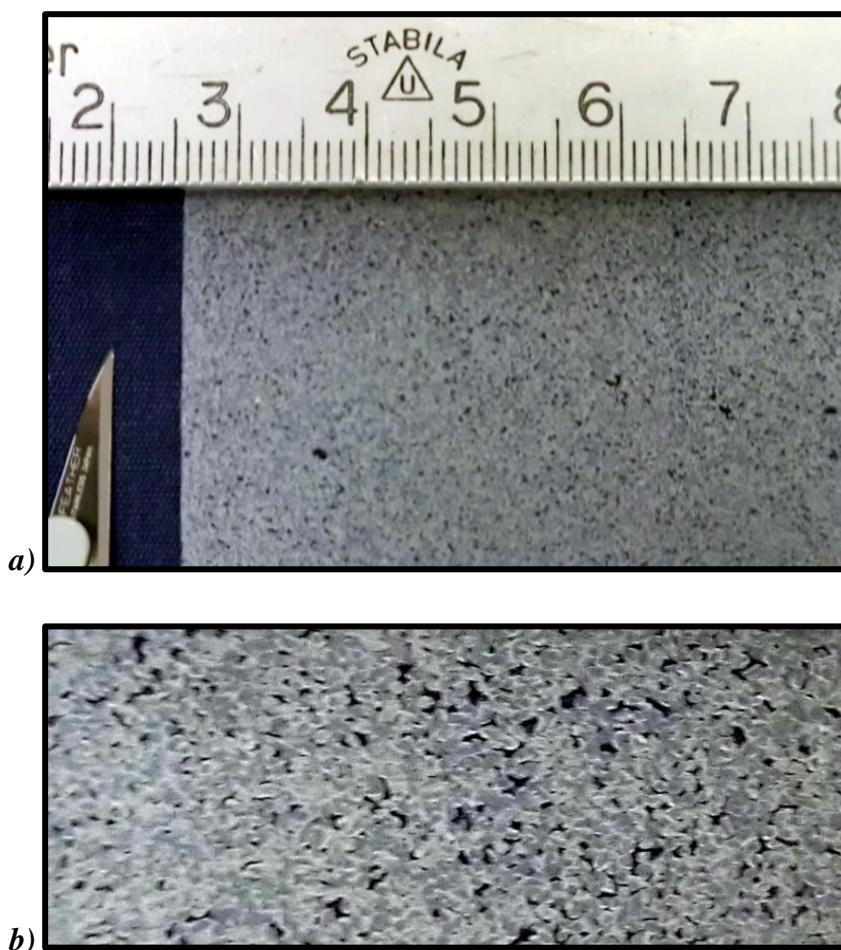


Abb. 3: Poröses Polyethylen: Das Material lässt sich je nach Anwendung zuschneiden (a). Die poröse Struktur des Materials ist in der Nahaufnahme (b) gut zu erkennen.

2. Modelle und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Isolierung der murinen Fibroblasten

Ziel war die Gewinnung einer reinen Fibroblasten-Kultur aus der Haut männlicher C57/Bl6 Mäuse. Hierzu wurde die „Haut-Explantations-Methode“ gewählt, die im folgenden beschrieben wird: zunächst wurde ein Tier durch eine intramuskuläre Gabe von 75 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia GmbH, Erlangen) und 25 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®], Bayer, Leverkusen) anästhesiert und dann durch Überstrecken der Halswirbelsäule geopfert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Rumpfhaut. Die präparierte Haut wurde in Quadrate der Kantenlänge 3 cm zugeschnitten. Als erste Reinigungs-Maßnahme wurden die Proben mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und das gesamte subkutane Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Hautquadrate 60 Minuten lang in einer Lösung aus PBS und 0,3 % Trypsin (Sigma, Deisenhofen) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, wonach die Epidermis vorsichtig mit Hilfe von zwei Pinzetten abgetragen werden konnte. Dieser Schritt erfolgte, um eine reine Fibroblastenkultur zu gewinnen. Nach einer erneuten Wäsche mit PBS wurden die Quadrate auf eine Kantenlänge von 2 – 3 mm verkleinert und in 6-Well-Kulturplatten (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) platziert. Sterile 22 mm-Glasabdeckungen, platziert über den Hautproben, ermöglichen adhärentes Wachstum in Kultur. Als Kulturmedium wurden 1 – 2 ml DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich, München) pro Well hinzugefügt und alle drei bis vier Tage gewechselt. Nach ca. 10 Tagen Inkubation bei 37 °C im Zellkulturschrank ließ sich eine konfluente Zellpopulation unter dem Mikroskop feststellen. Die Deckgläser wurden entfernt und die Zellplatten zweimal mit PBS gewaschen um jegliches Kulturmedium zu entfernen, da das darin enthaltene FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma-Aldrich, München) die Aktivität von Trypsin inhibieren kann. Dann wurde 1 ml 0,3 % Trypsin pro Well hinzugefügt und ca. fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den nun mit bloßem Auge erkennbar von der Plattenoberfläche abgelösten Zellen wurde 1 ml DMEM pro Well gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellauspension wurde daraufhin 10 Minuten lang mit 150 G zentrifugiert. Nach Aspiration des Überstands konnten die Zellpellets mit DMEM auf 10 mm Kulturplatten (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) platziert und wiederum bei 37 °C im Zellkulturschrank inkubiert werden. Die so entstandenen reinen

Fibroblasten-Kulturen wurden durch regelmäßige Medium-Wechsel und Zellsplitting alle 7-10 Tage und insgesamt drei bis fünf Mal, auf 10 mm Kulturplatten passagiert.

2.1.2. GFP-Transfektion der isolierten Fibroblasten

Ziel war es, die gewonnenen Fibroblastenkulturen (Abb. 4a) mit dem ursprünglich aus der Qualle *Aequora victoria* isolierten *Green Fluorescent Protein* (GFP) zu transfizieren, welches es erlaubte, die Fibroblasten unter dem Fluoreszenzmikroskop leicht zu identifizieren (Abb. 4b) und später mittels konfokaler Mikroskopie zu quantifizieren (Abb. 4c). Dies ermöglichte es, wiederholt *in vitro* und *in vivo* die Anzahl an vitalen Zellen auf dem porösen Polyethylen zu bestimmen.

Im ersten Schritt wurden 5 µl DNA in Form von GFP-Plasmid (Plasmid 12091, Addgene, Cambridge, MA, USA) im Verhältnis 1:50 mit Opti-MEM® Reduced Serum Medium (Invitrogen, Karlsruhe) gemischt. Das Plasmid enthält zusätzlich zum GFP-Gen eine Antibiotika-Resistenzsequenz, welche eine spätere Selektion transfizierter Zellen erlaubte. Des Weiteren wurden 5 µl Transfektions-Agens (Lipofectamin, Invitrogen, Karlsruhe) mit 1 ml Opti-MEM vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und wiederum 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden zwei 6-Well-Kulturplatten mit PBS gewaschen und mit 1 ml DMEM plus 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe) pro Well versehen. Pro Well wurden nun 100 µl des DNA/Lipofectamin-Gemischs hinzugefügt und 6 Stunden lang bei 37 °C im Zellkulturschrank inkubiert. Nach 6 Stunden wurden 3 ml DMEM pro Well hinzugefügt und weitere 24 Stunden inkubiert, bis ein erneuter Mediumwechsel stattfand. Nach 48 Stunden erfolgte abschließend eine Selektion der transfizierten Zellen durch die Zugabe von 1 mg Antibiotikum pro Well zum Nährmedium. So wurden Fibroblasten ohne GFP-Gen eliminiert.

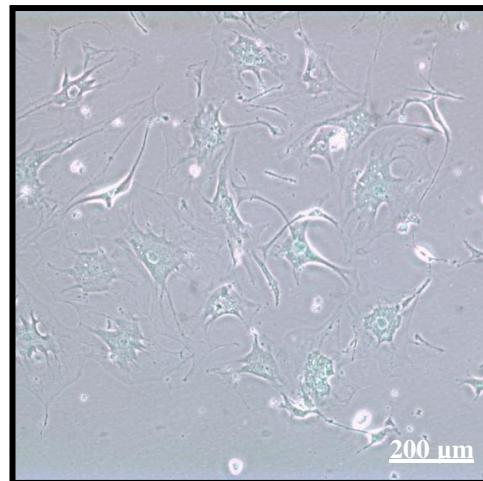


Abb. 4a: Unmarkierte Fibroblasten im Lichtmikroskop.

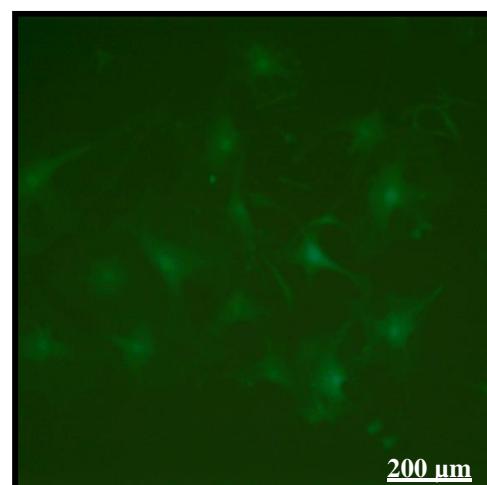


Abb. 4b: GFP-transfizierte Fibroblasten im Fluoreszenzmikroskop

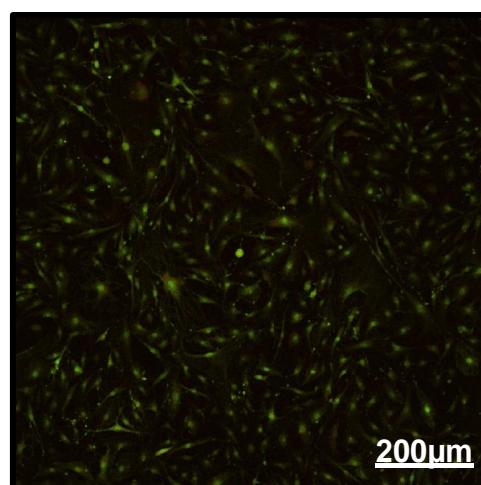


Abb. 4c: GFP-transfizierte Fibroblasten im Konfokalmikroskop.

2.1.3 Kultivierung der Fibroblasten auf porösen Polyethylenimplantaten

Um den Effekt der „Vitalisierung“ der porösen Polyethylenimplantate (Medpor®, Porex Surgical, Newnan, GA, USA) durch Fibroblasten auf die Integration *in vivo* zu untersuchen, wurde eine möglichst dichte Bewachsung des Implantatmaterials angestrebt. Zu diesem Zweck wurden die auf 3 x 3 x 0,25 mm³ zugeschnittenen und UV-bestrahlten Medpor®-Implantate (s.o.) zunächst in 6-Well-Kulturlatten eingebracht – ein Implantat pro *Well*. Da die Fibroblasten nicht frei im Medium, sondern tendenziell adhären wuchsen, wurden die Implantate am Plattenboden fixiert. Dies gelang durch eine Verankerung mit sterilen Einmalkanülen (Sterican, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz), die sich allein durch Druckausübung in den Platten fixieren ließen. Zuvor auf anderen Platten kultivierte und mit GFP-transfizierte Fibroblastenpopulationen wurden mittels Trypsinzugabe gelöst und zusammen mit 3 ml DMEM pro *Well* auf die Implantate verteilt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C im Zellkulturschrank. Die Implantate wurden unter regelmäßiger Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop so lang in DMEM belassen, bis sie dicht mit fluoreszierenden Zellen bewachsen waren. Dies war in der Regel nach 10 - 14 Tagen der Fall.

2.1.4 Quantifizierung der auf den Implantaten angewachsenen Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

Die Quantifizierung der auf den Implantaten angewachsenen Zellen fand in zwei Schritten statt. Zunächst wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Zeiss LSM 510, Göttingen) digitale Bilder der fluoreszierenden Zellen auf den Implantaten *in vitro* erzeugt (Abb. 5a). Die Implantate verblieben dabei in Zellkulturplatten und wurden vor den Aufnahmen mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen.

Die Laser-Scanning-Mikroskopie erlaubt schichtweise Aufnahmen in verschiedenen Ebenen, somit konnten fluoreszierende Zellen in allen Tiefen des porösen Implantatmaterials erfasst werden. Anschließend bestand die Möglichkeit, die aufgenommenen Schichten (und somit die erfassten Zellen) in einer Maximumsprojektion in einer virtuellen, zweidimensionalen Ebene zusammenzulegen. In einem weiteren Schritt ließen sich alle nicht-spezifischen Farbeffekte herausrechnen, so dass nur die GFP-transfizierten Zellen selektiv dargestellt wurden. Auf den so entstandenen Bildern konnte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms KS 400 (Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos) die zellbedeckte Fläche bezogen auf die Gesamtoberfläche des Implantats in Prozent bestimmt werden. Die Software erlaubte die exakte Differenzierung

zwischen fluoreszierenden Zellen und Implantatmaterial durch Festlegung geeigneter Intensitätsfilter. Da es ausschließlich um die Quantifizierung vitaler Zellen ging und GFP-Fluoreszenz hier als Marker eindeutig intakter Zellen gewertet werden konnte (Tan, Sendemir-Urkmez et al. 2004), konnten alle nicht grün fluoreszierenden Farbeffekte aus den Darstellungen eliminiert werden.

Diese Zellzahlanalyse wurde sowohl vor Implantation - *in vitro* - als auch nach Explantation des Materials - *ex vivo* - durchgeführt.

2.2. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer wurde von Endrich und Mitarbeitern entwickelt (Endrich, Asaishi et al. 1980; Asaishi, Endrich et al. 1981) und hat sich seitdem zum Goldstandard bei der *in vivo*-Visualisierung und Analyse von angiogenetischen und hämodynamischen Vorgängen entwickelt und sich auch bei der Quantifizierung von Zell-Endothelzellinteraktionen bewährt (Menger, Laschke et al. 2002). Die insgesamt ca. 5 g schwere Rückenhaukammer besteht aus zwei identischen Titanplatten, die jeweils mittig eine kreisrunde Fensterung aufweisen (Abb. 5a). Die Platten werden mit Schrauben und Nähten so auf dem Rücken des Versuchstieres angebracht, dass die Haut und das darunter liegende Gewebe dazwischen aufgespannt werden; Distanzmuttern sorgen dabei jedoch für einen Abstand von ca. 4 mm, so dass eine Gewebekompression vermieden wird. Das Präparationsareal liegt auf einer Seite direkt unter der runden Öffnung – auf dieser Seite kann mit Hilfe eines Sprengrings ein Deckglas (Durchmesser 11,8 mm; Stärke 1 mm; Edgar Hefele Medizintechnik, München) aufgesetzt werden, welches im Versuchsverlauf als Beobachtungsfenster dient. Das Deckglas lässt sich jederzeit öffnen und gewährt damit Zugang zum Präparationsareal (Abb. 5b).

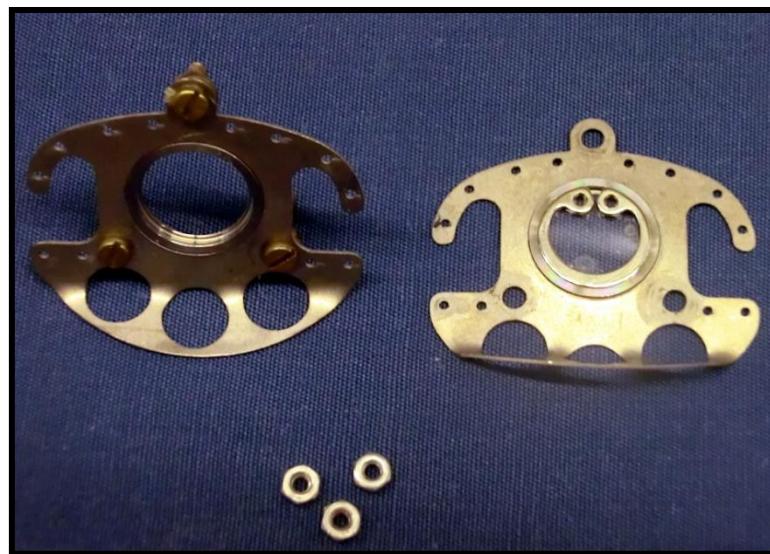


Abb. 5a: Rückenhautkammer aus Titan.



Abb. 5b: C57/Bl6 Maus mit transparenter Rückenhautkammer.

2.2.1. Präparation

Um das intraoperative Infektionsrisiko möglichst gering zu halten, wurden vor Beginn der Präparation das Operationsbesteck, Abdecktücher und die Kammern selbst dampfsterilisiert (134 °C, 2 bar, ca. 15 Minuten). Eine Kammerhälfte war vorher mit Distanzmuttern und Fixierschrauben versehen worden, die Gegenseite mit Sprengring und Deckglas in der

mittigen Öffnung, dem späteren Beobachtungsfenster. Als Operationsfeld diente eine steril abgedeckte Wärmeplatte, auf der die Tiere während des Eingriffs permanent gelagert waren. Die Tiere befanden sich während der gesamten Operation unter Narkose, welche durch eine präoperative, intramuskuläre Gabe von 75 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pharmacia GmbH, Erlangen) und 25 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer, Leverkusen) in den Oberschenkel gewährleistet wurde.

Der erste Schritt nach Beginn der Narkose bestand darin, die Tiere an Rücken und Flanken möglichst vollständig zu enthaaren. Nach initialer Rasur mit einem Langhaarrasierer wurden die restlichen Haare durch zweimaliges Auftragen von Enthaarungscreme (Plica med Creme®, Asid Bonz GmbH, Bieblingen) entfernt und das Areal anschließend mit 72 % Alkohol (Cutasept®, Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert.

Am enthaarten Rücken ließ sich nun unter Durchleuchtung die Gefäßversorgung identifizieren, speziell die großen *Aa. costales* rechts und links, die bei der Operation geschont werden sollten. Um dies zu gewährleisten wurde durch Anheben der Rückenhaut eine Hautfalte gebildet und mit Hilfe von Haltefäden (Ethibond® Excel 5/0, Ethicon, Norderstedt) so fixiert, dass die genannten Gefäße nicht im OP-Bereich lagen. Auf der dem Operateur abgewandten Seite (in der Regel rechts) konnte nun die zuvor mit Schrauben ausgestattete Kammerhälfte am Oberrand der Hautfalte festgenäht werden. Nach dieser initialen Positionierung folgten am Unterrand zwei Stichinzisionen, durch die die beiden Fixierschrauben geführt wurden.

Auf der dem Operateur zugewandten Seite wurde nun der Bereich des späteren Sichtfensters mit einem Filzstift markiert. Orientierung lieferte dabei, wiederum unter Durchleuchtung, die runde Aussparung der schon fixierten Kammerhälfte auf der Gegenseite. In Seitenlage (markierte Seite oben) wurde nun die Präparation des Fensters unter 16-facher Vergrößerung (Wild M650; Wild AG, Heerbrugg, CH) durchgeführt. *Dermis* und subkutanes Gewebe wurden möglichst atraumatisch entfernt und der Hautmuskel mitsamt versorgenden Gefäßen der Gegenseite freigelegt. Ständiges Benetzen des Präparationsareals mit 0,9 % NaCl verhinderte ein Austrocknen.

Im letzten Schritt wurde die zweite Kammerhälfte mitsamt dem Deckglas auf die Fixierschrauben aufgesetzt und am Oberrand mit der Haut und der Titanplatte der Gegenseite vernäht. Abschließend wurde das gesamte rasierte Hautareal mit feuchtigkeitsspendender Creme (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) versorgt.

2.2.2. Implantation

48 Stunden nach der Kammerpräparation wurden die Tiere im wachen Zustand in Plexiglasröhren (Effenberger, München) fixiert, welche mit einem Längsschlitz versehen waren, so dass die Kammer aus der Röhre herausragte und dem Operateur zugänglich war. Die Tiere tolerierten dies gut, zumal am Kopfende der Röhre jeweils ein Luftloch angebracht war, welches den Tieren problemloses Atmen ermöglichte. Die Röhren ließen sich auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne (Effenberger, München) so positionieren, dass die Kammern mit dem Sichtfenster zuoberst unter dem Operationsmikroskop zu liegen kamen. Nach alkoholischer Desinfektion des Deckglases (Cutasept®, Bode Chemie, Hamburg) konnte der Sprengring gelöst und das Deckglas abgehoben werden. Mit sterilen Instrumenten wurden nun $3 \times 3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ große poröse Polyethylenimplantate auf das Präparationsareal aufgesetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde ein neues, steriles Deckglas eingesetzt und die Adhärenz des Präparationsareals mit dem Deckglas sichergestellt.

2.2.3. Ausschlusskriterien

Zwei Tage nach der Operation zeigten sich die Versuchstiere in der Regel kaum beeinträchtigt von der Operation. Atypische Verhaltensweisen, Gewichtsverlust und ähnlichesstellten Ausschlusskriterien dar, waren aber nicht zu beobachten.

Die Kammern wurden regelmäßig auf Intaktheit und Unversehrtheit untersucht, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch. Tiere, die Einblutungen und Entzündungszeichen wie putride Sekretion oder ödematöse Schwellung aufwiesen, wurden vom Versuch ausgeschlossen (Sewell 1966).

2.2.4. Makroskopische Dokumentation

Zur Dokumentation der Intaktheit der Kammer und des Beobachtungsareals sowie der Dokumentation von Veränderungen im Versuchsverlauf wurden die Rückenhautkammern der Tiere vor den jeweiligen Untersuchungen fotografiert (Nikon Coolpix 995, Nikon Corp., Tokio, Japan). Hierzu wurden die Tiere wie bereits unter 2.2. beschrieben in Plexiglasröhren fixiert. Pro Aufnahmetag und Tier wurden zwei Fotos gemacht, eines unter Auflicht (Abb. 6a), ein weiteres unter Durchleuchtung (Abb. 6b).

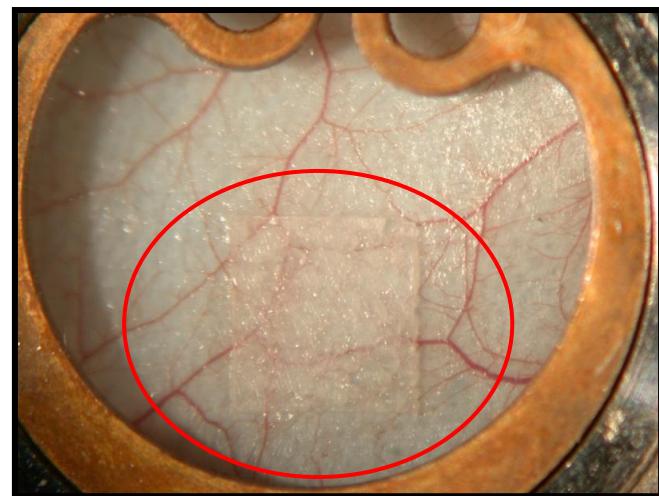


Abb. 6a: Makroskopische Auflichtaufnahme einer Rückenhautkammer mit Implantat (3 x 3 x 0,25 mm³).

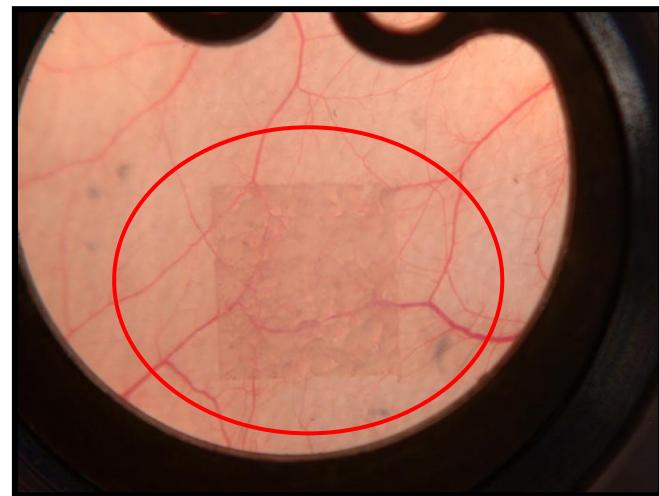


Abb. 6b: Makroskopische Durchlichtaufnahme einer Rückenhautkammer mit Implantat (3 x 3 x 0,25 mm³).

2.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie stellte für die hier behandelte Fragestellung eine geeignete Untersuchungsmethode dar. Hiermit konnten die für den Integrationserfolg von Fremdmaterial entscheidende Parameter, wie Angiogenese und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als Parameter der entzündlichen Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten *in vivo* gemessen werden.

2.3.1. Fluoreszenzmarker

Als Fluoreszenzmarker kamen hochmolekulares Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, MW 500 kD, Sigma, Deisenhofen) und Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen) zum Einsatz. Diese wurden den Versuchstieren jeweils vor Beginn der mikroskopischen Aufnahmen über eine der beiden Schwanzvenen appliziert. Als Katheter, der während der Dauer der Untersuchung im Gefäß verblieb, um jederzeit Nachinjektionen zu ermöglichen, diente eine sterile Einmalkanüle (Sterican 0,4 mm x 20 mm, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz). Die Plasmamarker fluteten rasch an, so dass die mikroskopischen Untersuchungen direkt nach Applikation durchgeführt werden konnten.

2.3.1.1. FITC-Dextran

Durch die gute Wasserlöslichkeit und der daraus resultierenden raschen und gleichmäßige Verteilung des hochmolekularen FITC-Dextran konnte das Gefäßsystem dargestellt und hämodynamische Parameter wie beispielsweise die Fließgeschwindigkeit bestimmt werden (Abb. 7a) Vergleichende Aufnahmen zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten machten es zudem möglich, Gefäßneubildungen im Verlauf quantitativ zu erfassen.

Das Exzitationsmaximum von FITC-Dextran liegt bei 490 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm. Verwendet wurde der Marker in einer Konzentration von 5 % in 0,9 % NaCl; bei einem Körpergewicht von ca. 30 g waren in der Regel ca. 0,07 ml pro Tier und Aufnahmetag ausreichend.

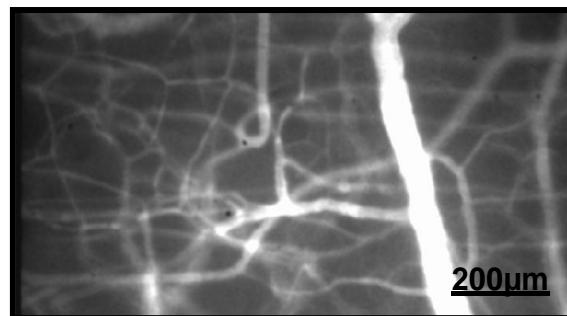


Abb. 7a: Intravitalmikroskopische Gefäßmarkierung mit FITC-Dextran: Kleinste Gefäße werden deutlich dargestellt, was eine Bestimmung der mikrohämodynamischen Parameter ermöglicht.

2.3.1.2. Rhodamin 6G

Rhodamin 6G akkumuliert nach intravasaler Gabe in den Mitochondrien von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. So markiert konnten die Leukozyten quantifiziert und deren Interaktion mit den Endothelzellen analysiert werden (Abb. 7b).

Rhodamin 6G besitzt seine Maxima bei 525 nm (Exzitation) und 555 nm (Emission). Verabreicht wurden wiederum ca. 0,07 ml pro Tier und Aufnahmetag in einer Konzentration von 0,5 % in 0,9 % NaCl.

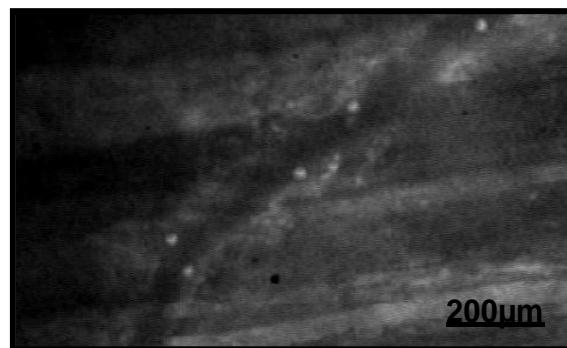


Abb. 7b: Intravitalmikroskopische Leukozyten-Markierung mit Rhodamin 6G: Die markierten Leukozyten sind in den Gefäßen deutlich zu erkennen.

2.3.2. Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz stellte eine Einheit bestehend aus Mikroskop mit speziellem Objekttisch und Quecksilberlampe sowie angeschlossenen Aufnahmegeräten dar. Die Geräte waren im einzelnen:

- Mikroskop (Axiotech vario, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen (Plan-Neofluar® x4, 10, 20, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Manuell steuerbarer Objekttisch (x-y-Richtung) mit integrierter fiberoptischer Durchlichtquelle (Fa. Märzhäuser, Wetzlar)
- Reflektorschieber 3FL mit Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm) und Filterset 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm, beide Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)
- SIT-Videokamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching)
- Digitaler Videorekorder (Sony DVCAM DSV 45P, Sony, Köln)
- Videozeitgenerator (VGT 33, FOR-A-Company Ltd., Tokio, Japan)

Die verschiedenen Fluoreszenzfilter konnten im Versuchsverlauf abwechselnd im Lichtweg positioniert werden, ebenso war eine Einstellung möglich, mit der eine Ansicht unter Durchlicht ermöglicht wurde.

Mit dem Videozeitgenerator wurden die Aufnahmen mit dem aktuellen Datum sowie der Aufnahmezeit versehen, was die spätere Auswertung erleichterte. Zur besseren Dokumentation und Aufnahmekontrolle wurde zudem ein hochauflösender Übersichtsmonitor an die Kamera angeschlossen.

2.3.3. Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Videoanalyse

Für die Untersuchungen wurden die Versuchstiere in den zuvor beschriebenen Plexiglasröhren (s. 2.2.) immobilisiert und so auf dem Objekttisch positioniert, dass das Sichtfenster der Kammer unter dem Mikroskop zu liegen kam. Nach Applikation der Marker FITC-Dextran und Rhodamin 6G (s. 3.1.) und einer Wartezeit von ca. 5 Minuten (um eine ausreichende Verteilung im Gefäßsystem zu gewährleisten), wurde zunächst unter geringer

Vergrößerung (4 x) die Unversehrtheit der Kammer und korrekte Positionierung des Implantats sichergestellt. Anschließend erfolgte die Auswahl der Messbereiche. Pro Versuchstier wurden 6 *Regions of Interest* (ROIs) ausgewählt, jeweils drei im Zentrum des Implantats und drei im Übergangsbereich zwischen Implantat und Gewebe. Die Bereiche wurden anhand von Koordinaten markiert und bei den Folgeuntersuchungen wieder aufgesucht.

Pro ROI erfolgte nun eine Aufnahme mit Zeiss Filterset #09 zur Anregung von FITC-Dextran und Zeiss Filterset #14 für Rhodamin 6G. Die Aufnahmedauer betrug pro ROI und Filter 30 Sekunden. Zwischen den Belichtungszeiten, z.B. bei Positionswechseln, wurde darauf geachtet, die Fluoreszenzquelle abzudecken, um etwaige phototoxische oder -dynamische Schädigungen im Gewebe zu vermeiden.

Die so erstellten Videosequenzen wurden mit Hilfe eines Bildanalysesystems (Cap Image, Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. Der hierfür verwendete Personalcomputer war mit einer Bildverarbeitungskarte (IP-8, Matrox, Quebec, Kanada) ausgestattet und wurde über eine RS-232-Schnittstelle mit dem digitalen Videorekorder und einem zusätzlichen Videomonitor (PVM 1442QM, Sony, Köln) verbunden.

2.3.4. Messparameter

Mit Hilfe der oben beschriebenen Geräte wurden folgende Parameter bestimmt:

Zur Analyse mikrohämodynamischer Veränderungen und angiogenetischer Prozesse:

- Erythrozytenfließgeschwindigkeit in mm/s
- Gefäßdichte in cm/cm²
- Gefäßdurchmesser in μm

Zur Beurteilung potentieller entzündlicher Vorgänge:

- Leukozytenflux in 1/s
- Leukozytenadhärenz am Endothel in 1/mm²

2.3.4.1. Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Das Bildanalyseprogramm ermittelte die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten mit Hilfe der *Line-Shift-Diagramm-Methode* (Klyszcz et al., 1997). Hierbei wird zunächst im stehenden Bild in mehrere (pro ROI 3-5) Gefäße eine zum Gefäßverlauf parallele Linie eingezeichnet. Die Filmsequenz läuft nun 10 Sekunden lang. Während dieser Zeit registriert das Programm die Grauwerte jedes Halbbilds entlang der eingezeichneten Linie und stellt diese in einem Diagramm dar. Die x-Achse entspricht dem Aufnahmezeitraum (10 Sekunden), die y-Achse stellt die eingezeichnete Messlinie dar. Die unterschiedlichen Grauwerte werden nun im Verhältnis zur Messlinie und dem zeitlichen Verlauf als Linien mit unterschiedlichen Steigungen dargestellt. Erzeugt werden die variierenden Grauwerte von sich entlang der Messlinie bewegenden Erythrozyten - je nach Geschwindigkeit ihrer Bewegung erzeugen sie eine eher steile oder flache Kurve. Aus der Steigung berechnet das Programm die Fließgeschwindigkeit (= ds/dt).

2.3.4.2. Funktionelle Gefäßdichte

Als funktionelle Gefäßdichte wird die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße innerhalb eines Messareals bezeichnet (Abb. 8a). Änderungen dieses Parameters lassen Rückschlüsse auf Angiogeneseprozesse im Gewebe zu (Dellian et al., 1996; Nolte et al., 1995). Zur Berechnung wurden im jeweils analysierten ROI alle mit FITC-Dextran markierten und somit perfundierten Gefäße markiert. Nach abgeschlossener Markierung berechnet das Bildanalyseprogramm die Gefäßlänge in Bezug auf die Fläche des jeweiligen Bildausschnitts.

2.3.4.3. Gefäßdurchmesser

Um Aussagen bezüglich möglicher Gefäßdurchmesserveränderungen im zeitlichen Verlauf treffen zu können, wurden pro ROI die Durchmesser von 15-20 perfundierten Gefäßen markiert und ein Mittelwert gebildet (Abb. 8 b).

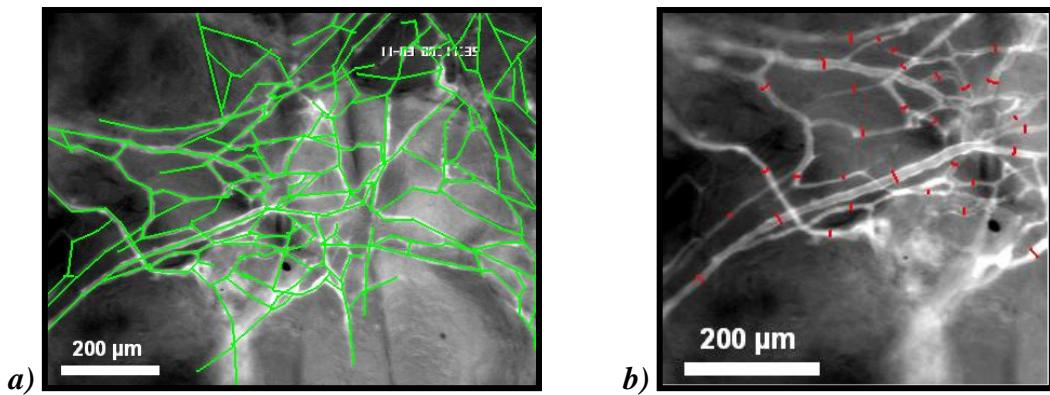


Abb. 8: Messung der funktionellen Gefäßdichte (a) und des Gefäßdurchmessers (b).

2.3.4.4. Leukozytenflux und –adhärenz

Als Leukozytenflux wurde die Anzahl der Leukozyten definiert, die einen bestimmten Gefäßabschnitt in einem definierten Zeitintervall passieren. Hierfür wurde eine zur Gefäßachse senkrecht verlaufende Linie in einer digitalen Bildsequenz markiert und die Anzahl der innerhalb von 30 Sekunden passierenden Leukozyten registriert. Hieraus konnte die pro Sekunde passierende Anzahl Leukozyten bezogen auf einen Millimeter Gefäßstrecke errechnet werden.

Leukozyten, welche über den gesamten Beobachtungszeitraum (30 Sekunden) hinweg an einer markierten Stelle an der Gefäßwand hafteten, wurden als adhärente Zellen definiert und gezählt. Die Angabe erfolgte in Anzahl pro Quadratmillimeter Gefäßoberfläche.

2.4. Messung der dynamischen Desintegrationskraft

Die dynamische Desintegrationskraft diente als Parameter, um zu bestimmen, wie stark die porösen Polyethylenimplantate an Tag 10 nach Implantation im Gewebe verankert waren. Unmittelbar nach Opferung der Versuchstiere wurde hierzu die Zeit in Sekunden gemessen, die notwendig war, um die Implantate unter dynamischer Krafteinwirkung aus dem Implantatbett herauszulösen (Abb. 9).

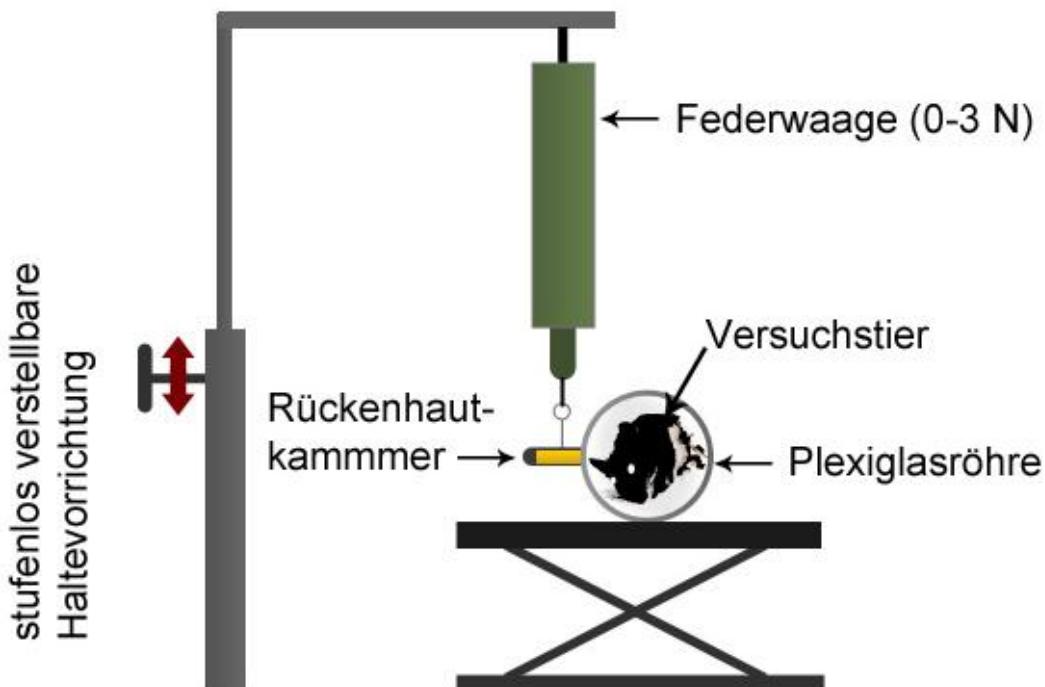


Abb. 9: Schematische Versuchsanordnung zur Bestimmung der dynamischen Desintegrationskraft: Über eine an einer stufenlos verstellbaren Halterung aufgehängte Federwaage kann eine dynamische Zugkraft auf das fixierte Implantat ausgeübt werden.

2.4.1. Versuchsaufbau und Messung

Nach Abschluss der finalen intravitalmikroskopischen Messungen an Tag 10 wurden die Versuchstiere zunächst mit einer geringen Dosis Halothan (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ, USA) anästhesiert und dann durch Überstrecken der Halswirbelsäule geopfert. Direkt im Anschluss wurden die Kammern auf der Plexiglasbühne fixiert. Unter dem OP-Mikroskop (Wild M650, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) wurde nun zunächst ein Polyamid-Faden (Ethilon® 9-0, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA) durch eine Ecke des Implantats gezogen. Dieser wurde an der Federwage eingehängt und die Plexiglasbühne anschließend so ausgerichtet, dass die Zugrichtung am Implantat genau senkrecht erfolgen konnte. Beginnend bei einer Kraft von 0,1 N wurde nun die Zeit gemessen, die erforderlich war, um das Implantat durch gleichmäßige Zugzunahme an der Waage aus dem Gewebe zu lösen. Die hierfür notwendige Zeitspanne ist direkt proportional zur Desintegrationskraft in cN/mm² (Menger, Hammersen et al. 1992; Laschke, Haufel et al. 2005).

2.5. Molekularbiologische Methoden

Sowohl aus dem Implantatmaterial selbst, als auch aus dem umliegenden Gewebe, wurden nach Explantation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analysen die Konzentrationen folgender Zytokine bestimmt, welche eine Rolle bei Entzündungsgeschehen, bei angiogenetischen Prozessen, sowie bei der Interaktion mit Fibroblasten spielen können:

- IFN- γ
- TNF- α
- IL-1 β , -2, -4, -10, -17A
- MMP-2 und -9

Nach Explantation der $3 \times 3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ großen Polyethylenimplantate und Quantifizierung der Fibroblasten wurden diese mit sterilen Instrumenten aufgeteilt. Ein Teil wurde in RNA-stabilisierender Lösung (RNAlater®; Invitrogen, Karlsruhe) für 24 Stunden bei 5 °C gelagert, danach bei -80 °C eingefroren. In gleicher Weise wurden Gewebeproben aus der unmittelbaren Umgebung des Implantats behandelt.

Die Analyse der Proben erfolgte ca. 14 Tage später an der Klinik für Dermatologie und Allergologie in München in den Laboren der Arbeitsgruppe für Allergologisch-immunologische Aspekte der Implantatmaterialunverträglichkeit (*AllergoMat*) in Zusammenarbeit mit Dr. Burkhard Summer. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte aufgeführt.

2.5.1. RNA-Extraktion

Im ersten Schritt wurde sowohl aus den Implantatproben, als auch aus den Gewebestücken RNA isoliert. Dies geschah mit Hilfe einer Lösung von Guanidinithiocyanat und Phenol (Trifast®, Peqlab Biotechnologie, Erlangen), welche Zellen lysiert und gleichzeitig RNAsen und sonstige Enzyme deaktiviert. Pro Probe wurde 1 ml dieser Lösung verwendet. Nach Zugabe von Chloroform (200 μl), Isopropanol (500 μl , RNA-Präzipitation) und 75%-Ethanol (2 x 1 ml), Zentrifugation und Pipettierung des Überstands konnte ein RNA-Pellet isoliert werden und in RNase-freiem Wasser aufgelöst werden.

2.5.2. RNA-Quantifizierung

Um die Menge isolierter RNA zu messen und zudem zu überprüfen, ob eine ausreichende Aufreinigung erfolgt war, wurde die Nukleinsäurekonzentration durch Absorptionsmessung bestimmt. Hierzu wurden 5 µl jeder Probe im Verhältnis 1:20 mit Diethylpyrocarbonat-haltigem Wasser (DEPC-Wasser) verdünnt und die Resorption bei 260 nm gegen reines DEPC-Wasser gemessen. Die Nukleinsäure-Konzentration wurde aus folgender Beziehung bestimmt: $[RNA] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (D entspricht dem Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 20). Als ausreichend wurde eine Absorption zwischen 0,05 und 2,0 festgelegt. Bei höheren Werten war eine weitere Reinigung erforderlich.

2.5.3. Reverse Transkription

Um die Zytokin-Bestimmung per PCR durchführen zu können, musste die isolierte RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurde ein entsprechender Kit verwendet („*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*®“, Kat.-# 04379012001, Roche, Mannheim) welches die *Transcriptor Reverse Transkriptase*, ein Enzym, das in *Escherichia coli* exprimiert wird, verwendet und sich durch eine hohe Thermostabilität bis ca. 65 °C auszeichnet. Es besitzt eine RNA-gerichtete DNA-Polymeraseaktivität, eine DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, Entwindungsaktivität und eine RNase H-Aktivität, die die RNA in RNA-DNA-Hybride abbaut.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

- | | |
|---------------------------------|--------|
| - RNase-freies H ₂ O | 12 µl |
| - Oligo-p(dT)15 Primer | 1,0 µl |
| - RNA | |

10-minütige Inkubation bei 65 °C um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und Abkühlung auf 4 °C, anschließend Zugabe von:

- | | |
|---|--------|
| - <i>Transcriptor RT Reaction Buffer</i> (5x) | 4,0 µl |
| - <i>Protector RNase Inhibitor</i> (40 U/µl) | 0,5 µl |
| - Deoxynucleotide Mix (10mM) | 2,0 µl |
| - <i>Transcriptor Reverse Transcriptase</i> | 0,5 µl |

Gesamtvolumen 20 µl

Das Gemisch wurde zentrifugiert, darauf erfolgten drei Inkubationsschritte:

- 30 Minuten bei 55 °C
- 5 Minuten bei 85 °C (Inaktivierung der reversen Transkriptase)
- 60 Minuten bei 4 °C

Das Eppendorf-Gefäß mit cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.5.4. Quantitative Echtzeit-/Real Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR basiert auf den Prinzipien der herkömmlichen PCR, erlaubt jedoch zusätzlich eine genaue Quantifizierung der DNA. Die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* („*FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*“-Kit, Roche, Erlangen), der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet, macht eine Quantifizierung möglich, da mit jeder Zunahme der Ziel-DNA die Fluoreszenz steigt. Indem man zusätzlich die DNA eines von der Zelle konstitutiv exprimierten und somit als Referenz dienenden „*Housekeeping*“-Gens berechnet, kann neben der absoluten auch eine relative Quantifizierung erfolgen.

Die Analyse erfolgte im *Lightcycler* (*Lightcycler 3.5*, Roche, Mannheim). Das Gerät bietet im Vergleich zur herkömmlichen PCR Vorteile wie eine deutlich kürzere Amplifikationszeit, eine durch die eingebaute Heizspirale konstante Temperatur, sowie ein mit 10 – 20 µl geringes erforderliches Probenvolumen. Des Weiteren erlaubt es eine Schmelzkurvenanalyse direkt im Anschluss an den PCR-Zyklus. Hierbei wird konstant die Temperatur erhöht und die PCR-Produkte so zum Schmelzen gebracht, gleichzeitig wird regelmäßig die Fluoreszenz des zuvor zugegebenen und in die Produkte eingebauten Farbstoffs gemessen. Da die Produkte jeweils spezifische, unterschiedliche Schmelzpunkte haben, kann damit auch zwischen den Produkten differenziert und die individuellen Mengen bestimmt werden.

Es wurde wiederum ein spezielles Kit-System verwendet („*FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*“-Kit, Roche, Erlangen). Darin ist eine speziell für den *LightCycler* geeignete DNA-Polymerase enthalten. Die Taq-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv und wird erst durch einen Inkubationsschritt über 10 Minuten bei 95 °C aktiviert (sog. „*Hot start*“-Technik), was die Sensitivität der PCR deutlich erhöht, da die Amplifikation unspezifischer Primerbindungen bei niedrigen Temperaturen weitgehend ausgeschlossen wird.

Im ersten Schritt erfolgte die Vorbereitung des Master-Kits durch Auftauen und Zugabe von jeweils 14 µl *FastStart* Taq Polymerase. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

- 5 µl H₂O
 - 0,5 µl spezifischer Primer-Mix (10 pmol jeder Primer)
 - 2 µl Master-Mix (5x konzentriert)

Hiervon wurden jeder *Lightcycler*-Kapillare 7,5 µl hinzugefügt und anschließend 2,5 µl der entsprechenden cDNA (1:10 verdünnt). Nach einer Zentrifugation bei 2500 rpm für 15 Sekunden wurden die Kapillaren in das *LightCycler*-Karussel überführt und die PCR gestartet.

Folgende Primer kamen zum Einsatz:

GAPDH:

sense 5'- GGG TTC CTA TAA ATA CGG ACT GC – 3'
 antisense 5'- CCA TTT TGT CTA CGG GAC GA – 3'
 → T_a: 60 °C → 112 bp Produkt

IFN- γ :

sense 5'- ATC TGG AGG AAC TGG CAA AA - 3'
 antisense 5'- TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AGG TA - 3'

 → T_m : 59 °C → 89 bp Produkt

IL1 β :

sense 5'- TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC - 3'
 antisense 5'- TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG - 3'
 → T_a : 60 °C → 68 bp Produkt

IL-17:

sense 5'- CAG GGA GAG CTT CAT CTG TGT - 3'
 antisense 5'- GCT GAG CTT TGA GGG ATG AT - 3'

 → T_m : 59 °C → 94 bp Produkt

IL-2 :

sense 5'- GCT GTT GAT GGA CCT ACA GGA - 3'
 antisense 5'- TTC AAT TCT GTG GCC TGC TT - 3'
 $\rightarrow T_a: 60 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 114 \text{ bp Produkt}$

IL-4:

sense 5'- CAT CGG CAT TTT GGA CGA G - 3'
 antisense 5'- CGA GCT CAC TCT CTG TGG TG - 3'
 $\rightarrow T_a: 60 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 104 \text{ bp Produkt}$

IL-10 :

sense 5'- CAG AGC CAC ATG CTC CTA GA - 3'
 antisense 5'- GTC CAG CTG GTC CTT TGT TG - 3'
 $\rightarrow T_a: 59 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 78 \text{ bp Produkt}$

MMP-2:

sense 5'- TAA CCT GGA TGC CGT CGT - 3'
 antisense 5'- TTC AGG TAA TAA GCA CCC TTG AA - 3'
 $\rightarrow T_a: 60 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 72 \text{ bp Produkt}$

MMP-9 :

sense 5'- ACG ACA TAG ACG GCA TCC A - 3'
 antisense 5'- GCT GTG GTT CAG TTG TGG TG - 3'
 $\rightarrow T_a: 60 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 87 \text{ bp Produkt}$

TNF- α :

sense 5'- TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG - 3'
 antisense 5'- GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA - 3'
 $\rightarrow T_a: 60 \text{ } ^\circ\text{C} \rightarrow 128 \text{ bp Produkt}$

2.6. Versuchsaufbau

2.6.1. Versuchsgruppen

48 Stunden nach der Kammerpräparation wurden 14 Tiere ausgewählt, die den Einschlusskriterien entsprachen (s. 2.3.) und randomisiert in zwei Gruppen zu je sechs Tieren aufgeteilt, eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe. Den Tieren der Versuchsgruppe (Gruppe I) wurde ein $3 \times 3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ großes poröses Polyethylenimplantat eingesetzt, welches in einem ca. 2-wöchigen Vorlauf mit Fibroblasten kultiviert worden war (s. 1.3.). Kurz zuvor war mit dem konfokalen Mikroskop die Zellzahl bestimmt worden. Der Rückenhautkammern der Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe II) wurden mit unbehandelten, sterilen Implantaten versehen.

Gruppe I: Polyethylenimplantate mit Fibroblasten (n = 6)

Gruppe II: Unbehandelte Polyethylenimplantate (n = 6)

Abb. 10: Randomisierung der Versuchstiere in zwei Gruppen zu 6 Tiere nach Rückenhautkammerimplantation.

2.6.2. Versuchsprotokoll

Nach einer für die Zellkultivierung der porösen Polyethylenimplantate erforderlichen *in vitro*-Vorlaufzeit von 14 Tagen, betrug der tierexperimentelle Versuchsteil 12 Tage. 48 Stunden nach Kammerpräparation hatten sich die Tiere von dem Eingriff erholt, und die Implantate wurden in die Rückenhautkammern eingesetzt. Die Implantate, welche mit Zellen bewachsen waren, wurden vor Implantation konfokalmikroskopisch untersucht um die angewachsene Zellanzahl zu bestimmen. An Tag 5 nach Implantation wurden erstmals intravitalmikroskopische Aufnahmen durchgeführt; die zweite Aufnahmeserie erfolgte an Tag 10 nach Implantation. Nachdem dies geschehen war wurden die Tiere geopfert. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Messung der mechanischen Desintegrationskraft bei den eingewachsenen Implantaten. Die Implantate wurden *ex vivo* ein weiteres Mal mit Hilfe des

konfokalen Mikroskops auf ihre Zelldichte an fluoreszierenden Fibroblasten hin analysiert und anschließend konserviert. Anschließend erfolgte die Zytokinanalyse.

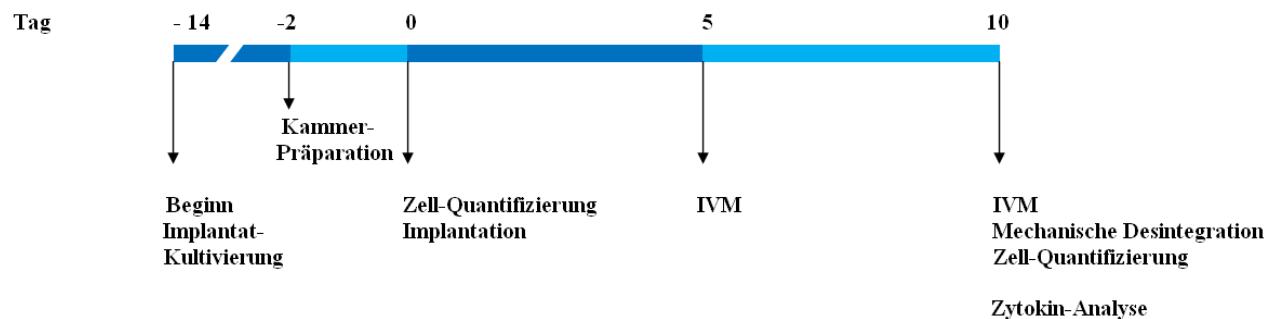


Abb. 11: Versuchsprotokoll

2.7. Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Die Ergebnisse wurden in ihrer Gesamtheit als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) dargestellt. Die Daten wurden nichtparametrisch mittels Intergruppenvergleich (*Mann-Whitney rank sum test*) und Intragruppentretest (*repeated measures analysis on ranks*) statistisch analysiert (Sigma Stat; Jandel Corp., San Rafael, USA). Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

III. Ergebnisse

1. „Vitalisierung“ der porösen Polyethylenimplantate

Sowohl vor Implantation an Tag 0, sowie nach Explantation an Tag 10 wurden die Implantate konfokalmikroskopisch erfasst und die GFP-transfizierten und per Fluoreszenz detektierbaren Fibroblasten quantifiziert (Abb. 12a – c)

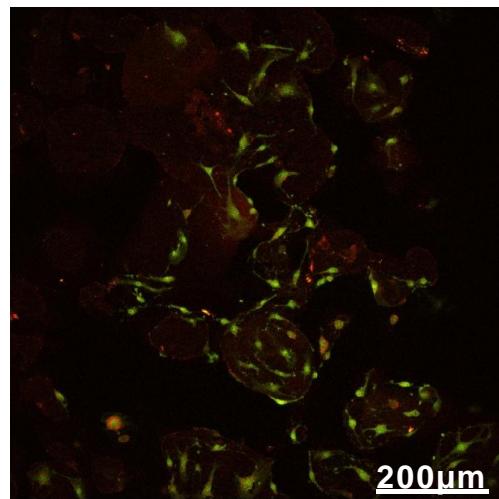


Abb. 12a: Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit Fibroblasten beschichteten Polyethylenimplantats: Darstellung einer Tiefenebene.

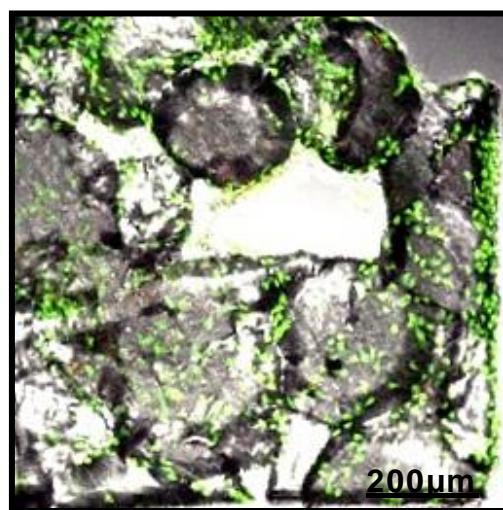


Abb. 12b: Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit Fibroblasten bewachsenen Polyethylenimplantats: Maximumsprojektion aller aufgenommenen Tiefenebenen des Implantatausschnitts.

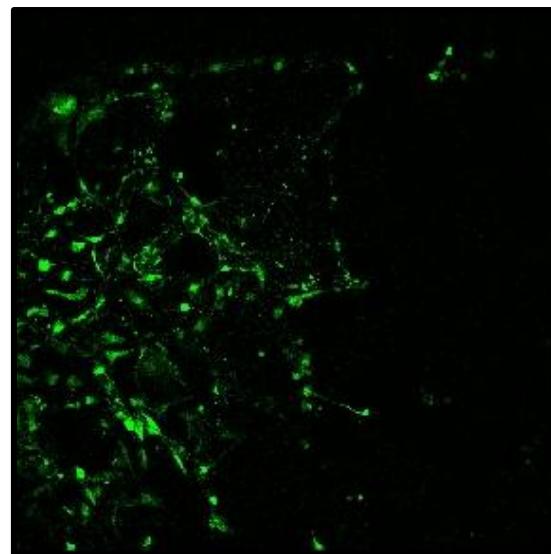


Abb.12c: Zweidimensionale Darstellung der grün fluoreszierenden Fibroblasten eines Implantatausschnitts nach Ausblendung anderer Farben zur digitalen Quantifizierung.

Mit der Quantifizierung vor Implantation sollte analysiert werden, wie viele Zellen tatsächlich auf den Implantaten kultiviert werden konnten und somit ins Versuchstier eingebracht wurden. Mit der abschließenden Quantifizierung an Tag 10 wurde die Überlebensrate der GFP-transfizierten Fibroblasten in der Rückenhautkammer überprüft.

Beim Vergleich der Zelldichte vor Implantation und nach Explantation zeigte sich, dass auch an Tag 10 noch fluoreszierende – also vitale – Zellen auf den Implantaten nachgewiesen werden konnten (Abb. 13). Es war zu diesem Zeitpunkt zwar ein geringerer Anteil der Implantatfläche mit fluoreszierenden Zellen bewachsen, als vor Implantation. Diese Reduktion war allerdings nicht signifikant. Es waren am Ende des Beobachtungszeitraumes noch über 50% der eingebrachten GFP-transfizierten Fibroblasten vital.

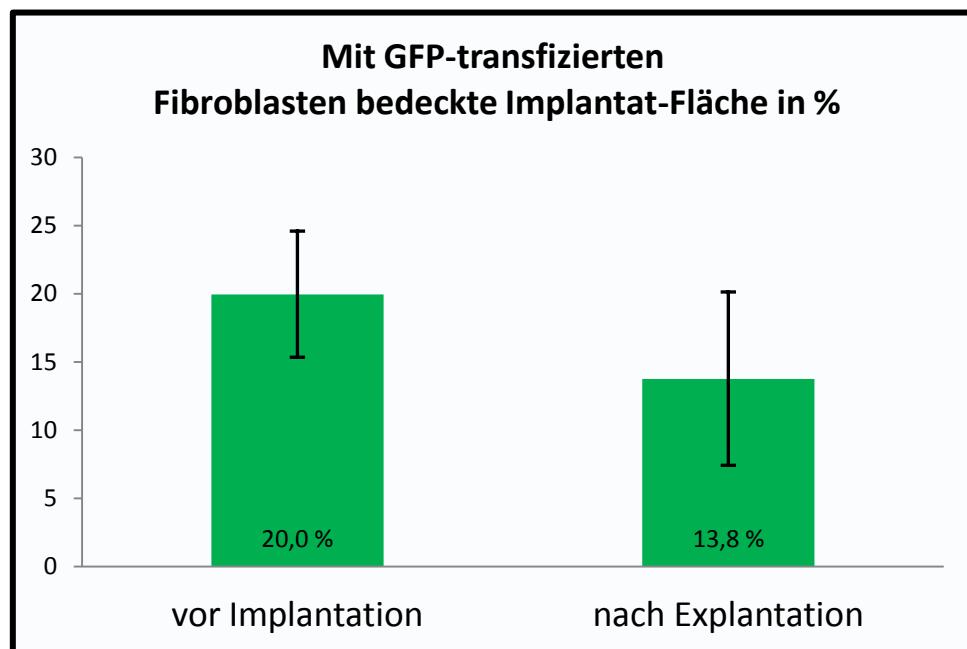


Abb. 13: Prozentualer Anteil der mit Fibroblasten bedeckten Implantatoberfläche vor Implantation und nach Explantation.

2. Angiogenese und mikrohämodynamische Parameter

Die Analyse der Angiogeneseaktivität erfolgte intravitalmikroskopisch und wurde anhand der drei Parameter **Gefäßdurchmesser** (in μm), **funktionelle Gefäßdichte** (in cm/cm^2) und **Fließgeschwindigkeit** (in mm/s) quantifiziert. Pro Tier und Messzeitpunkt wurden sechs ROIs untersucht, jeweils drei innerhalb des Implantats und drei im Bindegewebe in unmittelbarer Nähe zum Implantat. Unter 20-facher Vergrößerung, konnten an Tag 5 bereits kleine Gefäßeinsprossungen ins Implantat-Gewebe beobachtet werden, an Tag 10 waren bereits deutliche Gefäßneubildungen zu sehen. Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bestanden hier keine offensichtlichen Unterschiede.

2.1. Gefäßdurchmesser

Als Zeichen der Gefäßreifung nahmen die Gefäßdurchmesser von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt tendenziell zu (Abb. 14). Sowohl an Tag 5, als auch an Tag 10 unterschieden sich die Durchmesser der funktionellen Gefäße in den beiden Gruppen aber nicht signifikant.

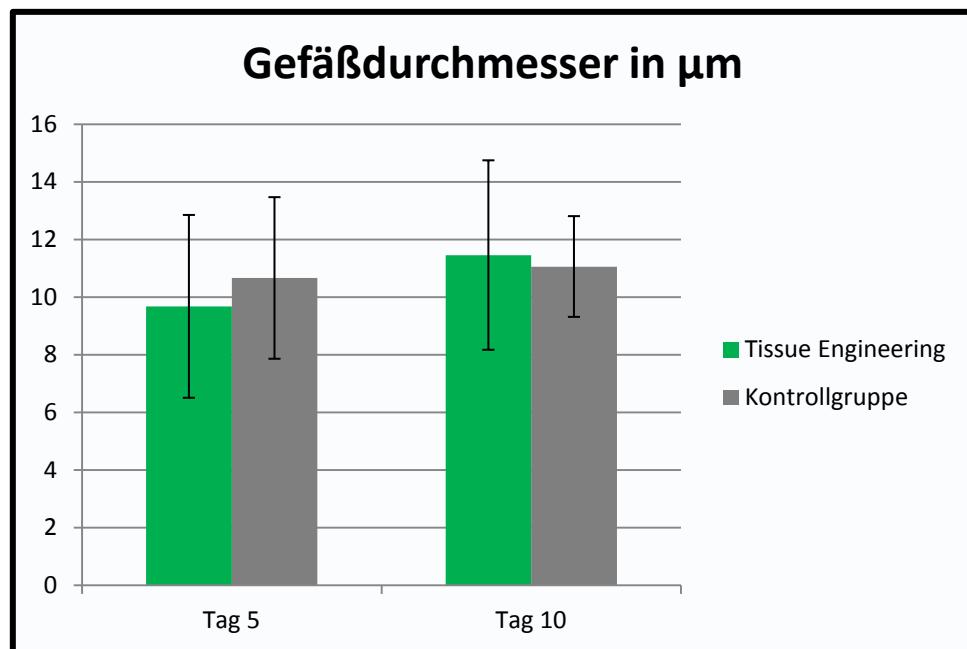


Abb. 14: Durchmesser der funktionellen Blutgefäße im Beobachtungszeitraum: Keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen (n=6).

2.2. Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte nahm ebenso in beiden Gruppen von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt tendenziell zu (Abb. 15). Es gab, jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

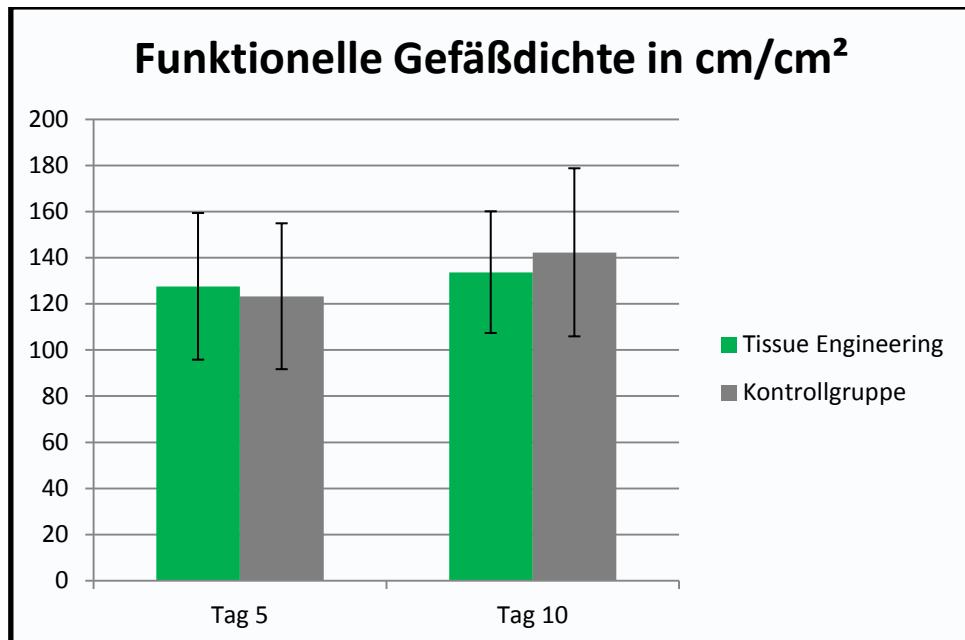


Abb. 15: Dichte der funktionellen Blutgefäße im Beobachtungszeitraum: Keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen (n=6).

2.3. Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit

Auch die Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit nahm von Tag 5 zu Tag 10 tendenziell zu. Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe traten jedoch keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 16).

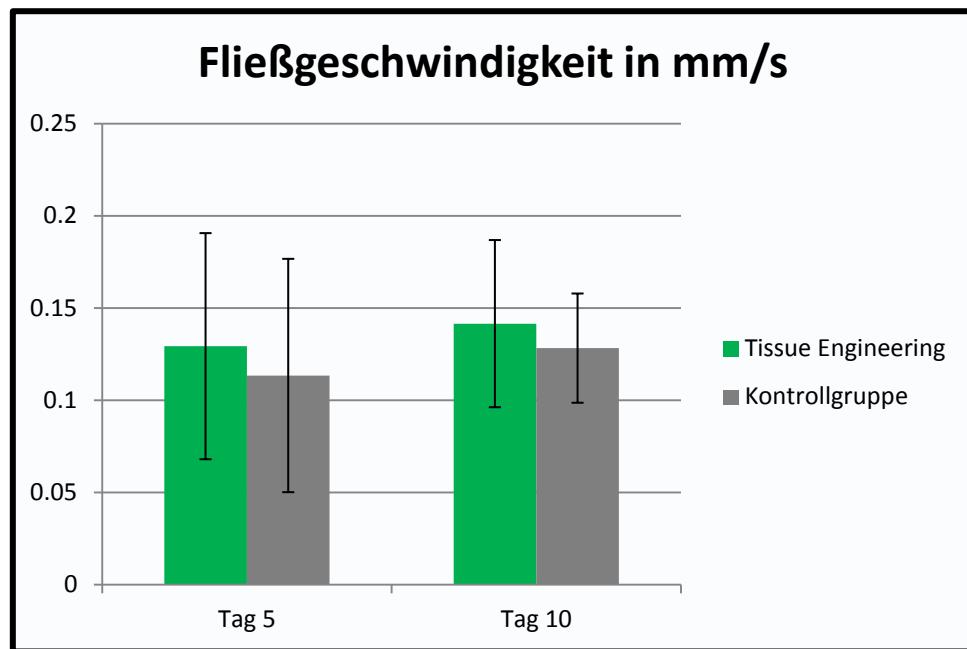


Abb. 16: Erythrozytenfließgeschwindigkeiten im Beobachtungszeitraum: Keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen ($n=6$).

3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

3.1. Leukozytenflux

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei Messung der Anzahl der zirkulierenden Leukozyten in beiden Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraumes (Abb. 17).

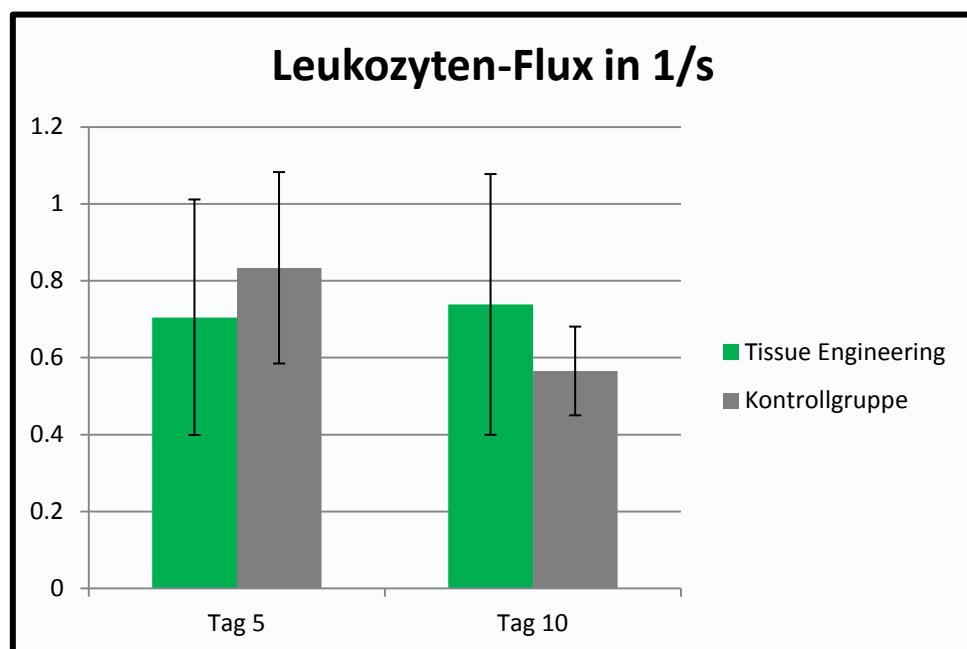


Abb. 17: Zahl der zirkulierenden Leukozyten pro Sekunde im Beobachtungszeitraum: Keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen ($n=6$).

3.2. Leukozytenadhärenz

Auch bei der Quantifizierung adhärenter Leukozyten zeigten sich keine signifikanten Veränderungen oder Unterschiede in beiden Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraumes (Abb. 18).

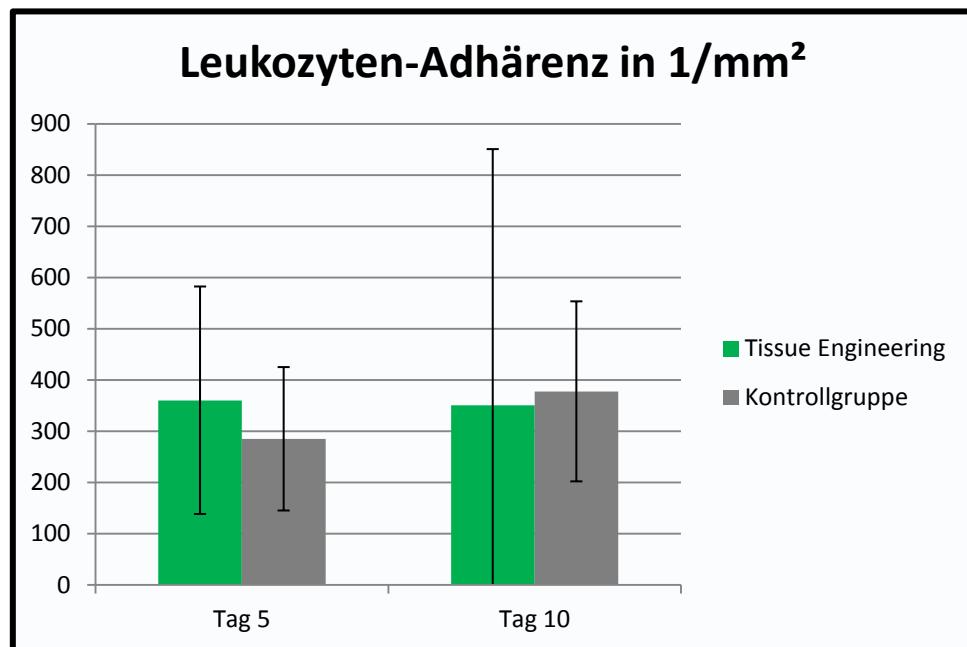


Abb. 18: Zahl der adhärenten Leukozyten im Beobachtungszeitraum: Keine signifikanten Änderungen innerhalb und zwischen den Gruppen ($n=6$).

4. Dynamische Desintegrationskraft

Um das Maß der Verankerung der Implantate im Gewebe zu quantifizieren, wurde die Kraft, die aufgewendet werden muss, um das Fremdmaterial aus den Rückenhautkammern dynamisch herauszulösen, ermittelt. Diese war bei Versuchs- und Kontrollgruppe trotz hoher Standardabweichungen nahezu identisch, es bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 19).

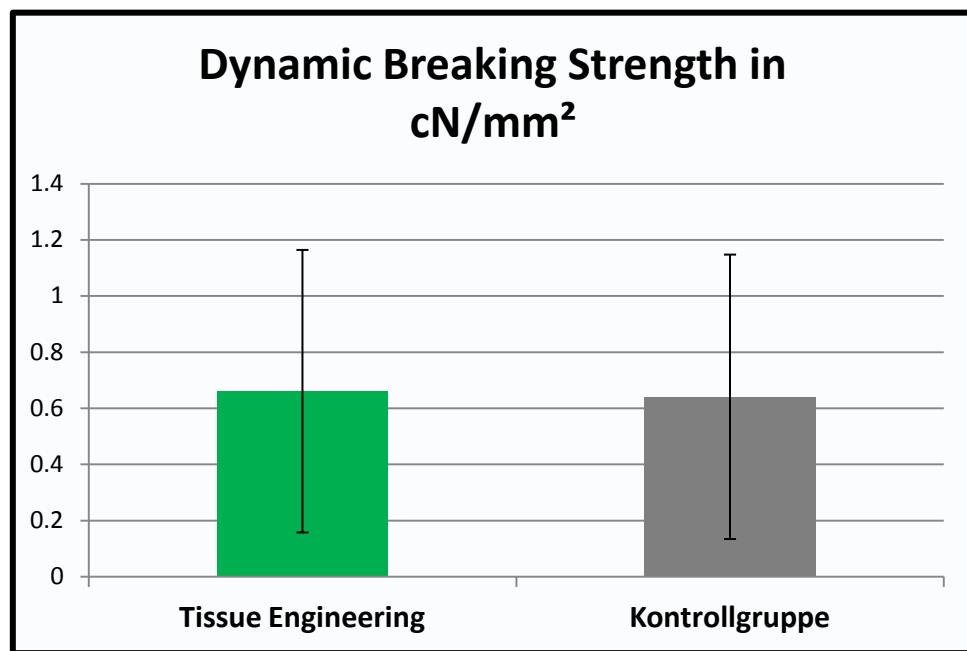


Abb. 19: Messung der dynamischen Desintegrationskraft keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (n=6).

5. Zytokinanalyse

Im Folgenden sind prozentuale Unterschiede bei den in der Versuchsgruppe gemessenen Zytokinexpressionen im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt.

5.1. MMP-2 und -9

Für die als Fibroblastenfunktionsmarker dienenden MMP-2 und -9 zeigten sich tendenziell erhöhte Expressionsraten in der Gruppe fibroblastenbewachsener Implantate (Abb. 20).

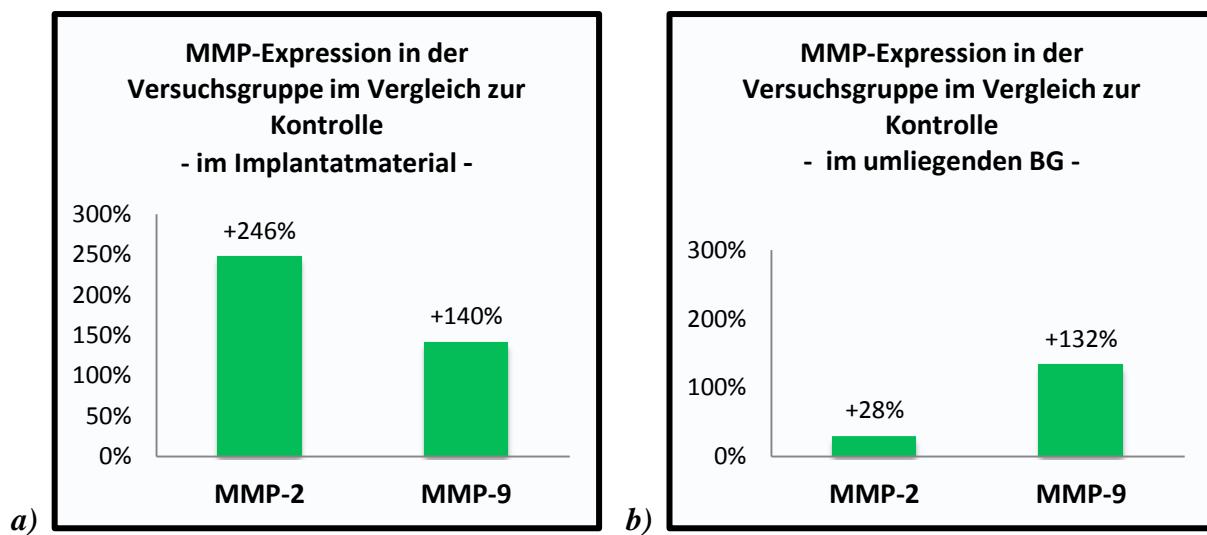


Abb. 20: Die Expressionsraten der als Fibroblasten-Funktionsmarker dienenden MMP-2 und MMP-9 waren in der Versuchsgruppe sowohl im Implantatmaterial (a), als auch im umliegenden Bindegewebe (b) tendenziell erhöht. Die gemessenen Abweichungen waren jedoch nicht signifikant (Statistik s. Anhang).

5.2. Antiinflammatorische Zytokine

Im Implantatmaterial der Versuchsgruppe wurde im Gegensatz zum umliegenden Bindegewebe und einer reduzierten IL-4-Expression eine tendenziell erhöhte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen (Abb. 21).

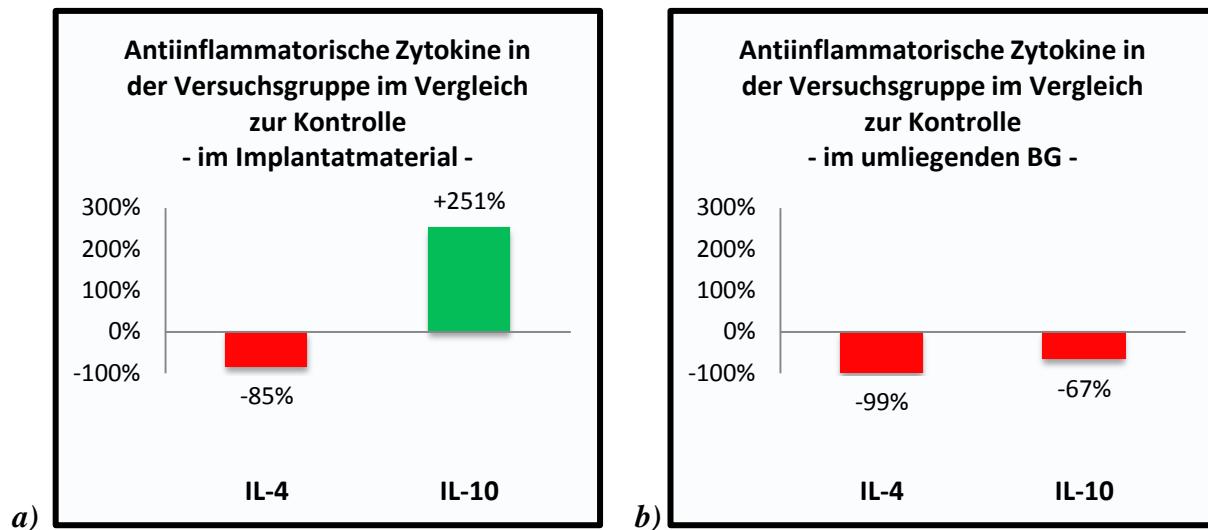


Abb 21: Expressionsraten antiinflammatorischer Zytokine: Im Implantatmaterial (a) zeigte sich in der Versuchsgruppe eine tendenzielle Erhöhung der Expression des Zytokins IL-10. Im umliegenden Bindegewebe zeigten sich keine deutlichen Unterschiede (b). Die gemessenen Abweichungen waren aber nicht signifikant (Statistik s. Anhang).

5.3. Proinflammatorische Zytokine

Es fanden sich tendenziell erhöhte Werte bei der Expression der proinflammatorischen Botenstoffe IL-2 und IL-17 im Implantatmaterial und auch teilweise im umliegenden Bindegewebe (Abb. 22), während sich die Expression von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β deutlich weniger änderte.

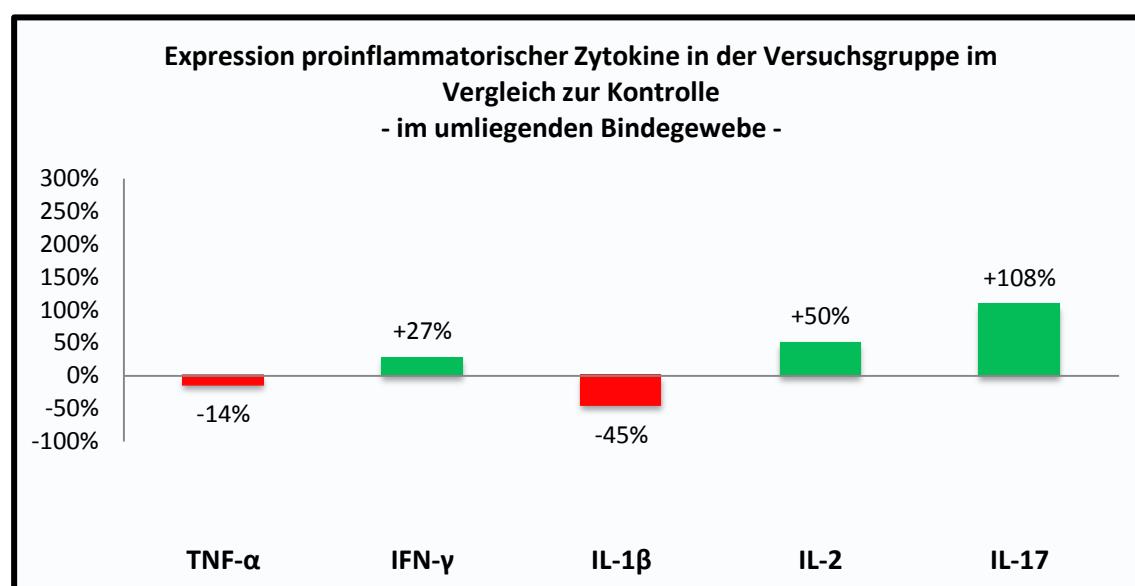
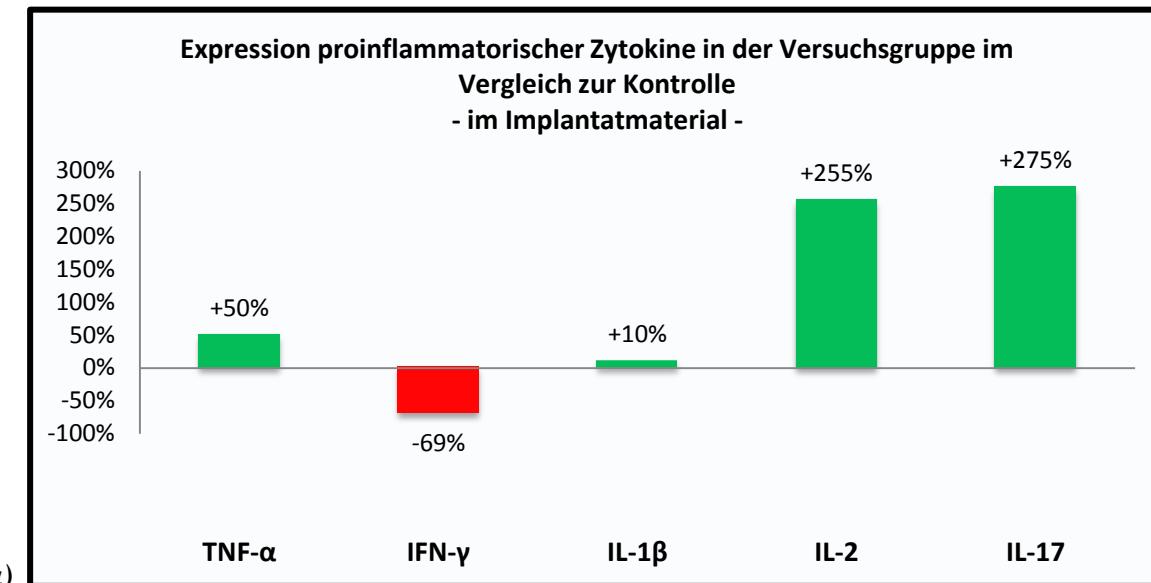


Abb 22: Expressionsraten proinflammatorischer Zytokine: Im Implantatmaterial (a) und im umliegenden Bindegewebe (b) zeigten sich in der Versuchsgruppe tendenziell erhöhte Werte für IL-2 und IL-17. Die gemessenen Abweichungen waren jedoch nicht signifikant (Statistik s. Anhang).

IV. Diskussion

1. Diskussion der Methodik

1.1. Kultivierung der dermalen Fibroblasten auf porösem Polyethylen

Zunächst wurden die aus muriner Rückenhaut isolierten Fibroblasten auf dem Implantatmaterial aus porösem Polyethylen kultiviert. Die Zielsetzung war hierbei zunächst eine möglichst dichte Bewachsung des Materials mit Zellen *in vitro*.

Grundsätzlich sind auch andere Ansätze denkbar, um die porösen Polyethylenimplantate vor Implantation im Sinne des *Tissue Engineering* mit Fibroblasten in Kontakt zu bringen. So beschreiben Han et al. eine Methode, bei der poröses Polyethylen einmalig in Fibroblastenzellsuspension getränkt und die Poren mit Fibrinogen versiegelt werden, bevor das Material implantiert wird (Han, Chun et al. 2006). Ein solches Vorgehen hat gewisse Nachteile: Zum einen ist eine Verlaufskontrolle während des Kultivierungsprozesses, um sicherzustellen, dass vitale Zellen auf den Implantaten anwachsen, unmöglich, zudem erschwert die Versiegelung eine Quantifizierung der Fibroblasten auf dem Material mittels konfokaler Mikroskopie. Ehrmantraut et al. beschreiben eine weitere Vorgehensweise, um poröse Polyethylenimplantate mit humanen Chondrozyten zu „vitalisieren“. Hier werden die Zellen unmittelbar vor Implantation mit Bisbenzimid markiert und in einer Suspension mit plättchenreichem Plasma (PRP) auf die Implantate aufgebracht. Direkt nach der Implantation erfolgt eine mikroskopische Kontrolle (Ehrmantraut, Naumann et al. 2012). Bei Anwendung dieser Methodik wäre zwar eine Quantifizierung der erfolgreich ins Wirtsgewebe eingebrachten Zellen mittels konfokaler Mikroskopie möglich gewesen, es hätte allerdings unklar bleiben müssen, ob die Zellen am Trägermaterial adhären waren und somit tatsächlich am Bestimmungsort wirksam werden können.

Die kontinuierliche mikroskopische Beobachtung bietet sich insbesondere aufgrund der morphologischen Eigenschaften der Fibroblasten an. Mit einer Größe von bis zu 50 µm sind sie lichtmikroskopisch sichtbar und aufgrund ihrer typischen Spindelform leicht zu identifizieren. Es bestehen gewisse Formunterschiede zwischen aktiven und inaktiven Fibroblasten, die primär auf die jeweilige Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum zurückzuführen sind (Eyden 2004). Die auf dem porösen Polyethylen selbst angewachsenen Zellen ließen sich rein lichtmikroskopisch nur schwer vom Implantatmaterial abgrenzen, dank

der GFP-Transfektion war jedoch eine Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop problemlos möglich.

Bei Voruntersuchungen ließ sich feststellen, dass die Zelldichte auf den porösen Polyethylenimplantaten unter regelmäßigen Mediumwechseln etwa zwischen dem 12. und 14. Tag in Zellkultur ein Maximum erreichte und dann auf diesem Niveau stagnierte. Dementsprechend wurde für den Versuch eine 14-tägige Kultivierung im Medium vor Implantation festgelegt. Die Beobachtungen decken sich mit vorhergehenden Studien zum Wachstum von Fibroblasten auf porösem Polyethylen. Hier wird eine Proliferation bis Tag 13 beschrieben, gefolgt von einer Plateau-Phase bis ca. Tag 22 (Edwards, Church et al. 2011).

Von essentieller Bedeutung für den gewählten Ansatz war die Adhärenz der Zellen auf dem porösen Träger-Material. Während die mikroskopischen Beobachtungen in dieser Studie eine erfolgreiche Kultivierung bestätigten, sind Ansätze beschrieben, um die Adhärenz der Zellen durch Vorbehandlungen des Trägermaterials noch zu verbessern. So ist ein *Pre-Coating*, bei dem poröses Polyethylen vor dem Zellkontakt mit Fibronectin beschichtet wird, möglich. Dies führt bei bestimmten Zellgruppen, wie z.B. menschlichen Nabelschnurvenenendothelzellen, zu einem verbesserten Anwachsen – bei Fibroblasten ist jedoch kein signifikanter Unterschied erkennbar (Campillo-Fernandez, Unger et al. 2009).

Der Einfluss der Porengröße des Trägermaterials auf die Wachstumseigenschaften der Fibroblasten war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Porengröße von 100 – 200 μm des hier verwendeten Materials ist relativ groß, beträgt doch die Größe eines Fibroblasten trotz der charakteristischen Zellausläufer in der Regel nicht mehr als 50 μm . Pilotversuche an mit Vertiefungen - sogenannten *Pits* - verschiedener Größe versehenen Platten zeigen jedoch, dass Unebenheiten am Trägermaterial kein grundsätzliches Hindernis für das Wachstum und die Adhärenz von Fibroblasten darstellen - im Gegenteil, ab einer Vertiefungsgröße von 25 μm wachsen die Zellen in diese Nischen ein und teilen sich sogar darin (Berry, Campbell et al. 2004). Weiterführende Untersuchungen an porösem Material zeigen, dass Fibroblasten sogar in der Lage sind, Poren bis zu einer Größe von ca. 200 μm zu überbrücken (Sun, Norton et al. 2007). Dies entspricht der maximalen Porengröße des hier verwendeten Implantatmaterials. Salem et al. beschreiben den Prozess, wie Fibroblasten Poren überbrücken, deren Durchmesser den der Zellen selbst übersteigt: Hierbei nutzen konfluente Fibroblasten Nachbarzellen als Unterstützung und spannen eine Art Segel über die Pore, selbst große Poren sind so oft schon nach 72 Stunden in Zellkultur überbrückbar (Salem, Stevens et al. 2002).

Unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse sowie der eigenen mikroskopischen Beobachtungen in der Zellkultur erschien es sinnvoll, die porösen Polyethylen-Blöcke 14 Tage lang und unter regelmäßigen Mediumwechseln, aber ohne weitere Wachstumsimulation, mit Fibroblasten zu kultivieren.

1.2. Zellzahlanalyse mittels konfokaler Mikroskopie und digitaler Bildanalyse

Nach 14-tägiger Kultivierung im Medium wurden die auf den porösen Polyethylenimplantaten angewachsenen Zellen zunächst konfokalmikroskopisch abgebildet und anschließend mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. Berechnet wurde der mit Fibroblasten bedeckte prozentuale Anteil der Implantat-Gesamtoberfläche.

Während der Kultivierung der Fibroblasten in der Zellkultur war die Beobachtung licht- und fluoreszenzmikroskopisch erfolgt, um Veränderungen der Zelldichte auf den porösen Polyethylenblöcken zu erkennen. Aufgrund der Beschaffenheit des Implantatmaterials war die rein lichtmikroskopische Auflösung für eine exakte Quantifizierung *in vitro* zu ungenau, da die fluoreszierenden Zellen nicht in einer Ebene wuchsen, sondern auch in die Tiefe der Poren des Materials hineingelangten. Bei der reinen Lichtmikroskopie wird ein größeres Beobachtungsfeld illuminiert, in dem Zellen in verschiedenen Tiefen angeregt werden – somit werden Floreszenzen aus mehreren Ebenen abgebildet und optische Unschärfen erzeugt. Die konfokale Mikroskopie hingegen hat gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie den entscheidenden Vorteil einer großen Tiefenschärfe, man verfügt also über eine deutlich höhere Auflösung entlang der optischen Achse. Die konfokale Mikroskopie eignet sich in Sonderheit zur Darstellung dickerer Proben, da Schichtaufnahmen in höchster Auflösung bis zu einer Tiefe von 200 - 300 µm möglich sind (Tan, Sendemir-Urkmez et al. 2004; Georgakoudi, Rice et al. 2008). Deshalb eignete sich diese Methode ideal für die Aufnahmen des hier verwendeten 250 µm dicken porösen Polyethylens. In der Literatur findet sich noch das Verfahren der optischen Kohärenztomographie (*Optical Coherence Tomography, OCT*) (Tan, Sendemir-Urkmez et al. 2004; Liang, Graf et al. 2009), das eine Darstellung noch tieferer Ebenen ermöglicht, aufgrund der Auflösung der konfokalen Mikroskopie allerdings deutlich unterlegen ist.

Bei den hier durchgeführten konfokalmikroskopischen Aufnahmen hätte das Kulturmedium aufgrund seiner rötlichen Färbung zu einem Störeffekt durch Reflexion oder Streuung führen können, daher wurden die Implantate vorher mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline, PBS*) gewaschen und für die Dauer der Aufnahmen in dieser belassen.

Angesichts der relativ kurzen Dauer von maximal 30 Minuten, während der die Implantate nicht mit Nährmedium versorgt waren, war nicht von einem nachteiligen Effekt für die Zellen auszugehen. Studien von Stroikin et al. zeigen, dass in Fibroblastenzellkulturen die aus dem Nährmedium entfernt und in PBS inkubiert wurden erst nach 48 bis 72 Stunden eine signifikante Zunahme an Zellnekrosen zu beobachten war (Stroikin, Johansson et al. 2007).

Bei jeder Lichtexposition von Fluorophoren stellt sich grundsätzlich die Frage nach potentiell phototoxischen Effekten des Lasers auf die GFP-transfizierten Zellen. Bei Zellen, die solcher Lichtenergie ausgesetzt sind, wird von Ausbleicheffekten (*Photobleaching*) bei GFP-transfizierten Zellen (Caarls, Rieger et al. 2011), oder gar Strukturstörungen (*Photounbinding*) bei mit GFP-Antikörpern markierten Proben (Heinze, Costantino et al. 2009) berichtet. Parameter, welche das Ausmaß des phototoxischen Effekts beeinflussen, sind dabei vor allem die Lichtintensität und die Expositionszeit. Bei den hier durchgeführten Aufnahmen konnten zwar phototoxische Effekte nicht ausgeschlossen werden, die Implantate wurden jedoch nur zweimal quantifiziert, einmal vor Implantation und zehn Tage später nach Explantation aus der Rückenhautkammer. Die Beleuchtungszeit lag dabei im Bereich von Sekunden, während Bleaching-Effekte nach Expositionen von Minuten bis Stunden auftreten (Caarls, Rieger et al. 2011). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die konfokalmikroskopische Analyse unwesentlich durch photoxische Effekte beeinflußt war (Tan, Sendemir-Urkmez et al. 2004).

Die Quantifizierung der Fibroblasten auf den Implantaten erfolgte *in vitro* vor Implantation in die Rückenhautkammer, sowie *ex vivo* nach Desintegration bei Versuchsende an Tag 10. Die zur Auswertung der zweidimensionalen Maximumsprojektionen verwendete Software KS 400 ist als Programm zur mikroskopischen Bildanalyse etabliert und kann schon zur objektiven Quantifizierung geringer farblicher Abweichungen eingesetzt werden (Thiel and Blaut 2005; Vertemati, Vizzotto et al. 2008). In Fall dieser Studie ließen sich die grün dargestellten Zellen vor dunklem Hintergrund durch das Programm problemlos identifizieren und anschließend deren Fläche im Verhältnis zur Gesamtgröße des analysierten Abschnitts in Prozent ausdrücken.

1.3. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

In der durchgeführten Studie sollte die Integrationsfähigkeit von „vitalisiertem“ porösen Polyethylen im Wirtsgewebe analysiert werden; in der Kontrollgruppe wurden unbeschichtete poröse Polyethylenimplantate transplantiert. Die Polyethylenblöcke der Versuchsgruppe

waren vor Implantation mit Fibroblasten kultiviert und überwachsen. Biomaterialien mit isolierten körpereigenen Zellen zu kultivieren und damit zu „vitalisieren“, gilt neben der direkten Applikation von modifizierten Zellen, sowie der Gabe von gewebemodifizierenden Substanzen, als einer der drei meistverwendeten methodischen Ansätze zur Realisation des *Tissue Engineering* (Langer and Vacanti 1993) und stellt hohe Anforderungen an das experimentelle System, um den funktionellen Erfolg valide beurteilen zu können. Vor allem ist ein Modell gefragt, mit welchem die Dynamik von Angiogeneseprozessen über einen längeren Zeitraum wiederholt analysiert werden kann. Als Parameter für eine erfolgreiche Integration von Fremdmaterial gilt nämlich neben potentiell ablaufenden Entzündungsprozessen insbesondere eine schnelle vaskuläre Integration ins Wirtsgewebe (Laschke, Haufel et al. 2005).

Für wiederholte Analysen über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen kommt der *Chorioallantoic Membrane (CAM)-Assay* in Frage (Laschke, Harder et al. 2006). Hierbei wird die Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos, die als Gasaustauschfläche dient, als Wirtsgewebe verwendet. Ungefähr 2 Wochen kann eine solche Membran zur Analyse angiogenetischer Vorgänge an implantiertem Gewebe genutzt werden, da während dieser Periode ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk in ihr entsteht, welches das jeweilige Fremdmaterial miteinbezieht (Laschke, Harder et al. 2006). Während das Modell anfangs nur für die Implantation von Zellen oder die Analyse von Effekten pro- bzw. antiangiogenetischer Substanzen genutzt wurde, berichten Borges et al. von einem Zylindermodell mit der auch eine Beobachtung dreidimensionaler Strukturen, beispielsweise von Fibrinkonstrukten zum *Tissue Engineering* möglich ist (Borges, Tegtmeier et al. 2003). Trotz dieser Weiterentwicklung weist der *CAM Assay* einige Limitationen in Bezug auf die hier zu behandelnden Fragestellungen auf. Zum einen ist die Applikation von Fluoreszenzmarkern zur Darstellung von Gefäßen und Gefäßaussprossungen technisch nahezu nicht durchführbar und eine native Darstellung von Gefäßen mit einem Durchmesser unter 10 µm ist so kaum möglich (Laschke, Harder et al. 2006). Gerade die Beobachtung von kleinsten Gefäßneubildungen stand jedoch bei dieser Studie im Vordergrund, da die Dynamik des Angiogeneseprozesses im zeitlichen Verlauf untersucht werden sollte. Ein weiterer Faktor, der bei der Analyse im *CAM Assay* nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Tatsache, dass sich die beobachteten Vorgänge in embryonalem Gewebe abspielen, in welchem sich die Konzentrationen von Wachstumsfaktoren deutlich von denen in adultem Gewebe unterscheiden. Von entscheidendem Nachteil ist letztendlich die mangelnde

Immunkompetenz im embryonalen Gewebe – somit sind Aussagen über die Biokompatibilität von Fremdmaterialien kaum möglich (Laschke, Harder et al. 2006).

Das in dieser Studie verwendete Modell der transparenten Rückenhautkammer wies all diese Probleme nicht auf und erschien daher für die vorliegende Studie optimal geeignet. Schon 1924 wurde erstmals der Ansatz einer *in vivo* Beobachtung von Prozessen im Gewebe durch ein transparentes Fenster beschrieben, damals am Hasenohr (Sandison 1924). Algire beschrieb erstmals die Nutzung der Technik an der Rückenhaut von Mäusen (Algire 1943), inzwischen ist die Rückenhautkammer auch für Beobachtungen an Ratten (Papenfuss, Gross et al. 1979) und Hamstern (Endrich, Asaishi et al. 1980) etabliert. Besonderes Merkmal der Methode ist die Möglichkeit, das Gewebe in der Kammer über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen wiederholt und ohne jegliche Anwendung von Anästhetika intravitalmikroskopisch zu untersuchen (Messmer and Krombach 1998). Das lange Beobachtungsfenster ermöglicht eine zeitversetzte Implantation von Zellen oder Fremdmaterialien in die Kammer nach der Operation, so dass durch die chirurgische Präparation induzierte inflammatorische Reaktionen abgeklungen sind und die eigentlichen Untersuchungsparameter nicht beeinflusst werden. In dieser Studie wurden die Implantate 48 Stunden nach Präparation eingesetzt. Speziell für die hier durchgeführten Messungen der Gefäßdurchmesser ist zudem die fehlende Notwendigkeit einer Narkose während der Aufnahmen von entscheidendem Vorteil, da bei Verabreichung von Anästhetika mikrozirkulatorisch relevante Nebenwirkungen beschrieben sind (Colantuoni, Bertuglia et al. 1984).

Die verwendeten Kammern aus Titan zeichnen sich durch ihr geringes Gewicht und eine geringere Belastung der ca. 30 g schweren Versuchstiere aus. Titan gilt zudem als äußerst stabil und weitgehend inert, damit ist es Vorgängermodellen aus teflonbeschichtetem Aluminium überlegen (Menger, Laschke et al. 2002). Aufgrund der leichten Zugänglichkeit des Beobachtungsareals können neben dreidimensionalen Fremdmaterialien wie porösen Polyethylenimplantaten (Strieth, Weger et al. 2010), wie sie auch in diesem Versuch untersucht wurden, auch verschiedene allogene und syngene Gewebe- und Zelltypen implantiert werden. Beschrieben sind unter anderem entsprechende Experimente mit Tumorzellen (Leunig, Yuan et al. 1992; Eichhorn, Luedemann et al. 2007), Ovarialfollikeln (Vollmar, Laschke et al. 2001) und Nebenschilddrüsengewebe (Strieth, von Johnston et al. 2005).

1.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Videoanalyse

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist der Goldstandard zur Untersuchung von angiogenetischen Mechanismen bei der frühen Implantatintegration *in vivo* (Menger, Laschke et al. 2002; Laschke, Vollmar et al. 2011; Ehrmantraut, Naumann et al. 2012). Hier lassen sich ablaufende Entzündungsprozesse und Gefäßaussprossungen im Rahmen von Angiogeneseprozessen bei der Integration von Fremdmaterialien suffizient untersuchen (Menger and Lehr 1993). Bei Untersuchungen von Biomaterialien zum *Tissue Engineering*, bei denen die Erfassung kleinster Unterschiede im zeitlichen Verlauf entscheidend ist, hat sich die Methode als besonders geeignet erwiesen (Laschke, Vollmar et al. 2011). Im Laufe der Jahre wurde das Einsatzspektrum laufend erweitert, beschrieben sind inzwischen Untersuchungen an Cortexgefäß (Rovainen, Woolsey et al. 1993), der Mikrozirkulation der Leber (Menger, Marzi et al. 1991), der Lunge (Kuhnle, Leipfinger et al. 1993) oder des Rückenmarks (Ishikawa, Sekizuka et al. 1999).

Erste Ansätze der intravitalen Mikroskopie zur Analyse der Leukozytenpassage wurden schon 1846 von Waller beschrieben (Waller 1846); seit Einführung der transparenten Rückenhautkammer ist eine kontinuierliche Beobachtung eines definierter Areals auch über einen längeren Zeitraum an nicht narkotisierten Tieren möglich geworden. Heutige Mikroskopietechniken erlauben eine bis zu 1000-fache mikroskopische Vergrößerung bei der Untersuchung und die Verwendung von digitaler Bildanalyse zur detaillierten Auswertung (Vajkoczy, Ullrich et al. 2000). Es sind außerdem vergleichbare Aufnahmen an mehreren Untersuchungszeitpunkten möglich. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass in den Kammerpräparationen weitgehend physiologische Bedingungen im Implantatbett herrschen (Menger, Laschke et al. 2002). Im Gegensatz dazu kann es bei der histologischen Analyse von fixierten Gefäß je nach Fixierungsmethode zu Messschwankungen beim Gefäßdurchmesser um bis zu 25 % kommen (Siegel, Swan et al. 1985; Dobrin 1996; Choy, Mathieu-Costello et al. 2005), was zuverlässige Aussagen, speziell zu geringgradigen Veränderungen im Rahmen von Angiogeneseprozessen erschwert.

Ein Meilenstein der intravitalen Mikroskopie war die Einführung von fluoreszierenden Plasma- und Zellmarkern. Unter dem Einsatz von Fluoreszenzillumination wurde die morphologische Darstellbarkeit von Gefäß erweitert – es lassen sich schon Gefäße von einem Durchmesser von 3 – 5 μm darstellen, wohingegen Gefäße unter 10 μm in nativer Darstellung nur schwer identifizierbar sind (Laschke, Harder et al. 2006). Zudem können hiermit mikrohämodynamische Vorgänge visualisiert werden, wie die in diesem Versuch gemessenen Parameter der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der funktionellen

Gefäßdichte, deren Entwicklung im zeitlichen Verlauf wichtig bei der Beurteilung des Erfolgs der mikrozirkulatorischen Integration des Biomaterials ist. Ebenfalls im Rahmen von Untersuchungen zum *Tissue Engineering* sind Ansätze beschrieben, bei denen das Fremdmaterial vor Implantation in einem anderen Wirtstier vaskularisiert wird (Lokmic, Stillaert et al. 2007; Laschke, Rucker et al. 2008). Hierdurch soll die mikrovaskuläre Integration begünstigt werden, indem die schon bestehenden Gefäßnetzwerke schneller Anschluss an das präformierte Gefäßsystem finden. Dieser Prozess wird als Inoskulation bezeichnet (Laschke, Vollmar et al. 2009). Hier erlauben die fluoreszierenden Marker den zuverlässigen Nachweis, ob und in welchem Ausmaß die präformierten Gefäße nach Implantation durchblutet werden. Die Markierung von Zellen erlaubt des Weiteren die Visualisierung von Zell-Zell- und Zell-Endothelzellinteraktionen (Vajkoczy, Ullrich et al. 2000). Insbesondere im Fall von Leukozyten gestaltet sich die Beobachtung ohne Fluoreszenz aufgrund der geringen Abgrenzbarkeit vom Plasma schwierig und wird durch den Einsatz von Markern erst möglich (Schmidt, MacDonald et al. 1990).

Durch die Illumination mit hochenergetischem Licht können jedoch bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse phototoxische Reaktionen auftreten. In Bezug auf die Mikrozirkulation stellen Thrombozytenaktivierung und Thromboseneigung, Endothelzellschädigungen oder Vasospasmen bei Arteriolen mögliche Auswirkungen dar. Das Ausmaß dieser Effekte hängt aber wiederum entscheidend von den zwei Faktoren Lichtintensität und Bestrahlungsdauer ab (Steinbauer, Harris et al. 2000). So beschreiben Steinbauer et al. Versuche mit FITC-Dextran markiertem Plasma und Rhodamin 6G-markierten Leukozyten, bei denen nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten die genannten Folgen auftreten (Saetzler, Jallo et al. 1997; Steinbauer, Harris et al. 2000). Eine geringfügig erhöhte Zahl rollender Leukozyten wird bei 4 x 30 Sekunden Bestrahlung mit hohen Lichtintensitäten beobachtet (Saetzler, Jallo et al. 1997). Angesichts der hier verwendeten Lichtintensitäten und einer Expositionsdauer von bis zu 300 Sekunden waren jedoch in den hier beschriebenen Experimenten keine derartigen phototoxischen Effekte (Steinbauer, Harris et al. 2000; Harris, Sinitzina et al. 2002) zu erwarten.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. „Vitalisierung“ von porösen Polyethylenimplantaten durch Fibroblasten

Die Maskierung von Fremdmaterialen mit autologen Zellen zur Verbesserung der Integration in das Wirtsgewebe ist eine etablierte Methode beim *Tissue Engineering* (Griffith and

Naughton 2002). In diesem Sinne wurden in dieser Studie Fibroblasten auf porösen Polyethylenblöcken vor Implantation mit kultiviert. Die auf dem porösen Polyethylen angewachsenen vitalen Zellen wurden sowohl vor Implantation, als auch nach Explantation quantifiziert und ihre Aktivität im Gewebe auch anhand der Expression von MMP-2 und -9 kontrolliert.

Vor Implantation zeigte sich, dass nach 14-tägiger Kultivierung ca. 20 % der Implantat-Gesamtfläche mit Zellen bedeckt war. Die hier durchgeführte Quantifizierung vitaler Fibroblasten anhand eines positiven Fluoreszenzsignals nach GFP-Transfektion ist eine etablierte Methode (Liu, Fan et al. 2008). Höhere Zelldichten auf anderen Materialien sind in Studien beschrieben, bei denen resorbierbare Materialien wie dreidimensionale Kollagen-Matrizes untersucht wurden, welche im Gegensatz zu synthetischen Materialien wie porösem Polyethylen aufgrund ihrer höheren Hydrophilität eine bessere Zelladhärenz ermöglichen. Hier sind Werte von ca. 30 % Oberflächenbedeckung nach 7-tägiger Kultivierung reproduzierbar (Pu, Rhodes et al. 2010). Gleichzeitig ist bei diesen Materialien jedoch die langfristige Stabilität *in vivo* deutlich geringer, somit stellen sie keinen gleichwertigen Ersatz bei klassischen Einsatzgebieten von porösem Polyethylen, wie beispielsweise dem Ausgleich von Knochendefekten dar. Neben der Trägersubstanz hat auch die Wahl der kokultivierten Zellen einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der „Vitalisierung“ synthetischer Biomaterialien. Auch innerhalb der Gruppe der Fibroblasten sind Unterschiede hinsichtlich Zellproliferation und Produktivität beschrieben: Dermale Fibroblasten, wie in diesem Versuch verwendet, eignen sich beispielsweise deutlich besser für die Kultivierung auf Fremdmaterialien als solche aus Kreuzbandgewebe (Van Eijk, Saris et al. 2004; Liu, Fan et al. 2008).

Während die Kultivierung der Fibroblasten auf den Implantaten in Nährmedium erfolgte, in dem die Versorgung der Zellen zu jeder Zeit gewährleistet war, stellte sich die Frage, ob die Zellen nach Implantation in die Rückenhautkammer *in vivo* vital blieben. Der nach Explantation ermittelte Wert von 13,8 % bedeckter Implantatoberfläche deutet zwar auf einen geringgradigen Zellverlust während der zehntägigen Versuchsphase, dennoch war der Großteil der implantierten Zellen noch vital. Die Zellüberlebensraten sind vergleichbar mit den Befunden aus anderen Studien, bei denen das Überleben von auf Implantaten kultivierten Fibroblasten *in vivo* untersucht wurde (Bellincampi, Closkey et al. 1998). Insbesondere bei Materialien mit dreidimensionaler Struktur ist ein gewisser Verlust vitaler Zellen durch die initial erschwerte Versorgung von in der Tiefe liegenden Zellen zu vermuten, bis

Angiogeneseprozesse eingesetzt haben. Die Vaskularisierung des Wirtsgewebes spielt hier eine wichtige Rolle – so sind beispielsweise bei Implantationen in relativ avaskuläres Gewebe im Gelenk deutlich schlechtere Zellüberlebensraten zu erwarten als im Subkutangewebe (Bellincampi, Closkey et al. 1998). Der Hautmuskel, der in der vorliegenden Studie als Implantatbett diente, ist gut vaskularisiert.

Andere Studien, bei denen poröses Polyethylen mit humanen Chondrozyten „vitalisiert“ und in dorsale Rückenhautkammern von Mäusen implantiert wurde, zeigen ebenfalls ein Überleben vitaler Zellen; eine genaue Quantifizierung wurde hier nicht durchgeführt, allerdings konnte nach Explantation histologisch eine Schicht humaner Chondrozyten auf dem Implantat nachgewiesen werden (Ehrmantraut, Naumann et al. 2012). Die Implantation erfolgte hier gemeinsam mit plättchenreichem Plasma (PRP), das eine große Zahl verschiedener Wachstumsfaktoren enthält (Eppley, Woodell et al. 2004), und möglicherweise zu einem Überleben der implantierten Zellen beiträgt.

In dieser Studie wurde die abschließende Untersuchung am zehnten Tag nach Implantation durchgeführt, darüber hinaus sind keine Aussagen zur Überlebensdauer und das Proliferationsverhalten der Zellen möglich. Kawaja et al. zeigen jedoch, dass bei dermalen Fibroblasten im weiteren zeitlichen Verlauf relativ geringe Veränderungen bei den Zellpopulationen nach Implantation zu beobachten sind und insbesondere keine Tumore entstehen (Kawaja, Fagan et al. 1991).

Neben der mikroskopischen Analyse wurden nach Explantation sowohl in den Implantaten, als auch im unmittelbar angrenzenden Bindegewebe mittels PCR die Konzentrationen der MMP-2 und -9 untersucht. MMP-2 und -9 wurden insbesondere im Implantatbett exprimiert, was zeigt, dass die Fibroblasten nicht nur vital, sondern auch funktionell aktiv waren. Die MMP-2 und MMP-9-Konzentrationen sind in den fibroblastenbeschichteten Implantaten tendenziell um 246 % bzw. 140 % erhöht. Anders als im Fall von MMP-2, welche von den eingebrachten Fibroblasten ohne zusätzlich Stimuli produziert wird, wird MMP-9 nur produziert, wenn die Fibroblasten zur Produktion angeregt werden. Zu den Initiatoren einer vermehrten Produktion von MMP-9 gehören unter anderem Entzündungsmediatoren (Van den Steen, Dubois et al. 2002), für die sich im Implantatbett der Versuchsgruppe teilweise eine tendenziell erhöhte Expression nachweisen ließ.

2.2. Mikrovaskuläre Integration von porösen Polyethylenimplantaten

Eine entscheidende Rolle bei der Integration dreidimensionaler Fremdmaterialien ins Wirtsgewebe spielt das Einwachsen von Blutgefäßen. Bei synthetischen Materialien

ermöglicht erst eine etablierte Blutversorgung ein Einwachsen von Bindegewebe und gewährleistet so die mechanische Integration. Ein Ziel des *Tissue Engineering* von Biomaterialien ist es, diesen Vorgang zu beschleunigen, indem beispielsweise direkt die angiogenesestimulierende Faktoren, oder Zellen, die diese produzieren, gemeinsam mit dem Fremdmaterial implantiert werden. Die kultivierten Zellen in der Tiefe des dreidimensionalen Materials sind ihrerseits auch auf die rasche Etablierung einer Blutversorgung angewiesen, da die Sauerstoffdiffusionsstrecke auf ca. 150 – 200 µm begrenzt ist (Folkman and Hochberg 1973; Colton 1995). Eine zu langsame Etablierung der Mikrozirkulation gilt als ein wesentliches Problem bei der Integration von Biomaterialien (Laschke, Harder et al. 2006). Pandit et al. beschreiben einen lokalisierten Einsatz von Wachstumsfaktoren. Nach Applikation von FGF-1 auf einer resorbierbaren Fibrinmatrix in einem Ulcusmodell am Hasenohr lässt sich eine gesteigerte proangiogenetische Aktivität beobachten, zudem nimmt die Kollagenproduktion durch Fibroblasten zu (Pandit, Feldman et al. 1998). Richardson et al. führen diesen Ansatz weiter und beschreiben die Applikation von zwei Wachstumsfaktoren – VEGF und PDGF – mittels einer Polymermatrix. Hier zeigt sich ein weiter verbesserter proangiogenetischer Effekt im Vergleich zur einfachen Applikation (Richardson, Peters et al. 2001). Des Weiteren sind Versuche beschrieben, Zellen mit dem Biomaterial zu verwenden, die proangiogenetische Faktoren produzieren können. Fibroblasten sind beispielweise hierzu in der Lage. Falls vitale Zellen über einen längeren Zeitraum im Wirtsgewebe überleben, können sie kontinuierlich das Gefäßwachstum stimulieren.

Im Rahmen von Studien zur Deckung von Weichteildefekten, sind Versuche beschrieben, bei denen schon vor Implantation hochvaskularisiertes Gewebe, wie beispielsweise fragmentiertes Bauchfell, in den Wirtsorganismus eingebracht wird. Masuda et al. machen sich hierbei zudem zu Nutze, dass Adipozyten, die den größten Zellanteil des Bauchfells ausmachen, in großem Umfang VEGF produzieren. Auch drei Monate nach Implantation sind vitale, VEGF-produzierende Zellen nachweisbar. Die Ergebnisse zeigen, dass prävaskularisiertes Gewebe rascher in den Wirtsorganismus integriert wird als avaskuläres (Masuda, Furue et al. 2004). Diese Erkenntnisse können auf das das *Tissue Engineering* von Biomaterialien übertragen werden. So wird gegenwärtig diskutiert, ob die sogenannte Inoskulation eine erfolgsversprechende Möglichkeit darstellt, die Angiogenese zu beschleunigen. Hierbei werden in Biomaterialien schon vor Implantation mikrovaskuläre Netzwerke etabliert (Laschke, Vollmar et al. 2009). Dies kann beispielsweise durch Kultivierung von menschlichen Nabelschnurvenenzellen (HUVECs) *in vitro* (Koike, Fukumura et al. 2004), oder durch Generierung eines solchen Netzwerks *in situ* erreicht

werden, indem das Material an einer stark vaskularisierten Stelle des Körpers implantiert wird, bevor es an den eigentlichen Bestimmungsort übertragen wird (Laschke, Rucker et al. 2008). Aktuell stellt diese Inoskulation einen vielversprechenden Ansatz zur erfolgreichereren Implantation von Biomaterialien dar. Dieses Verfahren kann jedoch alleine auch keine suffiziente Durchblutung in der besonders kritischen Frühphase den ersten Tagen garantieren (Laschke and Menger 2012). Zur Beschleunigung der Versorgung und Erhaltung von kultivierten Zellen, gerade in der Tiefe dreidimensionaler Materialien, wie sie auch in dieser Studie zur „Vitalisierung“ des porösen Polyethylen verwendet wurden, könnte die Inoskulation jedoch möglicherweise beitragen.

Bei den in diesem Versuch auf dem Implantatmaterial kultivierten dermalen Fibroblasten sind in diversen Studien vielfältige proangiogenetische Eigenschaften *in vitro* nachgewiesen worden. Diese reichen von der Produktion von proangiogenetischen Faktoren (Hurley, Balaji et al. 2010) bis zu einer mechanischen Einflussnahme auf die Formung von Kapillarnetzwerken. Der wichtigste von Fibroblasten produzierte angiogenesestimulierende Faktor ist VEGF (Martin, Harding et al. 1999). Neben VEGF sind *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und *Angiopoietin-1* (Ang-1) als weitere von Fibroblasten produzierte angiogenetische Faktoren bekannt, die direkt auf die Endothelzellen wirken (Pinney, Liu et al. 2000; Hurley, Balaji et al. 2010). HGF stimuliert die Migration von Endothelzellen und regt diese an, sich zu kapillären Strukturen zu organisieren (Martin, Harding et al. 1999).

Während in der Frühphase des Gefäßneubildungsprozesses die Stimulation durch Wachstumsfaktoren im Vordergrund steht, spielen Fibroblasten auch im weiteren Verlauf, bei der Modellierung der neu entstandenen Kapillarnetzwerke, eine Rolle. Die Zusammensetzung und Dichte der Extrazellulärmatrix beeinflussen die Formierung der Gefäßstrukturen (Kniazeva and Putnam 2009). Fibroblasten haben durch die Produktion von Kollagen I, sowie MMP-2, welches den Extrazellulärmatrix-Umsatz reguliert, entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Extrazellulärmatrix (Hurley, Balaji et al. 2010).

In Analogie zu den Ergebnissen aus einer früheren Studie, bei der Extrazellulärmatrixkomponenten den porösen Polyethylenimplantaten beigegeben wurden, wurde auch in der hier vorliegenden Studie gezeigt, dass das Gefäßwachstum nicht weiter beschleunigt werden kann, wenn die extrazellulärmatrixproduzierenden Fibroblasten auf den Implantaten kultiviert werden (Strieth, Weger et al. 2010). Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden ebenso im zeitlichen Verlauf keine wesentlichen Veränderungen bei funktioneller Gefäßdichte, Gefäßdurchmessern, oder Erythrozytenfließgeschwindigkeiten bei den durch Fibroblasten „vitalisierten“ porösen Polyethylenimplantaten festgestellt. Diese

Ergebnisse gelten für den Untersuchungszeitraum von zehn Tagen. Auch aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass dies der relevante Zeitraum ist. So konnten Ehrmantraut et al. in dieser frühen Phase bei durch Chondrozyten in Kombination mit plättchenreichem Plasma (PRP) „vitalisierten“ porösen Polyethylenimplantaten eine Beschleunigung der mikrovaskulären Integration zeigen (Ehrmantraut, Naumann et al. 2012). Die aktivierte Plättchen im PRP produzieren eine Reihe proangionetischer Faktoren, unter anderem VEGF. Zudem werden verstärkt Wachstumsfaktoren gebildet, die sich möglicherweise positiv auf das Überleben der Chondrozyten auswirken (Eppley, Woodell et al. 2004). Eine alleinige Beschichtung mit PRP reicht jedoch nicht aus. Eine erfolgreiche Beschleunigung des Vaskularisierungsprozesses durch die Zugabe von proangiogenetischen Faktoren ohne Zellen beschreiben dagegen Laschke und Kollegen. Sie verwendeten bei ihren Versuchen *Growth factor containing Matrigel*-beschichtete PLGA-Implantate, die sich allerdings durch ein deutlich größeres Porenlumen von porösen Polyethylenimplantaten unterscheiden. *Growth factor containing Matrigel* enthält sehr hohe Konzentrationen an VEGF, aber auch andere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, IGF-1 und TGF- β (Laschke, Rucker et al. 2008). In Zusammenschau mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie, bei der die Implantate nur mit Zellen „vitalisiert“ wurden, legen diese Daten nahe, dass für eine signifikante Beschleunigung der Angiogenese hohe zusätzliche Beigaben diverser proangiogenetischer Faktoren erforderlich gewesen sein könnten. Dies hätte durch eine direkte, hochkonzentrierte Applikation derartiger Faktoren oder durch eine Kombination aus Zellen und stimulierenden Faktoren – beispielsweise in Form von PRP – gewährleistet werden können.

Die in der Versuchsgruppe, sowohl in den Implantaten selbst, als auch im umliegenden Bindegewebe, deutlich erhöhten Expressionsraten MMP-2 und MMP-9 geben einen Hinweis auf eine gewisse funktionelle Relevanz der Fibroblasten bei der mikrovaskulären Integration (Page-McCaw, Ewald et al. 2007). Der Einsatz von vitalen Zellen gewährleistet aber möglicherweise dennoch keine hinreichende kontinuierliche Sekretion von Wachstumsfaktoren, die einen messbaren proangiogenetischen Effekt gehabt hätte.

2.3. Bioverträglichkeit von „vitalisierten“ porösen Polyethylenimplantaten

Bei der Implantation von Biomaterialien werden verschiedene Reaktionen im Wirtsgewebe beobachtet. Möglich sind entzündliche Effekte mit Leukozyten-Endothelzellinteraktionen und Leukozytentransmigrationen ins Implantatbett, aber auch Fremdkörperreaktionen bis hin zur Abstoßung des Implantats (van Luyn, Khouw et al. 1998). Die Kinetik dieser

Unverträglichkeitsreaktionen ist sehr unterschiedlich und hängt stark von dem entsprechenden Biomaterial selbst ab. Verstärkte Leukozyten-Endothelzellinteraktionen werden bei *Ultrapro composite mesh* (Ethicon, Norderstedt) bereits nach ca. 24 Stunden (Laschke, Haufel et al. 2005) beobachtet, bei PLGA-Implantaten nach 6 Tagen (Rucker, Laschke et al. 2006) und bei Kalzium-Phosphat-Implantaten erst nach 10 Tagen (Rucker, Laschke et al. 2008) beobachtet. Um potentielle Effekte einer „Vitalisierung“ des Implantatmaterials mit Fibroblasten zu erfassen, wurden in dieser Studie daher die Messungen der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen zweimal, an den Tagen 5 und 10 nach Implantation, durchgeführt, sowie eine Zytokinanalyse direkt nach Explantation an Tag 10. Dermale Fibroblasten werden beim *Tissue Engineering* häufig verwendet und es wird ihnen ein immunmodulatorisches Potential zugeschrieben (Haniffa, Wang et al. 2007). Daher stellte sich die Frage, ob und in welcher Hinsicht die Zellen *in vivo* die immunologische Reaktion des Wirtsorganismus auf ein Biomaterial wie poröses Polyethylen beeinflussen.

In Bezug auf die **Leukozyten-Endothelzellinteraktionen** innerhalb der Implantate und in deren direkter Umgebung kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen „vitalisierten“ und nativen Implantaten. Dies entspricht Beobachtungen bei chondrozytentragenden porösen Polyethylenimplantaten, bei denen humane Zellen in Kombination mit PRP im Mausmodell verwendet wurden (Ehrmantraut, Naumann et al. 2012). In der hier durchgeführten Studie wurden allogene murine Zellen verwendet, somit ist eher von einem vergleichsweise geringeren Abstoßungspotential auszugehen. Ehrmantraut et al. zeigen anhand von histologischen Untersuchungen, dass die Chondrozyten auf den „vitalisierten“ Implantaten eine bioprotektiven Schicht bilden und möglicherweise langfristig einen positiven Effekt auf die Fremdkörperreaktion des Wirtsgewebes haben könnten, auch wenn keine Unterschiede hinsichtlich der initialen Leukozyten-Endothelzellinteraktionen messbar waren.

In einer früheren Studie, in der poröse Polyethylenimplantate mit Extrazellulärmatrix (ECM)-Komponenten und dem Wachstumsfaktor VEGF implantiert wurden, konnte eine signifikant reduzierte Leukozytenadhärenz gezeigt werden (Strieth, Weger et al. 2010). Eine lokal deutlich erhöhte VEGF-Konzentration wirkt möglicherweise als *survival factor* für neu gebildete Gefäße. Ohne die erhöhte VEGF-Konzentration kann ein Teil der neu entstandenen Gefäße wieder degenerieren, was wiederum die Leukozyten-Endothelzellinteraktion stimulieren könnte (Benjamin, Hemo et al. 1998). Dermale Fibroblasten können zwar eigenständig VEGF produzieren (Pu, Rhodes et al. 2010), dennoch hatte die Verwendung

fibroblastenbewachsener Biomaterialimplantate in dieser Studie keine funktionell relevanten Vorteile in Bezug auf eine Beeinflussung der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten.

Die Analyse der **immunmodulatorischen Zytokine** erlaubt begrenzte Rückschlüsse hinsichtlich der Immunantwort auf die „vitalisierten“ Implantate im Gewebe. Obwohl die gemessenen Expressionsraten stark variierten und keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden, zeigten sich einige Tendenzen hinsichtlich der Kinetik des Integrationsprozesses. Die gemeinsam mit den Zytokinen gemessenen, tendenziell erhöhten Expressionsraten der von Fibroblasten produzierten MMP-2 und MMP-9 in der Versuchsgruppe sprechen dafür, dass die eingebrachten Zellen eine gewisse funktionelle Relevanz haben könnten, auf welche die festgestellten Tendenzen bei den immunmodulatorischen Zytokinen möglicherweise zurückzuführen sind.

Im Einzelnen waren die Expressionsraten von IL-2 und IL-17 im „vitalisierten“ Implantatmaterial und im umliegenden Bindegewebe der Versuchsgruppe tendenziell erhöht. Bei IL-10 zeigte sich dieser Trend interesserweise nur im Implantatmaterial, was möglicherweise auf eine spezifische Regulation lediglich der transplantierten Fibroblasten hindeuten könnte. Alle drei genannten Mediatoren werden vorrangig von T-Zellen produziert. Da IL-2 und IL-17 dem Spektrum der proinflammatorischen Zytokine zuzuordnen sind, IL-10 hingegen als entzündungshemmender Mediator gilt, ist insgesamt nicht von einem eindeutig pro- oder antiinflammatorischen Effekt der Implantatbeschichtung mit Fibroblasten auf die Immunantwort auszugehen.

Die tendenziell erhöhten Expressionsraten von IL-17 sprechen am ehesten für eine durch die „Vitalisierung“ mit Fibroblasten verlängerte lokale Entzündungsreaktion am Implantatmaterial. Die wichtigste Aufgabe des Zytokins liegt in der Verstärkung der Funktion von TNF- α (Laan, Cui et al. 1999), welches eine erhöhte Apoptoserate von am Biomaterial adhärenen Makrophagen induziert (Rodriguez, Meyerson et al. 2009) und damit die lokale Immunreaktion am Biomaterial verlängern kann (Anderson, Rodriguez et al. 2008). Möglicherweise ist dies in der Gruppe der „vitalisierten“ Implantate der Fall. Eine grundsätzliche Unverträglichkeit des Materials ist jedoch hierdurch nicht zu erwarten. Die Expressionsraten des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , welches als Marker für die initiale Bioverträglichkeit von Fremdmaterialien dient (Miller and Anderson 1988; Krause, Robertson et al. 1990), unterscheiden sich zwischen den Gruppen kaum. IL-1 β wird in der frühen Phase nach Implantation im Wirtsorganismus exprimiert, erreicht um den dritten Tag

ein Expressionsmaximum und ist bei guter Biokompatibilität nach ungefähr 1-2 Wochen nahezu nicht mehr nachweisbar (Jones, Chang et al. 2007). Bei einer signifikanten Beeinträchtigung der Biokompatibilität durch die „Vitalisierung“ mit Fibroblasten wäre eine erhöhte IL-1 β -Expression zu erwarten.

Für IL-17 ist auch eine direkte Wirkung auf Fibroblasten nachgewiesen: IL-17 stimuliert deren VEGF-Produktion (Numasaki, Fukushi et al. 2003; Numasaki, Lotze et al. 2004). Die Stimulation hatte in diesem Fall jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Angiogeneseprozesse.

IL-2 ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Wirkmechanismus stark dosisabhängig ist (Li, Demirci et al. 2001; Cheng, Ohlen et al. 2002). Der Mediator hält die Aktivierung von T-Zellen, speziell CD8+ T-Zellen, nach Induktion durch ein Antigen aufrecht (Rodriguez, Meyerson et al. 2009). In der Versuchsgruppe wirken die Fibroblasten auf dem implantierten Biomaterial möglicherweise als zusätzlicher Stimulus für die Expression von IL-2. Da das autokrine Zytokin zum Großteil von seinen Zielzellen selbst sezerniert wird (Malek 2008), spricht die verstärkte Expression in erster Linie für eine lokale gesteigerte proinflammatorische T-Zell-Aktivität in der Gruppe der „vitalisierten“ Polyethylenimplantate. Auch die Expressionsraten für IL-10 sind in der Versuchsgruppe erhöht. Da das Zytokin ebenfalls von immunmodulatorischen T-Zellen sezerniert wird, sprechen die Messwerte möglicherweise gleichfalls für eine verstärkte Stimulation lokaler T-Zellen durch die „Vitalisierung“ des Biomaterials. Anders als IL-2 wirkt IL-10 jedoch als potenter Inhibitor des proinflammatorischen Schlüsselmediators IFN- γ (Opal and DePalo 2000) und hemmend auf eine Vielzahl anderer proinflammatorischer Zytokine. Somit schützt es den Wirtsorganismus als antiinflammatorischer Mediator möglicherweise vor einer überschießenden Immunreaktion auf das „vitalisierte“ Implantatmaterial (Higgins, Basaraba et al. 2009).

Zusammengekommen sprechen die ermittelten Tendenzen bei der Analyse immunmodulatorischer Zytokine für eine verstärkte T-Zell-Stimulation durch die „Vitalisierung“ der porösen Polyethylenimplantate mit Fibroblasten - eine klar pro- oder antiinflammatorische Tendenz ist jedoch nicht festzustellen. Da die Tendenzen vorrangig im Implantatmaterial nachweisbar sind, ist von lokal am Biomaterial ablaufenden Prozessen auszugehen. Ob diese T-Zell-Stimulation aber tatsächlich zu funktionell relevanten Effekten bei der Implantatintegration führt, müssen weitergehende Untersuchungen zeigen.

2.4. Mechanische Integration der porösen Polyethylenimplantate

Um den Einfluss des *Tissue Engineering* auf die mechanische Integration der porösen Polyethylenimplantate zu untersuchen, wurde am zwölften postoperativen Tag die dynamische Desintegrationskraft gemessen. Dieser funktionelle Parameter zur Analyse der Integration von Fremdmaterialien wird eher selten gemessen (Menger, Hammersen et al. 1992; Laschke, Haufel et al. 2005). Es zeigte sich in der hier durchgeführten Studie, dass die Implantate sowohl in der Versuchs-, als auch in der Kontrollgruppe nach 12 Tagen bereits gut im Wirtsgewebe verankert waren. Allerdings ließ sich auch hier kein Vorteil durch die Verwendung „vitalisierten“ poröser Polyethylenimplantate feststellen.

V. Zusammenfassung

Poröses Polyethylen kommt seit vielen Jahren bei rekonstruktiven Operationen im Kopf-Hals-Bereich zum Einsatz. Das Material weist zwar geringe Komplikationsraten auf, in einigen Fällen kann es jedoch zu Unverträglichkeitsreaktionen kommen. In Vorstudien wurde gezeigt, dass die Kombination von porösem Polyethylen mit Extrazellulärmatrix (ECM)-Komponenten und *Vascular Endothelial Growth Factor* zu einer signifikant reduzierten initialen Entzündungsreaktion führen kann. Eine „Vitalisierung“ mit dermalen Fibroblasten kann die Biokompatibilität des Implantatmaterials möglicherweise beeinflussen, da die Zellen in der Lage sind, kontinuierlich ECM, proangiogenetische Faktoren, sowie diverse Zytokine zu sezernieren. In dieser Studie wurden poröse Polyethylenimplantate *in vitro* mit allogenem, dermalen Fibroblasten „vitalisiert“ und die Auswirkungen auf die Integration *in vivo* untersucht.

Für die Untersuchung wurden $3 \times 3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ große Polyethylenimplantate *in vitro* ca. 14 Tage lang mit zuvor GFP-transfizierten Fibroblasten kultiviert. Mittels konfokaler Mikroskopie und anschließender digitaler Bildanalyse wurden die auf den Implantaten angewachsenen Zellen quantifiziert. Hierauf erfolgte die Implantation in zuvor präparierte Rückenhautkammern von C57/Bl6 Mäusen. Als Kontrollgruppe dienten Kammern mit unbewachsenen porösen Polyethylenimplantaten. An Tag 5 und Tag 10 nach Implantation wurden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie Parameter der Angiogenese – funktionelle Gefäßdichte, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser – gemessen, sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion untersucht. An Tag 10 wurde als Parameter für die mechanische Integration der Implantate die dynamische Desintegrationskraft quantifiziert. Die „vitalisierten“ Implantate wurden danach noch einmal konfokalmikroskopisch untersucht, um die Anzahl vitaler, GFP-markierter Fibroblasten zu bestimmen. Abschließend erfolgte an Proben aus beiden Gruppen eine rtPCR-Analyse der Expressionsraten von MMP-2 und -9, die von Fibroblasten exprimiert werden können, und folgender immunmodulatorischer Zytokine: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17.

Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche „Vitalisierung“ von porösen Polyethylenimplantaten mit dermalen Fibroblasten *in vitro* und ergaben, dass ein Großteil der Zellen auch 10 Tage nach Implantation *in vivo* noch vital und funktionell aktiv war. Die Vaskularisierung der Implantate ließ sich hierdurch über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen hinweg nicht verbessern. Auch die Quantifizierung der mechanischen Integration ins Wirtsgewebe zeigte

keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Hinsichtlich der initialen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen ließen sich ebenfalls keine wesentlichen Vorteile bei der Verwendung von fibroblastenbewachsenen Implantaten nachweisen. Aus der PCR-Analyse verschiedener Botenstoffe im Implantatgewebe ergaben sich Hinweise darauf, dass die vitalen Fibroblasten eine gewisse funktionelle Bedeutung haben könnten. So zeigte sich als Anzeichen der Fibroblastenaktivität eine tendenziell erhöhte Expression von MMP-2 und -9. Gleichzeitig waren einzelne pro- (IL-2, IL-17) und antiinflammatorische Zytokine (IL-10) im Implantatgewebe der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Messwerte weisen möglicherweise auf eine verstärkte, lokale T-Zell-Stimulation durch die „Vitalisierung“ des Biomaterials mit Fibroblasten hin, es ist allerdings kein eindeutig pro- oder antiinflammatorischer Effekt festzustellen.

Zusammenfassend zeigt die durchgeführte Studie, dass eine „Vitalisierung“ von porösen Polyethylenimplantaten mit dermalen Fibroblasten möglich ist. Nichtsdestotrotz ließ sich bei Verwendung fibroblastenbewachsener „vitalisierter“ poröser Polyethylenimplantate kein signifikanter Vorteil im Vergleich zur Verwendung unbeschichteter Implantate erzielen – weder in Bezug auf die mikrovaskuläre und mechanische Integration, noch auf die initiale entzündliche Reaktion im Implantatbett. Es erscheint deshalb für eine weitere funktionelle Verbesserung dieses Biomaterials durch *Tissue Engineering* eine Beschichtung mit Extrazellulärmatrixkomponenten vielversprechender im Hinblick auf erste patientenorientierte Studien zu sein.

VI. Literaturverzeichnis

- Ahsan, T. and R. M. Nerem (2005). "Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry." Orthod Craniofac Res **8**(3): 134-140.
- Algire, G. H. (1943). "An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse." J Natl Cancer Inst **4**(1).
- Anderson, J. M. (1988). "Inflammatory response to implants." ASAIO Trans **34**(2): 101-107.
- Anderson, J. M., A. Rodriguez, et al. (2008). "Foreign body reaction to biomaterials." Semin Immunol **20**(2): 86-100.
- Asaishi, K., B. Endrich, et al. (1981). "Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3." Cancer Res **41**(5): 1898-1904.
- Bellincampi, L. D., R. F. Closkey, et al. (1998). "Viability of fibroblast-seeded ligament analogs after autogenous implantation." J Orthop Res **16**(4): 414-420.
- Benjamin, L. E., I. Hemo, et al. (1998). "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF." Development **125**(9): 1591-1598.
- Berghaus, A., M. Axhausen, et al. (1983). "[Porous synthetic materials in external ear reconstruction]." Laryngol Rhinol Otol (Stuttg) **62**(7): 320-327.
- Berry, C. C., G. Campbell, et al. (2004). "The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility." Biomaterials **25**(26): 5781-5788.
- Billiau, A. and R. Dijkmans (1990). "Interferon-gamma: mechanism of action and therapeutic potential." Biochem Pharmacol **40**(7): 1433-1439.
- Blaydon, S. M., T. R. Shepler, et al. (2003). "The porous polyethylene (Medpor) spherical orbital implant: a retrospective study of 136 cases." Ophthal Plast Reconstr Surg **19**(5): 364-371.
- Borges, J., F. T. Tegtmeier, et al. (2003). "Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model." Tissue Eng **9**(3): 441-450.
- Boyman, O. and J. Sprent (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-190.
- Braun, T., S. Gratza, et al. (2010). "Auricular reconstruction with porous polyethylene frameworks: outcome and patient benefit in 65 children and adults." Plast Reconstr Surg **126**(4): 1201-1212.

- Brodbeck, W. G., M. S. Shive, et al. (2002). "Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages." *J Lab Clin Med* **139**(2): 90-100.
- Brodbeck, W. G., G. Voskerician, et al. (2003). "In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry." *J Biomed Mater Res A* **64**(2): 320-329.
- Broxmeyer, H. E. (1996). "Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules?" *J Exp Med* **183**(6): 2411-2415.
- Caarls, W., B. Rieger, et al. (2011). "Minimizing light exposure with the programmable array microscope." *J Microsc* **241**(1): 101-110.
- Campillo-Fernandez, A. J., R. E. Unger, et al. (2009). "Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios: influence of fibronectin adsorption and conformation." *Tissue Eng Part A* **15**(6): 1331-1341.
- Cardona, M. A., R. L. Simmons, et al. (1992). "TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials." *J Biomed Mater Res* **26**(7): 851-859.
- Chapekar, M. S. (2000). "Tissue engineering: challenges and opportunities." *J Biomed Mater Res* **53**(6): 617-620.
- Cheng, L. E., C. Ohlen, et al. (2002). "Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8+ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8+ T cells rather than promotion of cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3001-3006.
- Choy, J. S., O. Mathieu-Costello, et al. (2005). "The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions." *Ann Biomed Eng* **33**(8): 1027-1033.
- Colantuoni, A., S. Bertuglia, et al. (1984). "Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature." *Int J Microcirc Clin Exp* **3**(1): 13-28.
- Colton, C. K. (1995). "Implantable biohybrid artificial organs." *Cell Transplant* **4**(4): 415-436.
- Dinarello, C. A. (1997). "Interleukin-1." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(4): 253-265.
- Dobrin, P. B. (1996). "Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings." *J Surg Res* **61**(2): 413-415.
- Edwards, S. L., J. S. Church, et al. (2011). "Modeling tissue growth within nonwoven scaffolds pores." *Tissue Eng Part C Methods* **17**(2): 123-130.

- Ehrmantraut, S., A. Naumann, et al. (2012). "Vitalization of Porous Polyethylene (Medpor((R))) with Chondrocytes Promotes Early Implant Vascularization and Incorporation into the Host Tissue." Tissue Eng Part A.
- Eichhorn, M. E., S. Luedemann, et al. (2007). "Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting." Cancer Biol Ther **6**(6): 920-929.
- Endrich, B., K. Asaishi, et al. (1980). "Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters." Res Exp Med (Berl) **177**(2): 125-134.
- Eppeley, B. L., J. E. Woodell, et al. (2004). "Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing." Plast Reconstr Surg **114**(6): 1502-1508.
- Eyden, B. (2004). "Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in "fibroblastic" tumors." Ultrastruct Pathol **28**(5-6): 307-319.
- Falanga, V., D. Margolis, et al. (1998). "Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group." Arch Dermatol **134**(3): 293-300.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science **279**(5356): 1528-1530.
- Folkman, J. and M. Hochberg (1973). "Self-regulation of growth in three dimensions." J Exp Med **138**(4): 745-753.
- Fossiez, F., O. Djossou, et al. (1996). "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." J Exp Med **183**(6): 2593-2603.
- Georgakoudi, I., W. L. Rice, et al. (2008). "Optical spectroscopy and imaging for the noninvasive evaluation of engineered tissues." Tissue Eng Part B Rev **14**(4): 321-340.
- Griffith, L. G. (2002). "Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering." Ann N Y Acad Sci **961**: 83-95.
- Griffith, L. G. and G. Naughton (2002). "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." Science **295**(5557): 1009-1014.
- Han, S. K., K. W. Chun, et al. (2006). "The effect of human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts on angiogenesis." Plast Reconstr Surg **117**(3): 829-835.
- Haniffa, M. A., X. N. Wang, et al. (2007). "Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells." J Immunol **179**(3): 1595-1604.

- Harris, A. G., I. Sinitina, et al. (2002). "Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes." *Eur J Med Res* **7**(3): 117-124.
- Heinze, K. G., S. Costantino, et al. (2009). "Beyond photobleaching, laser illumination unbinds fluorescent proteins." *J Phys Chem B* **113**(15): 5225-5233.
- Higgins, D. M., R. J. Basaraba, et al. (2009). "Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials." *Am J Pathol* **175**(1): 161-170.
- Hurley, J. R., S. Balaji, et al. (2010). "Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(2): C444-453.
- Ishikawa, M., E. Sekizuka, et al. (1999). "In vivo rat closed spinal window for spinal microcirculation: observation of pial vessels, leukocyte adhesion, and red blood cell velocity." *Neurosurgery* **44**(1): 156-161; discussion 161-152.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." *J Cell Biochem* **64**(2): 295-312.
- Kao, W. J., A. K. McNally, et al. (1995). "Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo." *J Biomed Mater Res* **29**(10): 1267-1275.
- Katakura, T., M. Miyazaki, et al. (2004). "CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages." *J Immunol* **172**(3): 1407-1413.
- Katz, Y., O. Nadiv, et al. (2001). "Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes." *Arthritis Rheum* **44**(9): 2176-2184.
- Kawaja, M. D., A. M. Fagan, et al. (1991). "Intracerebral grafting of cultured autologous skin fibroblasts into the rat striatum: an assessment of graft size and ultrastructure." *J Comp Neurol* **307**(4): 695-706.
- Khouw, I. M., P. B. van Wachem, et al. (1998). "Inhibition of the tissue reaction to a biodegradable biomaterial by monoclonal antibodies to IFN-gamma." *J Biomed Mater Res* **41**(2): 202-210.
- Klein, T. and R. Bischoff (2011). "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." *Amino Acids* **41**(2): 271-290.
- Klosterhalfen, B., B. Hermanns, et al. (2003). "Biological Response To Mesh." *Eur Surg Res* **35**(1).

- Kniazeva, E. and A. J. Putnam (2009). "Endothelial cell traction and ECM density influence both capillary morphogenesis and maintenance in 3-D." Am J Physiol Cell Physiol **297**(1): C179-187.
- Koike, N., D. Fukumura, et al. (2004). "Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels." Nature **428**(6979): 138-139.
- Krause, T. J., F. M. Robertson, et al. (1990). "Differential production of interleukin 1 on the surface of biomaterials." Arch Surg **125**(9): 1158-1160.
- Kuhnle, G. E., F. H. Leipfinger, et al. (1993). "Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy." J Appl Physiol **74**(3): 1462-1471.
- Laan, M., Z. H. Cui, et al. (1999). "Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways." J Immunol **162**(4): 2347-2352.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Lerrick, J. W. and S. C. Wright (1990). "Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha." FASEB J **4**(14): 3215-3223.
- Laschke, M. W., Y. Harder, et al. (2006). "Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes." Tissue Eng **12**(8): 2093-2104.
- Laschke, M. W., J. M. Haufel, et al. (2005). "New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo." J Biomed Mater Res A **74**(4): 696-704.
- Laschke, M. W. and M. D. Menger (2012). "Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation." Eur Surg Res **48**(2): 85-92.
- Laschke, M. W., M. Rucker, et al. (2008). "Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature." Ann Surg **248**(6): 939-948.
- Laschke, M. W., M. Rucker, et al. (2008). "Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds." J Biomed Mater Res A **85**(2): 397-407.
- Laschke, M. W., B. Vollmar, et al. (2009). "Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines." Tissue Eng Part B Rev **15**(4): 455-465.
- Laschke, M. W., B. Vollmar, et al. (2011). "The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue." Eur Cell Mater **22**: 147-164; discussion 164-147.
- Lee, S., N. Maronian, et al. (2005). "Porous high-density polyethylene for orbital reconstruction." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **131**(5): 446-450.

- Leunig, M., F. Yuan, et al. (1992). "Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice." *Cancer Res* **52**(23): 6553-6560.
- Li, X. C., G. Demirci, et al. (2001). "IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo." *Nat Med* **7**(1): 114-118.
- Liang, X., B. W. Graf, et al. (2009). "Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography." *J Biophotonics* **2**(11): 643-655.
- Liu, H., H. Fan, et al. (2008). "A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament fibroblasts responses on combined silk scaffolds." *Biomaterials* **29**(10): 1443-1453.
- Lokmic, Z., F. Stilliaert, et al. (2007). "An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct." *FASEB J* **21**(2): 511-522.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-479.
- Martin, T. A., K. G. Harding, et al. (1999). "Regulation of angiogenesis and endothelial cell motility by matrix-bound fibroblasts." *Angiogenesis* **3**(1): 69-76.
- Masuda, T., M. Furue, et al. (2004). "Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes." *Tissue Eng* **10**(11-12): 1672-1683.
- Mendelsohn, M. (2005). "Straightening the crooked middle third of the nose: using porous polyethylene extended spreader grafts." *Arch Facial Plast Surg* **7**(2): 74-80.
- Menger, M. D., F. Hammersen, et al. (1992). "In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts." *Thorac Cardiovasc Surg* **40**(1): 19-25.
- Menger, M. D., M. W. Laschke, et al. (2002). "Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber." *Eur Surg Res* **34**(1-2): 83-91.
- Menger, M. D. and H. A. Lehr (1993). "Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo." *Immunol Today* **14**(11): 519-522.
- Menger, M. D., I. Marzi, et al. (1991). "In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats." *Eur Surg Res* **23**(3-4): 158-169.
- Messmer, K. and F. Krombach (1998). "[Microcirculation research in experimental surgery]." *Chirurg* **69**(4): 333-338.

- Miller, K. M. and J. M. Anderson (1988). "Human monocyte/macrophage activation and interleukin 1 generation by biomedical polymers." *J Biomed Mater Res* **22**(8): 713-731.
- Munro, J. M. (1993). "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases." *Eur Heart J* **14 Suppl K**: 72-77.
- Nerem, R. M. (2010). "Regenerative medicine: the emergence of an industry." *J R Soc Interface* **7 Suppl 6**: S771-775.
- Ng, S. G., S. A. Madill, et al. (2001). "Medpor porous polyethylene implants in orbital blowout fracture repair." *Eye (Lond)* **15**(Pt 5): 578-582.
- Norrby, K. (1997). "Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control." *APMIS* **105**(6): 417-437.
- Numasaki, M., J. Fukushi, et al. (2003). "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." *Blood* **101**(7): 2620-2627.
- Numasaki, M., M. T. Lotze, et al. (2004). "Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts." *Immunol Lett* **93**(1): 39-43.
- Opal, S. M. and V. A. DePalo (2000). "Anti-inflammatory cytokines." *Chest* **117**(4): 1162-1172.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 221-233.
- Pandit, A. S., D. S. Feldman, et al. (1998). "Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold." *Growth Factors* **15**(2): 113-123.
- Papenfuss, H. D., J. F. Gross, et al. (1979). "A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold." *Microvasc Res* **18**(3): 311-318.
- Phillips, T. J., J. Manzoor, et al. (2002). "The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers." *Arch Dermatol* **138**(8): 1079-1081.
- Pinney, E., K. Liu, et al. (2000). "Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity." *J Cell Physiol* **183**(1): 74-82.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.
- Pu, F., N. P. Rhodes, et al. (2010). "The use of flow perfusion culture and subcutaneous implantation with fibroblast-seeded PLLA-collagen 3D scaffolds for abdominal wall repair." *Biomaterials* **31**(15): 4330-4340.

- Purdy, E. P. (1997). "Oculoplastic and orbital applications of porous high-density polyethylene implants." *Curr Opin Ophthalmol* **8**(5): 57-63.
- Richardson, T. P., M. C. Peters, et al. (2001). "Polymeric system for dual growth factor delivery." *Nat Biotechnol* **19**(11): 1029-1034.
- Ries, C., T. Popp, et al. (2009). "Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard." *Toxicology* **263**(1): 26-31.
- Rippon, H. J. and A. E. Bishop (2004). "Embryonic stem cells." *Cell Prolif* **37**(1): 23-34.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-674.
- Rodriguez, A., H. Meyerson, et al. (2009). "Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites." *J Biomed Mater Res A* **89**(1): 152-159.
- Romo, T., 3rd, L. G. Morris, et al. (2009). "Reconstruction of congenital microtia-atresia: outcomes with the Medpor/bone-anchored hearing aid-approach." *Ann Plast Surg* **62**(4): 384-389.
- Romo, T., 3rd, A. P. Sclafani, et al. (1998). "Use of porous high-density polyethylene in revision rhinoplasty and in the platyrhine nose." *Aesthetic Plast Surg* **22**(3): 211-221.
- Rovainen, C. M., T. A. Woolsey, et al. (1993). "Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis." *J Cereb Blood Flow Metab* **13**(3): 359-371.
- Rucker, M., M. W. Laschke, et al. (2006). "Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice." *Biomaterials* **27**(29): 5027-5038.
- Rucker, M., M. W. Laschke, et al. (2008). "Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds." *J Biomed Mater Res A* **86**(4): 1002-1011.
- Saetzler, R. K., J. Jallo, et al. (1997). "Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes." *J Histochem Cytochem* **45**(4): 505-513.
- Salem, A. K., R. Stevens, et al. (2002). "Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore features." *J Biomed Mater Res* **61**(2): 212-217.
- Sandison, J. (1924). "A new method for the microscopic study of living growing tissues by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear." *Anat Rec* **28**: 281-287.

- Schmidt, E. E., I. C. MacDonald, et al. (1990). "Interactions of leukocytes with vessel walls and with other blood cells, studied by high-resolution intravital videomicroscopy of spleen." *Microvasc Res* **40**(1): 99-117.
- Sewell, I. A. (1966). "Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch." *J Anat* **100**(Pt 4): 839-856.
- Shimabukuro, Y., S. Murakami, et al. (1992). "Interferon-gamma-dependent immunosuppressive effects of human gingival fibroblasts." *Immunology* **76**(2): 344-347.
- Siegel, R. J., K. Swan, et al. (1985). "Limitations of postmortem assessment of human coronary artery size and luminal narrowing: differential effects of tissue fixation and processing on vessels with different degrees of atherosclerosis." *J Am Coll Cardiol* **5**(2 Pt 1): 342-346.
- Spector, M., W. R. Flemming, et al. (1975). "Early tissue infiltrate in porous polyethylene implants into bone: a scanning electron microscope study." *J Biomed Mater Res* **9**(5): 537-542.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." *J Exp Med* **176**(1): 287-292.
- Steinbauer, M., A. G. Harris, et al. (2000). "Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model." *Langenbecks Arch Surg* **385**(4): 290-298.
- Stelter, K., S. Strieth, et al. (2007). "Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks." *Rhinology* **45**(4): 325-331.
- Sterodimas, A., J. De Faria, et al. (2009). "Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature." *Ann Plast Surg* **62**(1): 97-103.
- Strieth, S., V. von Johnston, et al. (2005). "A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo." *Transplantation* **79**(4): 392-400.
- Strieth, S., T. Weger, et al. (2010). "Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF." *J Biomed Mater Res A* **93**(4): 1566-1573.
- Stroikin, Y., U. Johansson, et al. (2007). "Increased resistance of lipofuscin-loaded prematurely senescent fibroblasts to starvation-induced programmed cell death." *Biogerontology* **8**(1): 43-53.

- Sun, T., D. Norton, et al. (2007). "Development of a 3D cell culture system for investigating cell interactions with electrospun fibers." *Biotechnol Bioeng* **97**(5): 1318-1328.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676.
- Tan, W., A. Sendemir-Urkmez, et al. (2004). "Structural and functional optical imaging of three-dimensional engineered tissue development." *Tissue Eng* **10**(11-12): 1747-1756.
- Tang, L., T. A. Jennings, et al. (1998). "Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8841-8846.
- Theobald, V. A., J. D. Lauer, et al. (1993). ""Neutral allografts"--lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and class II antigens." *Transplantation* **55**(1): 128-133.
- Thiel, R. and M. Blaut (2005). "An improved method for the automated enumeration of fluorescently labelled bacteria in human faeces." *J Microbiol Methods* **61**(3): 369-379.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.
- Vajkoczy, P., A. Ullrich, et al. (2000). "Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation." *Neoplasia* **2**(1-2): 53-61.
- Van den Steen, P. E., B. Dubois, et al. (2002). "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**(6): 375-536.
- Van Eijk, F., D. B. Saris, et al. (2004). "Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source." *Tissue Eng* **10**(5-6): 893-903.
- van Luyn, M. J., I. M. Khouw, et al. (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**(3): 398-406.
- Vertemati, M., L. Vizzotto, et al. (2008). "A morphometric model to minimize subjectivity in the histological assessment of hepatocellular carcinoma and its precursors in cirrhosis." *Microsc Res Tech* **71**(8): 606-613.
- Vollmar, B., M. W. Laschke, et al. (2001). "In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles." *Am J Pathol* **159**(5): 1661-1670.
- Waller, A. (1846). *Philos. Mag. J. Sci.* **29**: 397 - 405.

- Webster, K. E., S. Walters, et al. (2009). "In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression." J Exp Med **206**(4): 751-760.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-248.
- Zippel, N., M. Schulze, et al. (2010). "Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine." Recent Pat Biotechnol **4**(1): 1-22.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.

VII. Anhang

1. Statistik

1.1. Statistische Auswertung der Daten zu den Zytokin-Konzentrationen im Implantatbett
(s. Abb. 20 - 22):

Parameter	Alternativhypothese P (H1)
IFN- γ	0,732
TNF- α	0,905
MMP-9	0,822
MMP-2	0,475
IL-10	0,664
IL-4	0,496
IL-2	0,678
IL-17A	0,640
IL-1 β	0,946

Die gemessenen Werte waren statistisch nicht signifikant.

1.2. Statistische Auswertung der Daten zu den Zytokin-Konzentrationen im Implantatbett
(s. Abb. 20 - 22):

Parameter	Alternativhypothese P (H1)
IFN- γ	0,827
TNF- α	0,735
MMP-9	0,186
MMP-2	0,987
IL-10	0,634
IL-4	0,106
IL-2	0,694
IL-17A	0,424
IL-1 β	0,464

Die gemessenen Werte waren statistisch nicht signifikant.

2. Danksagung

Die vorliegend Arbeit wurde am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von PD Dr. med. S. Strieth durchgeführt.

Bei der Umsetzung war ich maßgeblich auf die Unterstützung einiger Personen angewiesen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

An erster Stelle bedanke ich mich bei PD Dr. S. Strieth. Durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut hat er mir den Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten und der experimentellen Forschung ermöglicht. Seine hervorragende Betreuung über die gesamte Dauer dieser Arbeit hat entscheidend zum erfolgreichen Abschluss dieser beigetragen. Das Interesse und die Unterstützung, die mir auch über die wissenschaftliche Arbeit hinaus zuteilwurden, haben mich in der Wahl meines weiteren Berufswegs entscheidend beeinflusst.

Für die Möglichkeit am Institut für Chirurgische Forschung wissenschaftlich tätig sein zu dürfen, geht mein Dank an dessen Leiter, Prof. Dr. med. Pohl. Zudem bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. S. Lüdemann, die mir bei Durchführung der Kammerpräparationen, sowie den mikroskopischen Analysen jederzeit unterstützend zur Seite stand. Gleicher gilt für Dr. M. Schneider, die mich in die Arbeit mit Zellkulturen einführte. PD Dr. S. Dietzel ermöglichte mir freundlicherweise die Verwendung des konfokalen Mikroskops am Institut und stand jederzeit für meine zahlreichen Fragen zur Verfügung.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. B. Summer von der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität München. Seine Fachkompetenz und die freundliche Zusammenarbeit ermöglichen die Durchführung der molekularbiologischen Methoden.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken. Ihre uneingeschränkte Unterstützung hat mich während des gesamten Studiums begleitet und mir auch diese Arbeit ermöglicht.