



***In vitro* Fremdkörpermodellssysteme
zur Vorhersage von biomaterialinduzierten
Immunreaktionen**

***In vitro* foreign body model systems
for prediction of immune reactions to biomaterials**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Maren Annika Jannasch

aus

Filderstadt

am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
des Universitätsklinikums Würzburg
Würzburg 2018

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Peter Michael Jakob

1. Betreuer: Dr.-Ing. Jan Hansmann

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alma Zerneck-Madsen

3. Betreuer: Prof. Dr. biol. hum. Heike Walles

4. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Verzeichnis bisher veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten

Im Rahmen der von Maren Jannasch verfassten Masterarbeit konnte der folgende Fachartikel veröffentlicht werden:

Jannasch M, et al. (2015) Development and application of three dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Experimental Parasitology*.(1)

Teile der vorliegenden Dissertation sind bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Jannasch M, et al. (2017) *In vitro* chemotaxis and tissue remodeling assays quantitatively characterize foreign body reaction. *ALTEX*. (2)

Jan Hansmann, Heike Walles und Maren Jannasch planten die Experimente. Maren Jannasch hat die Studenten Judith Wiezoreck und Lisa Engelhardt im Zusammenhang mit diesem Teilprojekt ihrer Doktorarbeit angeleitet und zusammen die Experimente durchgeführt. Sabine Gätzner führte die Analyse der Zellkulturüberstände durch. Tobias Schmitz und Tobias Weigel konnten die Referenzmaterialien für die anschließende Testung vorbereiten. Maren Jannasch hat die Ergebnisse zusammengefasst und ausgewertet. Jan Hansmann und Maren Jannasch verfassten das Manuskript. Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und der Publikation zugestimmt.

Jannasch M, et al. (2017) A comparative multi-parametric *in vitro* model identifies the power of test conditions to predict the fibrotic tendency of a biomaterial. *Scientific Reports*. (3)

Jan Hansmann, Heike Walles und Maren Jannasch planten die Experimente. Maren Jannasch führte die Experimente durch. Sabine Gätzner analysierte die Kulturüberstände. Tobias Schmitz und Tobias Weigel konnten die Referenzmaterialien für die Testung vorbereiten. Maren Jannasch hat die Daten zusammenge-

fasst, statistisch modelliert und ausgewertet. Jan Hansmann und Maren Jannasch verfassten das Manuskript. Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und der Publikation zugestimmt.

Die beiden Publikationen Jannasch *et al.* (2017) sind unter der Lizenzvereinbarung „Creative Commons Attribution 4.0 International“ (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) veröffentlicht. Diese Vereinbarung ermöglicht, insofern die Autoren und die Quelle der ursprünglichen Arbeit entsprechend gekennzeichnet, die Lizenzvereinbarung dargestellt und vorgenommene Veränderungen gekennzeichnet sind, die Verwendung, die Adaption, die Verteilung und die Reproduktion der veröffentlichten Arbeit in jeglicher Form und in jeglichem Format.

Teile dieser Publikationen sind in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 3.1, 3.2, 3.3 und 3.4 in dieser Dissertation dargestellt. Zur Nachvollziehbarkeit vorgenommener Veränderungen sind die Originalarbeiten dem Anhang dieser Arbeit beigelegt. Alle Mitautoren haben der Verwendung der Ergebnisse in dieser Dissertation zugestimmt.

Im Rahmen der Nachwuchsgruppe „ETFace – Entwicklung nahtloser Gewebe-Technik-Schnittstellen“ (Förderkennzeichen 13N12971) fand die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit vom Bundesministerium für Bildung und Forschung statt.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, das heißt insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 22.01.2018

.....

Affidavit

I hereby confirm that my thesis is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 22.01.2018

.....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heike Walles für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg anfertigen zu dürfen, bedanken.

Vielen Dank Frau Prof. Alma Zerneck-Madsen für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenfalls danke ich Herr Prof. Dr. Jürgen Groll für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Thomas Hünig für seine Hilfestellung bei der Etablierung von multiparametrischen zytometrischen Analysen bedanken.

Mein besonderer Dank geht an meinen Erstbetreuer Herr Dr.-Ing. Jan Hansmann. Die Mitarbeit in einem interdisziplinären Forschungsprojekt ermöglichte mir wertvolle Erfahrungen zu sammeln, die meinen Blick über eine biomedizinische Expertise hinaus geschult haben. Deine Unterstützung durch stets kritische aber sehr hilfreiche Hinweise hat das Vorankommen meiner Doktorarbeit angetrieben. Die zahlreich investierten Stunden in die Betreuung meiner Arbeit schätze ich sehr.

Unserer technischen Assistentin Frau Sabine Gätzner möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Du hast vieles möglich gemacht, was ohne deine Unterstützung nicht realisierbar gewesen wäre. Vielen lieben Dank für deine Hilfe!

Unseren Materialwissenschaftlern Herr Dr. Tobias Schmitz und Herr Tobias Weigel danke ich für die zuverlässige Herstellung der Referenzmaterialien und deren optimale Anpassung auf jegliches Format. Allen anderen Teammitgliedern des Bioreaktorteams danke ich ebenfalls für die teils amüsanten, stets unterhaltsamen Diskussionsthemen während meiner Arbeit im Labor.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken. Die zahlreichen warmherzigen und ermutigenden Worte und euer Interesse an meiner Arbeit gaben mir die Motivation meinen Weg weiter zu gehen. Ich danke den neuen Freunden, die meine Zeit in Würzburg bereichert haben, und den „Alten“, denen keine Distanz zu weit war. Die Zeit mit euch allen hat mich sehr bereichert.

I. Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulphon)-Säure |
| AP-1 | Aktivatorprotein-1 |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| APTES | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B-Lymphozyten | Lymphozyten aus dem Knochenmark "bone marrow" |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CBA | Cytometric bead array (Zytometrischer Nachweis mittels fluoreszenzmarkierter Partikel) |
| CD | Cluster of differentiation (Differenzierungsmarker) |
| <i>dA</i> | akkumulierte Distanz |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| <i>dE</i> | euklidische Distanz |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymgekoppeltes immunadsorbierendes Nachweisverfahren) |
| FACS | fluorescence-activated cell scanning (Durchflusszytometrie) |
| Fc | fragment crystallizable region |
| FcR | fragment crystallizable region receptor |
| FGF | fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GM-CSF | granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten und Makrophagen koloniestimulierender Faktor) |
| HCl | Hydrochlorsäure |
| HFF-1 | human foreskin fibroblasts-1 (humane Fibroblasten aus Vorhaut) |

| | |
|-------------------------------|---|
| HFL-1 | human fetal lung fibroblasts -1(humane fetale Fibroblasten aus der Lunge) |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HRP | horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase) |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-4 | Interleukin-4 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| IL-12 | Interleukin-12 |
| IL-13 | Interleukin-13 |
| INF γ | Interferon γ |
| KHCO ₃ | Kaliumbicarbonat |
| LDL | Low density lipoprotein (Lipoprotein mit niedriger Dichte) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M1 | Makrophagen des Phänotyps M1 |
| M2 | Makrophagen des Phänotyps M2 |
| MACS | Magnetic-activated cell separation (magnetische Zellselektion) |
| MAT | Monozytenaktivierungstest |
| MCI | mittlere Cyanintensität |
| MCP-1 | macrophage chemotactic protein-1 (Makrophagen chemotaktisches Protein-1) |
| M-CSF | macrophage colony-stimulating factor (Makrophagen koloniestimulierender Faktor) |
| MEM | modified eagle medium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NF-kB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| PAMP | pathogen-associated molecular patterns (pathogenassoziierte molekulare Muster) |
| PBS | phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Saline) |
| PBS+ | phosphatgepufferte Saline mit Magnesium und Calcium |
| PDGF | platelet-derived growth factor (blutplättchenfreigesetzter Wachstumsfaktor) |
| PE | Phycoerythrin |

| | |
|------------------------------|---|
| PE | Polyethylen |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| R | Winkellänge |
| RPMI | Roswell Park memorial institute |
| SDS | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| TBS | Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TBST | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween |
| T-Lymphozyten | Lymphozyten aus dem Thymus |
| t-AMCA | trans-4-aminomethyl-cyclohexane-1-carboxylic acid (Tranexamsäure) |
| TMB | Tetramethylbenzidinsubstrat |
| T _{H1} -Lymphozyten | T-Helferzellen vom Typ 1 |
| T _{H2} -Lymphozyten | T-Helferzellen vom Typ 2 |
| TGF-β1 | transforming growth factor-β1 (Tranformierender Wachstumsfaktor-β1) |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TIMP | tissue inhibitor of metalloproteinases (Inhibitoren der Metalloproteinasen) |

Einheiten

| | |
|-----------------|--|
| α | Phasenwinkel |
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| g ₀ | Erdbeschleunigung (9,80665 Meter pro Quadratsekunde) |
| g | Gramm |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| M | molar |
| mA | Milliamper |
| mg | Milligramm |

| | |
|----|---|
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mm | Millimeter |
| N | normal |
| nm | Nanometer |
| pH | potentia hydrogenii (Stärke des Wasserstoffs) |
| V | Volt |
| W | Watt |

II. Tabellen

| | | |
|--------------|---|----|
| Tabelle 2-1 | Gewebe- und Zellmaterial..... | 24 |
| Tabelle 2-2 | Biologische und chemische Stoffe..... | 26 |
| Tabelle 2-3 | Biomaterialien..... | 29 |
| Tabelle 2-4 | Geräte..... | 29 |
| Tabelle 2-5 | Software..... | 30 |
| Tabelle 2-6 | Konsummaterial..... | 31 |
| Tabelle 2-7 | Zell- und Gewebekulturmedien..... | 33 |
| Tabelle 2-8 | Supplemente für Kulturmedien..... | 34 |
| Tabelle 2-9 | Enzym- und Substratlösungen..... | 34 |
| Tabelle 2-10 | Zellkulturpuffer..... | 36 |
| Tabelle 2-11 | Antikörper..... | 37 |
| Tabelle 2-12 | Analytische Nachweiskits..... | 40 |
| Tabelle 2-13 | Analytische Puffer und Lösungen..... | 44 |
| Tabelle 2-14 | Antikörper zur zytometrischen Charakterisierung der Monozyten nach Zellisolierung sowie der Makrophagen nach 6-tägiger Differenzierung..... | 50 |
| Tabelle 2-15 | Optimierte Vorgehensweise zur Azanfärbung nach Heidenheim..... | 67 |
| Tabelle 2-16 | Zusammenfassung der verwendeten Antikörper und Toxine..... | 70 |
| Tabelle 2-17 | Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die kombinierte Färbung von CD54 und CD163..... | 71 |
| Tabelle 2-18 | Entparaffinieren der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe.. | 72 |
| Tabelle 2-19 | Aufschluss der Epitope mit Demaskierungspuffer..... | 72 |
| Tabelle 2-20 | Eigenschaften des verwendeten Primärantikörpers..... | 72 |
| Tabelle 2-21 | Färbeprotokoll nach Mayer zur sauren Hämatoxylinfärbung..... | 73 |
| Tabelle 2-22 | Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe..... | 74 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Tabelle 2-23 | Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels. | 76 |
| Tabelle 2-24 | Zusammenfassung der im Westernblot verwendeten Antikörper. | 77 |
| Tabelle 3-1 | Funktion der charakterisierten Unterscheidungsmerkmale. | 84 |
| Tabelle 3-2 | Präklinische und klinische Studien ermöglichten eine vergleichende Bewertung der eingesetzten Referenzbiomaterialien. | 86 |
| Tabelle 4-1 | Funktionelle und morphologische Unterschiede zwischen Makrophagen aus unterschiedlichen Spezies. | 142 |
| Tabelle 4-2 | Zusammenfassung der bereits etablierten Fremdkörpermodellssysteme. ... | 156 |

III. Abbildungen

| | | |
|----------------|---|-----|
| Abbildung 1-1 | Die Reaktion des Körpers auf einen Fremdkörper ist ein dynamischer Vorgang..... | 6 |
| Abbildung 1-2 | Die Bildung von Makrophagen erfolgt aus einer Keimbahnvorläuferzelle oder aus Monozyten nach Diapedese in das Gewebe. | 11 |
| Abbildung 1-3 | Im Zusammenspiel bilden die Makrophagen und die Fibroblasten während der chronischen Fremdkörperreaktion die zentralen Zellen..... | 12 |
| Abbildung 1-4 | Makrophagen und Fibroblasten setzen Zytokine in ihre Mikroumgebung frei, die auf parakrine und autokrine Wirkungsweise eine zelluläre Reaktion auslösen. | 16 |
| Abbildung 3-1 | Zytometrische Charakterisierung der Monozyten nach magnetischer Selektion aus der peripheren mononuklearen Blutzellfraktion. | 82 |
| Abbildung 3-2 | Verifizierung des Differenzierungsprofils von M2-Makrophagen nach Isolierung aus Vollblut. | 83 |
| Abbildung 3-3 | Indirektes Modellsystem zur Charakterisierung der biomaterialinduzierten Chemotaxis sowie des Bindegewebsumbaus. | 89 |
| Abbildung 3-4 | Die zelluläre Adhäsion, die aktive Freisetzung und die passive Adsorption von Wachstumsfaktoren an die Materialoberflächen..... | 91 |
| Abbildung 3-5 | Bildanalyse der Chemotaxis von Fibroblasten..... | 93 |
| Abbildung 3-6 | Übertrag der Bewegungstrajektorien in ein Koordinatensystem. | 95 |
| Abbildung 3-7 | Lineare und zirkuläre statistische Parameter zur Charakterisierung der Chemotaxis von Fibroblasten..... | 97 |
| Abbildung 3-8 | Bewertung von zellkonditioniertem Medium und dessen Effekt auf den Bindegewebsumbau. | 100 |
| Abbildung 3-9 | Azanfärbung von Kollagenstrukturen in den Bindegewebsmodellen..... | 101 |
| Abbildung 3-10 | Vergleichendes Modellsystem zur Bewertung von Testbedingungen. | 104 |
| Abbildung 3-11 | Morphologie und Adhäsion der Makrophagen an Glas-, PTFE- und Titanoberflächen in Abhängigkeit von den Testbedingungen. | 106 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Abbildung 3-12 | Vitalität der materialadhärenten Makrophagen in Abhängigkeit von den Testbedingungen. | 108 |
| Abbildung 3-13 | Im Vergleich zu den materiainduzierten Effekten führte die Stimulation der Makrophagen mit LPS eine höhere Ausschüttung der Zytokine herbei. ... | 110 |
| Abbildung 3-14 | Sekretion von proentzündlichen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α | 112 |
| Abbildung 3-15 | Aktive Sekretion von IL-8, IL-10 und TGF- β 1. | 113 |
| Abbildung 3-16 | Das Signifikanzprofil von jedem Referenzmaterial im Vergleich zu allen anderen Referenzmaterialien konnte in ein Bewertungsmodell überführt werden. | 116 |
| Abbildung 3-17 | Die Summe der Signifikanzwerte aller einzelnen Messparameter konnte in ein Bewertungsmodell der Referenzmaterialien überführt werden. | 117 |
| Abbildung 3-18 | Das dreidimensionale Fremdkörpermodell bildete die Grenzflächen in der Wundumgebung ab. | 120 |
| Abbildung 3-19 | Koagulation von humanem Blutplasma. | 122 |
| Abbildung 3-20 | Aufbau von langzeitstabilen Fibrinhydrogelen. | 123 |
| Abbildung 3-21 | Vitalität der Makrophagen in direktem Kontakt mit dem Biomaterial. | 124 |
| Abbildung 3-22 | In direktem Kontakt zur Materialoberfläche bildete sich Fibringewebe mit vitalen Makrophagen. | 126 |
| Abbildung 3-23 | Apikales Bindegewebsmodell bestehend aus HFF-1-Fibroblasten in einem Kollagenhydrogel sowie in einem Fibrinhydrogel. | 127 |
| Abbildung 3-24 | Die Zytokinausschüttung im Fremdkörpermodellsystem hing vom Material und dem Modell ab. | 129 |
| Abbildung 3-25 | Semiquantitative Bestimmung des Kollagen-I- und β -Aktinanteils in den Fremdkörpermodellen. | 132 |
| Abbildung 3-26 | Fibroblasten im apikalen Bindegewebsmodell bildeten Kollagen III. | 134 |
| Abbildung 3-27 | Azanfärbung des apikalen Bindegewebes. | 135 |
| Abbildung 3-28 | Hauptkomponentenanalyse der Fremdkörpermodelle für die Materialien Glas, PTFE und Titan. | 137 |

IV. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Verzeichnis bisher veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten | I |
| Eidesstaatliche Erklärung | III |
| Affidavit | IV |
| Danksagung | V |
| I. Abkürzungen und Einheiten | VI |
| II. Tabellen | X |
| III. Abbildungen | XII |
| IV. Inhaltsverzeichnis | XIV |
| Zusammenfassung | XVII |
| Summary | XIX |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Marktentwicklung und klinische Relevanz | 1 |
| 1.2 Biokompatibilität von Medizinprodukten | 2 |
| 1.3 Reaktion des menschlichen Körper auf einen Fremdkörper | 5 |
| 1.3.1 Verlauf der Gewebsantwort auf einen Fremdkörper | 5 |
| 1.3.2 Zelluläre Mediatoren der Fremdkörperreaktion | 10 |
| 1.3.3 Lösliche Mediatoren der Fremdkörperreaktion | 14 |
| 1.3.4 Zusammensetzung der fibrösen Bindegewebskapsel um einen Fremdkörper | 19 |
| 1.4 Präklinische Testverfahren zur Erfassung von Medizinprodukten..... | 20 |
| 1.5 Motivation und Gesamtziel der Doktorarbeit | 23 |
| 2. Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Verwendete Materialien | 24 |
| 2.1.1 Gewebe- und Zellmaterial | 24 |
| 2.1.2 Biologische und chemische Stoffe | 26 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 2.1.3 | Referenzbiomaterialien..... | 29 |
| 2.1.4 | Geräte, Software und Konsummaterialien | 29 |
| 2.1.5 | Zell- und Gewebeskulturmedium, Lösungen und Puffer | 33 |
| 2.1.6 | Analytische Nachweise und Komponenten..... | 37 |
| 2.2 | Methoden..... | 47 |
| 2.2.1 | Isolierung, Kultivierung und Differenzierung von Zellen..... | 47 |
| 2.2.2 | Herstellung und Vorbereitung der Referenzbiomaterialien..... | 52 |
| 2.2.3 | Entwicklung von indirekten zellbasierten Modellsystemen | 54 |
| 2.2.3.1 | Modell zur Chemotaxis von Fibroblasten | 54 |
| 2.2.3.2 | Bindegewebsmodelle zur Bewertung von Langzeiteffekten..... | 57 |
| 2.2.4 | Vergleichender Modellansatz zur Bewertung physiologischer Testvariablen | 59 |
| 2.2.5 | Dreidimensionale Gewebemodelle zur Bewertung der Fremdkörperreaktion | 62 |
| 2.2.6 | Biochemische, immunologische und histologische Nachweisverfahren..... | 66 |
| 2.2.7 | Statistische Datenanalyse | 79 |
| 3. | Ergebnisse..... | 80 |
| 3.1 | Charakterisierung von Monozyten und Makrophagen | 81 |
| 3.2 | Auswahl geeigneter Referenzbiomaterialien..... | 85 |
| 3.3 | Entwicklung von indirekten zellbasierten Modellsystemen..... | 88 |
| 3.3.1 | Chemotaxis von Fibroblasten in Antwort auf materialinduzierte Konditionierung | 88 |
| 3.3.2 | Langzeiteffekte auf den Bindegewebsumbau..... | 98 |
| 3.4 | Multiparametrische Modellierung zur Bewertung von Testbedingungen..... | 102 |
| 3.5 | Dreidimensionales Wundgewebe als Fremdkörpermodelle | 119 |
| 4. | Diskussion | 140 |
| 4.1 | Entwicklung von humanbasierten <i>in vitro</i> Modellsystemen | 141 |
| 4.2 | Validierung von Modellsystemen..... | 144 |
| 4.3 | Materialabhängige Teilprozesse während einer Fremdkörperreaktion | 145 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3.1 | Materialabhängige Chemotaxis von Fibroblasten | 146 |
| 4.3.2 | Materialinduzierter Bindegewebsumbau in dreidimensionalen Modellen | 148 |
| 4.4 | Vergleichende statistische Modellierung zur Bewertung von Testbedingungen | 149 |
| 4.5 | Biomimetische Rekonstruktion eines dreidimensionalen Wundgewebes | 154 |
| 5. | Schlussfolgerung | 160 |
| 6. | Literatur | 161 |
| 7. | Anhang | 174 |
| 7.1 | Lebenslauf | 174 |
| 7.2 | Verwendung veröffentlichter wissenschaftlicher Inhalte | 176 |

Zusammenfassung

Die Implantation eines Medizinprodukts in den menschlichen Körper ruft eine Immunreaktion hervor, die zur fibrösen Einkapselung führen kann. Makrophagen in direktem Kontakt mit der Oberfläche des Implantats erfassen sensorisch den Fremdkörper und übersetzen das Signal in die Freisetzung zahlreicher löslicher Mediatoren. Das generierte Entzündungsmilieu moduliert die Heilungsreaktion und kann zur Anreicherung von Fibroblasten sowie zur Erhöhung der Matrixsyntheserate in der Wundumgebung führen. Eine dichte fibröse Kapsel um ein Medizinprodukt beeinträchtigt den Ersatz von Körperstrukturen, das Unterstützen physiologischer Körperfunktionen sowie die Effizienz einer medizinischen Therapie. Zur Identifizierung potenzieller Biomaterialkandidaten mit optimalen Eigenschaften ist jedoch eine evidenzbasierte Entscheidungsfindung notwendig und diese wiederum muss durch geeignete Testmethoden unterstützt werden.

Zur Erfassung lokaler Effekte nach Implantation eines Biomaterials begründet die Komplexität der ablaufenden Fremdkörperreaktion die Anwendung von Tiermodellen als Goldstandard. Die Eingliederung von *in vitro* Modellsystemen in standardisierte Testverfahren scheitert oft an der Verfügbarkeit validierter, verlässlicher und reproduzierbarer Methoden. Demnach ist kein standardisiertes *in vitro* Testverfahren beschrieben, das die komplexen dreidimensionalen Gewebsstrukturen während einer Fremdkörperreaktion abbildet und sich zur Testung über längere Kontaktphasen zwischen Blutkomponenten und Biomaterialien eignet. Jedoch können *in vitro* Testungen kosten- und zeiteffizienter sein und durch die Anwendung humaner Zellen eine höhere Übertragbarkeit auf den Menschen aufweisen. Zusätzlich adressiert die Präferenz zu *in vitro* Testmethoden den Aspekt „Reduzierung“ der 3R-Prinzipien „Replacement, Reduction, Refinement“ (Ersatz, Reduzierung, Verbesserung) von Russel und Burch (1959) zu einer bewussten und begründeten Anwendung von Tiermodellen in der Wissenschaft. Ziel von diesem Forschungsvorhaben war die Entwicklung von humanen *in vitro* Modellsystemen, die den Kontakt zu Blutkomponenten sowie die Reaktion des umliegenden Bindegewebes bei lokaler Implantation eines Biomaterials abbilden. Referenzmaterialien, deren Gewebsantwort nach Implantation in Tiere oder den Menschen bekannt ist, dienten als Validierungskriterium für die entwickelten Modellsysteme. Die Anreicherung von Zellen sowie die Bildung extrazellulärer Matrix in der Wundumgebung stellen wichtige Teilprozesse während einer Fremdkörperreaktion dar. Für beide Teilprozesse konnte in einem indirekten zellbasierten

Modellsystem der Einfluss einer zellvermittelten Konditionierung wie die Freisetzung von löslichen Mediatoren durch materialadhärente Makrophagen auf die gerichtete Wanderung von Fibroblasten sowie den Umbau eines dreidimensionalen Bindegewebsmodells aufgezeigt werden.

Des Weiteren ließ sich das Freisetzungsprofil von Zytokinen durch materialständige Makrophagen unter verschiedenen Testbedingungen wie der Kontamination mit LPS, der Oberflächenbehandlung mit humanem Blutplasma und der Gegenwart von IL-4 bestimmen. Die anschließende vergleichende statistische Modellierung der generierten komplexen multifaktoriellen Datenmatrix ermöglichte die Übersetzung in eine Biomaterialbewertung. Dieses entwickelte Testverfahren eignete sich einerseits zur Validierung von *in vitro* Testbedingungen sowie andererseits zur Bewertung von Biomaterialien. Darüber hinaus konnte in einem dreidimensionalen Fremdkörpermodell die komplexe dreidimensionale Struktur der extrazellulären Matrix in einer Wunde durch die Kombination unterschiedlicher Zell- und Matrixkomponenten biomimetisch nachgebaut werden. Diese neuartigen dreidimensionalen Fremdkörpermodelle ermöglichten die Testung von Biomaterialien über längere Testphasen und können in anschließenden Studien angewandt werden, um dynamische Prozesse zu untersuchen. Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit drei unterschiedliche Teststrategien entwickelt werden, die (I) die Bewertung von Teilprozessen ermöglichen, (II) die Identifizierung verlässlicher Testbedingungen unterstützen und (III) biomimetisch ein Wundgewebe abbilden. Wesentlich ist, dass biomimetisch ein dreidimensionales Gewebemodell entwickelt werden konnte, das eine verlässliche Unterscheidungskapazität zwischen Biomaterialien aufweist.

Summary

The implantation of a medical product into the human body induces an immune reaction, which may lead to its fibrous encapsulation. Macrophages in direct contact to the surface sense the foreign body and translate the signal in the secretion of multiple soluble mediators. This generated inflammatory milieu modulates the healing reaction, may induce the accumulation of fibroblasts and lead in the wound microenvironment to an increased matrix synthesis rate. A dense fibrous capsule surrounding a medical product is able to impair the replacement of body structures, the support of physiological body functions as well as the efficiency of a medical therapy. To identify potential biomaterial candidates with optimal characteristics an evidence-based decision making process is necessary and furthermore affords the support by appropriate test procedures.

To study local effects after implantation of biomaterials, the complexity of the foreign body reaction justifies the application of animal models as gold standard. The integration of *in vitro* test procedures into standardized test strategies often fails by the availability of validated, reliable and reproducible methods. According to that there is no standardized test procedure, which resembles the three-dimensional tissue structures during a foreign body reaction and is suited for longer contact phases in between blood components and biomaterials. *In vitro* tests are often more cost and time efficient and show as well by applying human cells a high transferability on human beings. Additionally the preference to *in vitro* test procedures addresses the “reduction” aspect of the Russel and Burch’s (1959) 3R-principles “replacement, reduction and refinement” to a conscious and reasoned use of animal models in science. Aim of this research project was the development of human *in vitro* model systems, which resemble the contact to blood components and the reaction of the surrounding soft tissue following implantation of a biomaterial. Reference materials, whose tissue integration after implantation in animals or humans is described, were applied for the developed model systems as validation criterion. The accumulation of cells and the synthesis of extracellular matrix in the surrounding wound are relevant sub processes during a foreign body reaction. In an indirect cell-based model system the influence of the cell-mediated conditioning initiated by the material-induced and macrophage-mediated liberation of soluble mediators was shown on both sub processes the aligned migration of fibroblasts as well as the remodeling of a three-dimensional tissue model. Additionally, the cytokine secretion profile by material-

adherent macrophages was characterized under different test conditions such as the contamination with LPS, the surface treatment with human plasma and the presence of IL-4. The following comparative statistical modelling allowed a transformation of the generated complex multi-factorial data matrix to a biomaterial ranking. The here developed test procedure was suitable for the validation of *in vitro* test conditions as well as the evaluation of the reference biomaterials. Last, by the combination of different cells and matrix structures the complex three-dimensional structure of the extracellular matrix in a wound was biomimetically reconstructed. Those novel three-dimensional foreign body models enabled the testing of biomaterials over longer test phases and might be applied in following studies to investigate dynamic processes. Summarizing in this research project three different test strategies were developed, which (I) enable the evaluation of sub processes, (II) support the identification of reliable test conditions and (III) biomimetically reconstruct a wound tissue. Most important is, that a three-dimensional tissue model was biomimetically developed, which showed a reliable discriminatory capacity in between biomaterials.

1. Einleitung

Die Anwendung von Biomaterialien in der regenerativen Medizin reicht bis in die Antike zurück. Bereits ägyptische Mumien trugen zum Ersatz von Körperstrukturen künstliche Augen oder künstliche Zähne. Die alten Chinesen und Indianer setzten Wachse, Kleber und Gewebe zur Reparatur sowie zur Unterstützung von Körperfunktionen ein. (4) Heute finden Biomaterialien Anwendung, deren Entwicklung sich an den jeweiligen Anforderungen am Einsatzort orientiert. Im Hinblick auf eine zunehmend alternde Gesellschaft gewinnen Biomaterialien mit optimalen chemischen, strukturellen und physikalischen Eigenschaften an Relevanz. Erforderlich für die Anwendung von Biomaterialien im Menschen ist deren Bewertung hinsichtlich ihrer Sicherheit und ihrer Performanz - ein wichtiger Aspekt hierfür ist die induzierte Immunantwort bei Kontakt zu Blutkomponenten und die Gewebsintegration nach Implantation (5). Ergänzend zu *in vivo* Tiermodellen könnten *in vitro* Testmethoden, die den induzierten Kontakt zu Blutkomponenten sowie die Reaktion des umliegenden Bindegewebes nach Implantation eines Biomaterials abbilden, die gezielte Identifizierung potentieller Biomaterialkandidaten mit einer verbesserten Gewebsintegration erleichtern. Bisher gibt es jedoch kein standardisiertes *in vitro* Modellsystem, das die komplexe dreidimensionale Struktur der Wundumgebung zwischen Implantat und dem umliegenden Gewebe biomimetisch abbildet.

1.1 Marktentwicklung und klinische Relevanz

In der Prävention, der Diagnostik und der Behandlung von Erkrankungen dienen Medizinprodukte durch Erfassung, Stabilisierung oder Anpassung von Körperstrukturen und -funktionen der Verbesserung der Gesundheit. Diese Produkte unterstützen die Gesundheit auf physikalische Art und Weise. Neue Ansätze wie humane Gewebe, die sich mit Verfahren des Tissue Engineerings herstellen lassen, oder theranostische Produkte, die sensorische und aktorische Funktionen integrieren, greifen zusätzlich pharmakologisch, immunologisch oder metabolisch in die Funktion des Körpers ein. (6) Für diese zunehmend funktionalisierten und komplexen Medizinprodukte gibt es einen stark wachsenden Zukunftsmarkt: mit einer Wachstumsprognose von 6 % im Folgejahr 2017 lag der Umsatz von Medizinprodukten im Jahr 2016 weltweit bei 330 Milliarden Dollar. Die Märkte in Europa (104 Milliarden Dollar im Jahr 2016) sowie in den USA (126 Milliarden Dollar im Jahr 2016) wiesen hierbei den

stärksten Umsatz auf. Weiterhin ist für das folgende Jahrzehnt eine Steigerung des Umsatzes auf 500 Milliarden Dollar prognostiziert. (7) Hierbei verdeutlicht der zunehmende Einsatz von Medizinprodukten ebenfalls die Notwendigkeit, bestimmte Sicherheits- und Effizienzaspekte wie beispielsweise eine adäquate Zellantwort zu erfüllen.

1.2 Biokompatibilität von Medizinprodukten

In einem spezifischen Anwendungsbereich eine angemessene Zell- und Gewebsantwort hervorzurufen stellte das erstmals 1970 definierte Kriterium zur Charakterisierung der Biokompatibilität von Biomaterialien dar. Nach dieser sicherheitsorientierten Definition erfüllen Bio-materialien, die bei Implantation in einen Organismus die Ausbildung einer dünnen, dichten und nicht adhärenen Kollagenkapsel auslösen, die Charakteristika einer angemessenen Gewebsantwort. (8) Unterschiedliche Materialeigenschaften können die Reaktion des Gewebes auf einen Fremdkörper beeinflussen: (I) die chemische Zusammensetzung sowie (II) die strukturellen, (III) mechanischen und (IV) elektrischen Eigenschaften. (9) Die Exposition (I) der chemischen Struktur eines Biomaterials beeinflusst über die hydrophilen, hydrophoben, anionischen und kationischen funktionellen Gruppen die biologische Antwort. Zum Beispiel erleichtern hydrophile Oberflächen die Adhäsion von Fibroblasten (10) und ermöglichen deren Ausrichtung und Proliferation entlang hydrophiler Strukturen (11). Im Gegensatz hierzu adhäreren aktivierte Monozyten stärker an hydrophobe Oberflächen (12). Im Vergleich hierzu konnten Brodbeck *et al.* (2002) *in vivo* nachweisen, dass anionische und hydrophile Oberflächen die Apoptose verstärken und zu einer geringeren Zelladhäsion und Zellfusion führen (13). Ergänzend zeigen humane materialadhärente Monozyten auf hydrophilen und anionischen Oberflächen eine antientzündliche Reaktion in Form einer erhöhten Interleukin-10-Expression und einer niedrigeren Interleukin-8-Expression (14).

Hinsichtlich (II) der Struktur eines Biomaterials ist die Partikelgröße wichtig. Beispielsweise führt die Implantation von Partikeln mit einem Durchmesser von 1,5 Millimetern (mm) zu einer geringeren Fremdkörperreaktion und Fibrose als Partikel mit kleinerem Durchmesser (0,5 mm). Klinisch relevant ist dies beispielsweise bei der Anwendung von pharmakologischen Kapselsystemen. So konnten im Vergleich zu konventionellen inselzellbeladenen Alginatkapseln (0,5 mm) Kapseln mit einem Durchmesser von 1,5 mm eine fünffach längere (bis zu 180 Tage) Stabilisierung der Blutglukose erzielen. (15) Zusätzlich zur Morphologie

bestimmt die Topographie des Biomaterials wie dessen Mikro- oder Nanostruktur die Reaktion auf den Fremdkörper. Nach myokardialer Implantation stimulieren Poren mit einem Durchmesser von 30 bis 40 Mikrometern (μm) zum Beispiel die Angiogenese und führen zu einer geringeren Fibrose (16). Für poröses Polytetrafluorethylen (PTFE) mit einem Durchmesser von $4,4 \mu\text{m}$ konnte im Vergleich zu herkömmlichen PTFE ebenfalls eine geringere Kapselbildung beobachtet werden. *In vitro* jedoch induzieren poröse Strukturen eine höhere akute Interleukin-1 β -Freisetzung durch humane Monozyten. (17) Ebenfalls ließ sich auf rauen Oberflächen eine Sekretion proentzündlicher Zytokine wie Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α durch Makrophagen nachweisen (18). Erstaunlicherweise führen mikrostrukturierte aber nicht nanostrukturierte Oberflächen zu einer proentzündlichen Reaktion von Makrophagen (19). Dennoch stimulieren nanostrukturierte Oberflächen eine gesteigerte Adhäsion von Makrophagen und eine Zunahme deren phagozytotischer Aktivität (20). Des Weiteren unterstützen Polykaprolaktonnanofasern nach Implantation in die Haut eine Wundheilungsreaktion, wohingegen Hydrogele aus Kollagen und Chitosan die Ausbildung einer geschlossenen Epidermis verhindern. (21) Zusätzlich konnte die Ausrichtung von nanostrukturierten Fasern als Einflussfaktor bestimmt werden. Parallel ausgerichtete Nanofasern weisen im Vergleich zu zufällig angeordneten Fasern eine geringere Fremdkörperreaktion und eine verbesserte Integration auf. (22)

Ergänzend zur chemischen Zusammensetzung und der Struktur beeinflussen (III) die mechanischen Eigenschaften eines Biomaterials den Ausgang einer Zellantwort. Steife Biomaterialien können die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (23) unterstützen, dagegen verbessern flexible Mikroelektroden die Integration in die Großhirnrinde (24). Zusätzlich erzielten elastische Implantate eine verminderte Differenzierung von interstitiellen Zellen zu Myofibroblasten (25) sowie eine Abnahme der Entzündungsantwort von Makrophagen (26) und führen somit zu einer verminderten Fremdkörperreaktion. Neben der Elastizität verbessern poröse Knochenersatzmaterialien die Vitalität von humanen mesenchymalen Stammzellen (27) und die Integration nach Implantation (28).

Letztendlich können ebenfalls (IV) elektrische Eigenschaften wie die Oberflächenenergie die Reaktion auf einen Fremdkörper beeinflussen. Beispielsweise bilden hydroxylierte Titanoberflächen mit einer hohen Oberflächenenergie eine osteogene Mikroumgebung *in vitro* (29).

Das breite Spektrum an Einflussgrößen verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel mehrerer Faktoren während der Reaktion des Gewebes auf einen Fremdkörper. Die biologische und chemische Reaktionsträgheit bildet eine wichtige Voraussetzung für Biomaterialien ohne schädigende Wirkung. (9) Über Sicherheitsaspekte hinaus tragen aktuelle Entwicklungen von Medizinprodukten mit komplexen Funktionen zu steigenden Anforderungen an Medizinprodukte bei. So kann bereits die Ausbildung einer dünnen fibrösen Kapsel, die erstmals als Bewertungskriterium für ein biokompatibles Medizinprodukt galt, bereits den Kontakt zum Zielgewebe oder zu spezifischen Gewebekomponenten verhindern. In dieser Konsequenz beeinträchtigt die geringe Permeabilität des Bindegewebes beispielsweise die Funktionsweise eines Sensors und dessen Erfassung von Analyten wie Glukose (30). Des Weiteren kann die Bindegewebskapsel das Freisetzungsprofil bestimmter Medikamente aus Wirkstoffapplikationssystemen verändern (31). Darüber hinaus ist für eine energieeffiziente, adäquate Stimulationstherapie mit Elektrodensystemen der direkte Kontakt zum Zielgewebe wie Nerven- oder Herzmuskelgewebe Voraussetzung. Die begrenzte Energiespeicherkapazität von Schrittmachersystemen erfordert wiederum in regelmäßigen Abständen den Austausch von Batterien. Die Ausbildung von Narbengewebe um ein solches Auswechsellsystem erschwert nach Implantation dessen Ersatz. (32, 33) In der plastischen, rekonstruktiven Medizin ist die Formstabilität von Implantaten wie beispielsweise von Brustimplantaten eine Voraussetzung für die Akzeptanz des Implantats durch den Empfänger - die Kontraktion des umliegenden Bindegewebes führt jedoch oft zum Explantieren intakter Implantate (34). Die beschriebenen wachsenden Anforderungen an die Gewebsantwort bei lokaler Implantation führten über die ursprünglichen Sicherheitsaspekte hinaus zur Erweiterung der Bewertungskriterien für die Biokompatibilität von Medizinprodukten. Zusätzlich erfolgt heute die Bewertung über Parameter wie die Funktionalität, die Effizienz und die Performanz des Endprodukts. (35, 36) Nach heutiger Auffassung beschreibt die Biokompatibilität die Eigenschaft eines Biomaterials, eine gewünschte Funktion im Hinblick auf eine medizinische Therapie zu erfüllen, ohne unerwünschte lokale oder systemische Nebenwirkungen aufzuweisen oder den Erfolg der Therapie zu vermindern. Im Idealfall sollte das Medizinprodukt eine Zell- und Gewebsantwort hervorrufen, die den Therapieerfolg optimal unterstützt. (9)

1.3 Reaktion des menschlichen Körper auf einen Fremdkörper

Alle Verfahren zum Einbringen eines Medizinprodukts in den menschlichen Körper wie die Injektion, der minimalinvasive Einsatz oder die chirurgische Implantation gehen mit der Verletzung von umliegendem, funktionellem Gewebe einher. Hierbei lösen alle klinisch eingesetzten Biomaterialien nachteilige Gewebsreaktionen wie die Thrombose, die Entzündung oder die Fibrose aus (37-39). Die materialinduzierte Reaktion des Körpers ist hierbei ein komplexer Vorgang, dessen Verlauf einer hohen Dynamik unterliegt (siehe Abbildung 1-1).

1.3.1 Verlauf der Gewebsantwort auf einen Fremdkörper

Unabhängig vom Gewebe oder dem Organ in das ein Biomaterial eingebracht wird, tritt durch die herbeigeführte Verletzung der Kontakt zu Blut ein und löst eine lokale Entzündungsantwort aus.

Dynamische Proteinadsorption an die Biomaterialoberflächen

Innerhalb von Sekunden adsorbieren Proteine aus der interstitiellen Flüssigkeit sowie dem Blutplasma an der Materialoberfläche. Unterschiede in der Mobilität, der Affinität und der Konzentration zwischen den Proteinen führen zu Austauschprozessen auf der Oberfläche und bestimmen die Hierarchie und zeitabhängige Dynamik der Proteinadsorption (Vroman Effekt). (40) Beispielsweise weisen Albumine und Globuline eine hohe Mobilität auf und binden rasch an der Biomaterialoberfläche, werden jedoch im zeitlichen Verlauf durch weniger mobile Proteine mit höherer Affinität wie Fibronectin oder Blutgerinnungsfaktor XII ersetzt (41). Hierbei entsteht die adhäsive Bindung der Proteine durch hydrophobe, hydrophile und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Materialoberfläche und den Aminosäureendgruppen (42). Die durch Verletzung (extrinsisch) und Materialkontakt (intrinsisch) hervorgerufene Aktivierung der Blutgerinnung führt zur Einbettung des Biomaterials in eine erste provisorische Proteinhülle bestehend aus einem Fibrinnetz (39). Im Zusammenspiel mit Adhäsionsproteinen wie Fibronectin stellt die dreidimensionale Fibrinnetzstruktur eine Nische für die Migration und die Adhäsion von Zellen dar. Außerdem bilden zahlreiche biochemische Komponenten im Blutplasma wie Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein Milieu für Proliferations- und Syntheseprozesse sowie den Aufbau von chemischen Gradienten. (35)

1. Einleitung

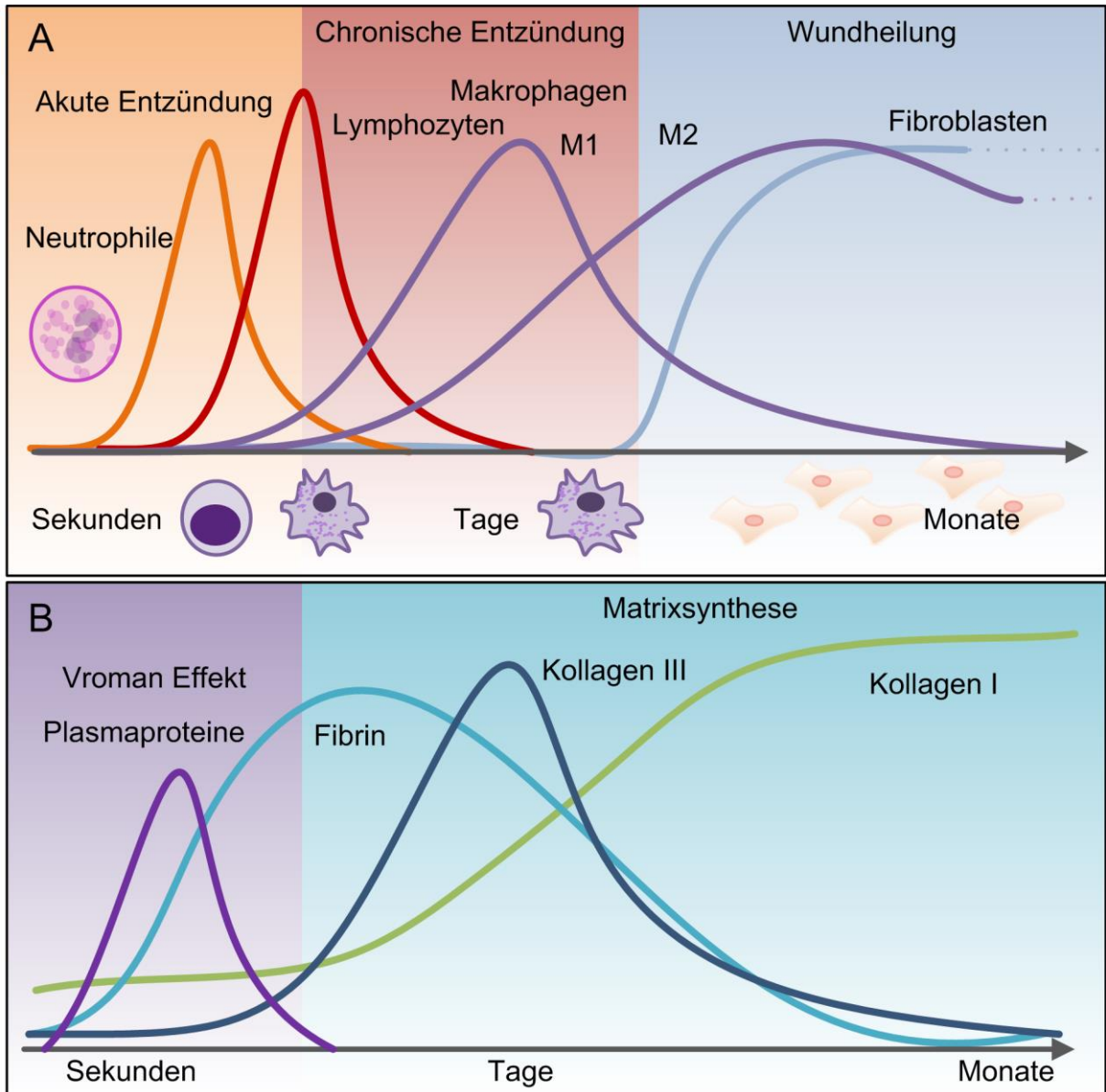


Abbildung 1-1 Die Reaktion des Körpers auf einen Fremdkörper ist ein dynamischer Vorgang. Hierbei unterliegen sowohl (A) die zellulären als auch (B) die extrazellulären Komponenten zeitlichen Veränderungen. Die Abbildung orientiert sich an Bryers (2012), Witte (1997) und Gasik (2017) (43-45).

Gerichtete Wanderung von Leukozyten entlang von chemischen Gradienten

Das Einbringen eines Medizinprodukts führt zur Verletzung des umliegenden Gewebes. Hierdurch werden Alarmsignale in den extrazellulären Raum abgegeben. Diese Signale lösen in einer mehrtägigen akut entzündlichen „Homing“-Phase die Migration von Leukozyten aus dem vaskulären Gefäßsystem zum lokalen Gewebsdefekt aus und führen zur Anreicherung von Entzündungszellen. (46, 47)

Dieser mehrstufige Prozess besteht aus dem Anbinden und dem Rollen der Leukozyten am Endothel, der festen Adhäsion und schlussendlich dem Durchtritt aus dem Gefäßsystem in das Gewebe (Diapedese). Hierbei wird der gerichtete Austritt von Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das umliegende Gewebe durch Adhäsionsmoleküle auf der Leukozyten- und Endotheloberfläche gesteuert. (48) Außerdem erleichtert die Freisetzung von Enzymen wie beispielsweise Matrixmetalloproteinasen die Permeabilisierung der Basalmembran (49). Die gerichtete Wanderung der Leukozyten durch das Gewebe zum Entzündungsherd wird durch steigende chemische Gradienten (Chemotaxis) koordiniert (50). Der Aufbau chemischer Gradienten im extrazellulären Raum erfolgt durch eine Vielzahl exogener und endogener Komponenten. Zum Beispiel führt die Verletzung von Gewebe zur Freisetzung von intrazellulären Proteinen wie Hitzeschockproteinen und Metaboliten wie Adenosintriphosphat (ATP) sowie zur Entstehung von Spaltprodukten der extrazellulären Matrix. Weitere zelluläre Sekretionsprodukte wie Histamin oder materialabhängige Aktivierungsprodukte wie Komplementfaktoren können ebenfalls chemotaktisch wirken. (51, 52)

Akute Entzündungsantwort auf die Verletzung und den implantierten Fremdkörper

In der akuten Entzündungsantwort dienen die zelluläre Sekretion von Enzymen und der Einschluss von Fremdmaterial durch Phagozytose der Wundreinigung. Hierfür reichern sich innerhalb weniger Stunden nach Implantation kurzlebige neutrophile Granulozyten am Entzündungsort an. Diese werden in den nachfolgenden Tagen durch langlebige Makrophagen ersetzt. (43) An die Materialoberfläche gebundene Opsonine wie Immunglobulin G (IgG) und komplementaktiviertes Fragment C3b bilden eine Brücke zwischen dem Biomaterial und der Zelle und ermöglichen über Integrinoberflächenrezeptoren die Erkennung und die Anhaftung der Phagozyten (53). Weitere Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin unterstützen über Tripeptidsequenzen aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparagin (RGD-Domänen) das Anhaften von Zellen an die Biomaterialoberfläche (35). Im Anschluss an die Erkennungs- und Anhaftungsphase erfolgt idealerweise der zelluläre Einschluss des Fremdmaterials. Weist das makromolekulare Biomaterial keine extrazelluläre Abbaubarkeit auf, scheitert der zelluläre Einschluss des Fremdkörpers am Größenverhältnis zwischen der Zelle und der Materialoberfläche. Jedoch ab einer Partikelgröße von fünf bis zehn Mikrometern (μm) kann Fremdmaterial nicht durch eine einzelne Zelle umschlossen werden. (54) Als Alternativreaktion findet eine stark sekretorische Phase (frustrierte

Phagozytose) statt. Die „frustrierten“ Phagozyten setzen degradierende Produkte wie Proteasen, Kollagenasen und Elastasen sowie reaktive Sauerstoffspezies in den extrazellulären Raum frei, die das umliegende Gewebe und das Biomaterial strukturell angreifen (53).

Chronische Entzündungsantwort

Innerhalb von einer Woche löst die chronische Entzündungsphase normalerweise die akute Entzündungsphase ab. In dieser Phase findet die Stabilisierung des Wunddefekts durch die Versorgung mit neuen Blutgefäßen und den Neuaufbau von Bindegewebe statt. Während der chronischen Entzündungsphase unterscheidet sich der Bindegewebsaufbau im Vergleich zur Fremdkörperreaktion durch die zelluläre Zusammensetzung. Zusätzlich wird die chronische Entzündungsphase neben Monozyten und Makrophagen durch Lymphozyten am Entzündungsort bestimmt. (35) Hierbei sind Lymphozyten als zelluläre Komponenten des erworbenen Immunsystems unter anderem an der Antikörpersynthese (Plasmazellen) und der Entwicklung einer Hypersensitivitätsreaktion beteiligt. Die Bildung von Anti-Polymer-Antikörpern ist beispielsweise nach Implantation von Silikon beschrieben (55). Bei dieser systemischen, erworbenen Immunantwort auf ein Implantat präsentieren möglicherweise Makrophagen die entsprechenden Antigene wie kontaktinduzierte veränderte Proteindomänen oder internalisierte Materialabbauprodukte den T-Lymphozyten des erworbenen Immunsystems. Des Weiteren beeinflusst das Verhältnis an T-Helferzellen vom Typ 1 (T_{H1}) zu den T-Helferzellen vom Typ 2 (T_{H2}) in der chronischen Entzündungsphase die spätere Progression der Wundheilung. Hierbei moduliert die Freisetzung von profibrotischen Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) durch T_{H2} -Lymphozyten sowie antifibrotische Zytokine wie Interferon γ ($IFN\gamma$) und Interleukin-12 (IL-12) durch T_{H1} -Lymphozyten den Bindegewebsaufbau. (49) Ein Zusammenhang zwischen der Anreicherung von fibrösem Bindegewebe und der Verschiebung des Zytokinprofils durch T_{H2} -Lymphozyten (IL-4, IL-13) konnte bereits bei Schistosomiasis festgestellt werden (56). Zusätzlich unterstützen Makrophagen durch Sekretion zahlreicher Produkte wie Proteasen, Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies, Komplementkomponenten, Koagulationsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Säuren sowohl die chronische Entzündungsantwort als auch die anschließende Wundheilungsphase (35).

Wundheilungsreaktion auf einen Fremdkörper

Die Fremdkörperreaktion ist eine normale Wundheilungsreaktion des Körpers auf einen Fremdkörper. Ein Heilungsprozess kann zwei unterschiedliche Endpunkte der Reaktion des Gewebes herbeiführen: (I) die Regeneration, das heißt der Ersatz des Wundgewebes durch die Wiederherstellung von funktionellem Gewebe oder (II) die Fibroplasie beziehungsweise Fibrose, das heißt den Ersatz des Wundgewebes durch fibröses Bindegewebe. Für den Ausgang eines solchen Heilungsprozesses entscheidend sind die Proliferationsfähigkeit der gewebsspezifischen Zellen, der Schweregrad der Verletzung beziehungsweise die Größe des entstandenen Defekts sowie der damit einhergehende Erhalt der extrazellulären Matrix. (35)

Die Regenerationskapazität eines Organs wird durch Zellen, (I) die kontinuierlich proliferieren oder (II) die nach Induktion erneut proliferieren können, bestimmt. Das hämatopoetische System oder Epithelien wie die Haut oder der Darm unterliegen einem kontinuierlichen hohen regenerativen Umsatz, der durch Stammzellen getragen wird. Andere Gewebe wie die Leber oder der Pankreas besitzen unter nativen Bedingungen keine Proliferationskapazität, können jedoch beispielsweise durch die Verletzung des Gewebes erneut zur Regeneration des funktionellen Gewebes angeregt werden. Im Gegensatz dazu weisen Gewebe, die hauptsächlich aus permanenten Zellen wie Nerven- oder Herzmuskelzellen bestehen, eine geringe regenerative Kapazität auf und neigen bei Verletzung zur Umstrukturierung und zur Ausbildung von Bindegewebe. (57)

Die Regeneration eines Gewebes aus permanent proliferierenden oder induziert proliferationsfähigen Zellen ist jedoch ebenfalls fakultativ und von der Proliferation und der Aktivität von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten abhängig. Der Erhalt der nativen Matrixstruktur bildet hierbei eine tragende Rolle. Bleibt die Struktur der nativen Matrix bei einer Verletzung erhalten, so ist die Wahrscheinlichkeit einer Regeneration hoch, kommt es jedoch zur Zerstörung der extrazellulären Matrix trägt dies zu Entstehung von fibrösem Bindegewebe bei. (35)

Neben lokalen Faktoren wie der Quantität und der Qualität des jeweiligen Gewebes, tragen systemische Faktoren wie Veränderungen des Stoffwechsels oder der jeweilige Lebensstil sowie die medikamentöse Behandlung von Erkrankungen zur individuellen Biokompatibilität des Medizinprodukts bei (58-60).

1.3.2 Zelluläre Mediatoren der Fremdkörperreaktion

Die Mikroumgebung in einer Wunde wird sensorisch durch Zellen erfasst und kann zu einer Anpassung deren Aktivität und Funktionalität sowie des molekularen Phänotyps führen. Neben den Zelltypen, die in unmittelbarem Kontakt mit dem Biomaterial stehen, modulieren ebenfalls die Anzahl sowie das Verhältnis der verschiedenen Zelltypen die Reaktion auf einen Fremdkörper. In der chronischen Phase der Fremdkörperreaktion verbleiben Makrophagen auf der Materialoberfläche und modulieren die Reaktion von Fibroblasten im umliegenden Bindegewebe (46).

Zentrale Funktion von Makrophagen

Makrophagen bilden eine heterogene Zellpopulation, die sowohl für die Gewebshomöostase wichtig ist, als auch eine erste Abwehr des angeborenen Immunsystems gegen Pathogene bildet (61). Mit einem Anteil von 10 bis 15 Prozent der Gesamtzellzahl kommen Makrophagen in allen humanen Geweben vor. Im Darm, der Lunge oder der Haut gehen die gewebständigen Makrophagen aus Monozyten hervor. Die aus einer myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark gebildeten Monozyten zirkulieren etwa ein bis zwei Tage im Blut und bilden hier ein Reservoir an Vorläuferzellen. Im Menschen bestehen etwa 10 Prozent der Leukozyten und in der Maus zwei bis vier Prozent aus Monozyten. Nach Einwanderung in ein Gewebe differenzieren die Monozyten zu gewebständigen Makrophagen (siehe Abbildung 1-2). Nach Eintritt einer Entzündung kann durch Infiltration weiterer Monozyten aus dem Blutkreislaufsystem die Zahl der Makrophagen im Gewebe stark ansteigen. In anderen Geweben wie dem zentralen Nervensystem oder der Leber entsteht während der Embryogenese aus einer Keimbahnvorläuferzelle ein gewebeeigener Makrophagenpool. Entsprechend dem Ort, an dem sich die gewebständigen Makrophagen befinden, werden die Makrophagen unterschiedlich bezeichnet - Beispiele hierfür sind: Osteoklasten im Knochen, alveolare Makrophagen in der Lunge, Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem, Histiozyten im Bindegewebe, Kupfferzellen in der Leber und Langerhanszellen in der Haut. (62) In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion von Makrophagen zu einer reduzierten Entzündung sowie einer reduzierten Fibrose führt und die Wundheilung beeinträchtigt (63, 64). Der Übergang von der Entzündungsphase in die Wundheilungsphase ist durch eine Polarisierung des Zellphänotyps von kurzlebigen, proentzündlichen Makrophagen des Typs M1 zu langlebigen, wundheilenden Makrophagen des Typs M2 gekennzeichnet. (52, 65)

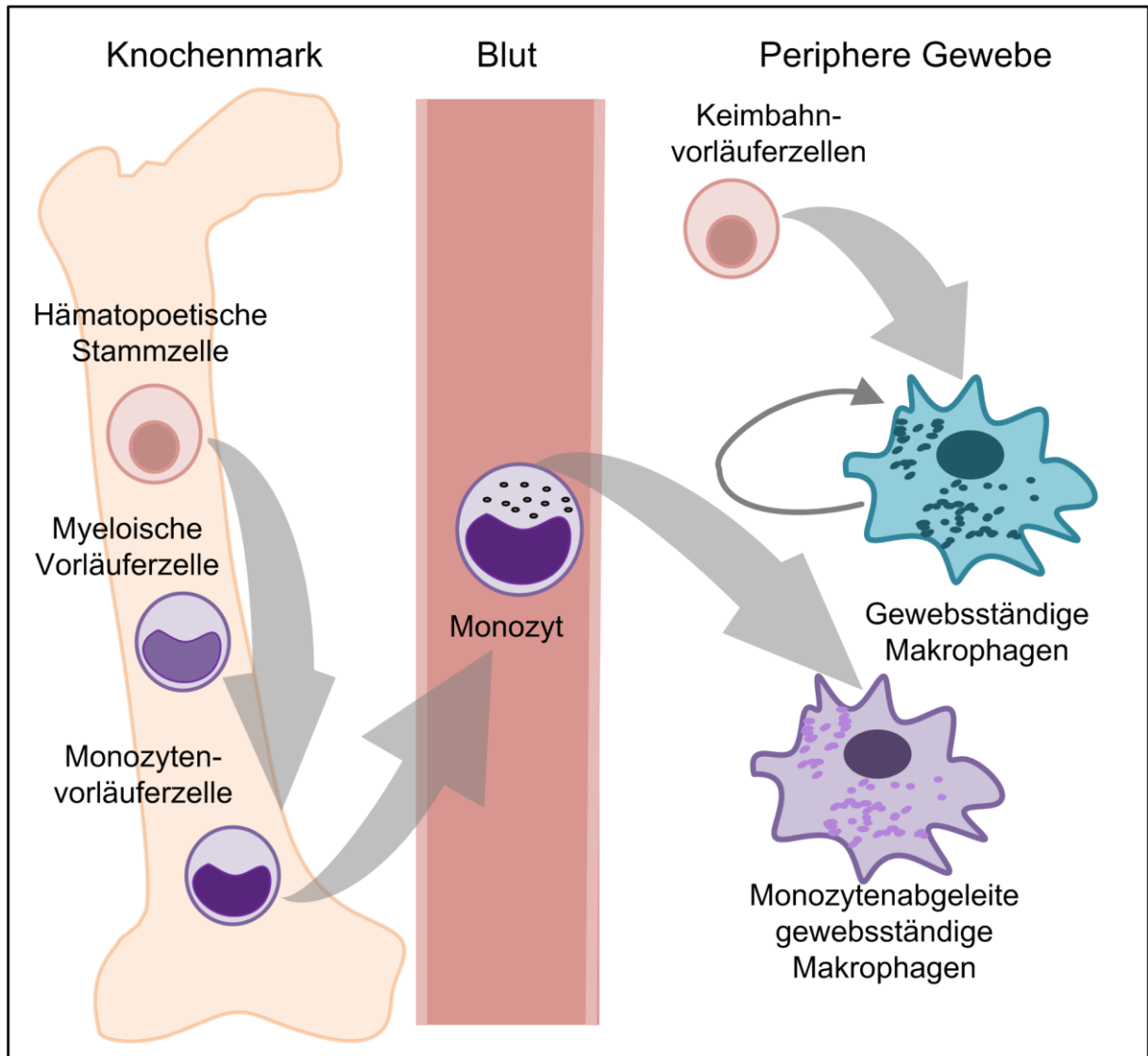


Abbildung 1-2 Die Bildung von Makrophagen erfolgt aus einer Keimbahnvorläuferzelle oder aus Monozyten nach Diapedese in das Gewebe.

Die Abbildung ist modifiziert, nach Italiani und Boraschi (2014) dargestellt (62).

Diese langlebigen Makrophagen können die gesamte Lebensdauer auf der Materialoberfläche eines Implantats verbleiben, in direktem Kontakt zum Biomaterial das umliegende Bindegewebe stimulieren und die Aktivität von Fibroblasten im umliegenden Gewebe modifizieren. Das funktionelle Profil der Makrophagen wiederum ist abhängig von dem Milieu aus löslichen Mediatoren, das die Monozyten bei Einwanderung in das Wundgewebe vorfinden und die Differenzierung zu Makrophagen beeinflusst.

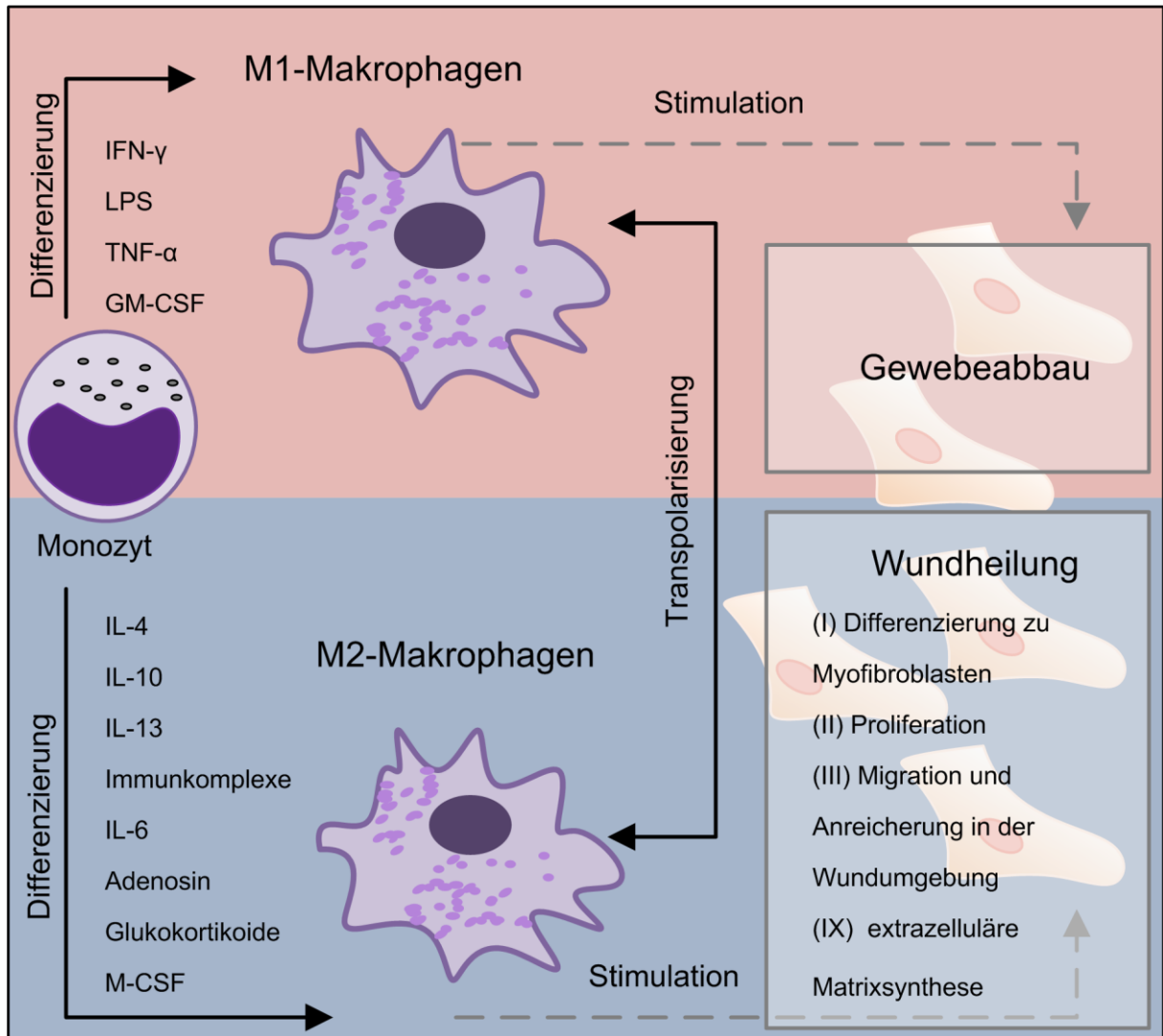


Abbildung 1-3 Im Zusammenspiel bilden die Makrophagen und die Fibroblasten während der chronischen Fremdkörperreaktion die zentralen Zellen.

Makrophagen differenzieren unter dem Einfluss zahlreicher Faktoren zu bestimmten Phänotypen, die wiederum die Bindegewebsbalance beeinflussen. Die Zeichnung ist eigenständig erstellt und orientiert sich an Martinez (2014), Franz (2011) und Kendall (2014) (52, 66, 67).

Die lokale Mikroumgebung aus löslichen Mediatoren wie beispielsweise materialadhärenten, pathogenassoziierten molekularen Mustern (aus dem Englischen pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) oder Zytokinen bestimmt die Polarisierung der Makrophagen. (68) Makrophagen in einem proentzündlichen Milieu aus IFN- γ , Lipopolysacchariden (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Granulozyten und Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (englisch granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) differenzieren zu M1-Makrophagen (siehe Abbildung 1-3). Beispielsweise führt die unzureichende Reinigung zum Verbleib von LPS auf der Materialoberfläche und arretiert

Makrophagen im proentzündlichen Status (69). Die Polarisierung zu M2-Makrophagen kann wiederum durch IL-4, IL-10, IL-13, Immunkomplexe, Interleukin-6 (IL-6), Adenosin, Glukokortikoide und Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (englisch macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) ausgelöst werden. (66) Im Gegensatz dazu können Granulozyten oder T_{H2}-Lymphozyten in der Wunde IL-4 freisetzen und die Entstehung von M2-Makrophagen unterstützen (70, 71).

Hierbei verändert die Polarisierung der Makrophagen deren Effektorfunktionen wie die Expression von Oberflächenrezeptoren und die Zytokinsynthese. Während M1-Makrophagen in der akut entzündlichen Phase die Implantatoberfläche durch die Freisetzung von Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies angreifen, bilden M2-Makrophagen in der Wundheilungsphase Zellschichten auf der Biomaterialoberfläche. Die in ihrer Morphologie Epithelzellen ähnelnden, epitheloiden Makrophagen weisen eine starke Verzahnung auf und können unter Membranzusammenschluss mit mehreren Zellen zu Gigantenzellen (aus dem Englischen „giant cells“) fusionieren. (35) Für den zellulären Membranzusammenschluss von mehreren Makrophagen sind die Wechselwirkung mit materialadsorbierten Proteinen wie Komplement C3, Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin, die anschließende Adhäsion über Integrine und das Leukozytenoberflächenantigen CD47 (englisch cluster of differentiation, CD) sowie die interzellulären Wechselwirkungen notwendig. (72) Anschließend bilden die fusionierten Makrophagen die erste adhärente zelluläre Schicht auf dem Biomaterial und isolieren den Fremdkörper vom Körperinneren. Diese chronische Ablagerung von M2-Makrophagen auf der Implantatoberfläche stimuliert das umliegende Bindegewebe zur Ausbildung einer dichten fibrösen Kapsel. (52, 65)

Zentrale Funktion von Fibroblasten

Die native Gewebsarchitektur wird durch den Aufbau von extrazellulären Strukturen zur Abgrenzung wie beispielsweise der *Lamina propria* oder der strukturierten Anordnung unterschiedlicher Zelltypen sowie zur Stabilisierung von funktionellem Gewebe geschaffen. In diesem Bindegewebe bilden Fibroblasten Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, Adhäsionsproteine und die füllende Grundsubstanz des interstitiellen Raums wie beispielsweise Glykosaminoglykane. Neben dem Matrixaufbau sind Fibroblasten an der Synthese von matrixabbauenden Enzymen (Matrixmetalloproteinasen) und deren Inhibitoren (englisch tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) beteiligt und tragen somit zusätzlich zu der

Umstrukturierung, der Regeneration und dem Abbau der extrazellulären Matrix bei. (67) Der Erhalt der natürlichen Gewebsarchitektur ist ein balancierter Prozess aus extrazellulärer Matrixsynthese und Matrixabbau (Anabolismus versus Katabolismus). (73) Bei einer chronischen Gewebsverletzung kann dieses Gleichgewicht zur pathologischen Anreicherung von extrazellulärer Matrix verschoben werden (74, 75). Die in die Wundumgebung eingewanderten Entzündungszellen wie Makrophagen induzieren ein reiches chemisches Milieu aus parakrinen Signalen wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, das wiederum von den Fibroblasten erfasst wird. Die Aktivierung von Fibroblasten durch diese Vielzahl an Signalen beeinflusst (I) deren Differenzierung zu Myofibroblasten, die Anreicherung von Fibroblasten in der Wundumgebung durch (II) die Proliferation sowie (III) die Einwanderung aus dem umliegenden Gewebe in das Defektareal und (IV) die vermehrte extrazelluläre Matrixsynthese. (67)

1.3.3 Lösliche Mediatoren der Fremdkörperreaktion

Lösliche Mediatoren können lokal den Aktivierungsstatus von gewebsständigen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen oder Makrophagen sowie rekrutierten Entzündungszellen regulieren und systemisch Effekte wie Fieber, Hypertonie oder die Synthese von Proteinen der Akutphase auslösen. Die löslichen Mediatoren während einer Entzündungsreaktion lassen sich in vier Kategorien einteilen:

- (I) aus zellulären Phospholipiden gebildete entzündliche Metabolite wie beispielsweise Derivate der Arachidonsäure - Prostaglandin, Leukotrien, Lipoxin
- (II) die drei Protease-Substrat-Kaskaden - Koagulation, Komplement und Kinin
- (III) reaktive Sauerstoffspezies wie Stickoxid, Superoxid und Wasserstoffperoxid
- (IV) zellfreigesetzte Zytokine

Jegliche Immunreaktionen werden durch Zytokine moduliert und koordiniert - dies verdeutlicht ihre zentrale Schlüsselfunktion. (76) Die Zytokine sind potente Signalproteine (~ 6 bis 80 Kilodalton, kDa), die von Entzündungszellen gebildet werden oder auf Zellen des Immunsystems wirken (77). Aus dem Zusammenspiel zahlreicher Zytokine ergibt sich ein Netz aus kumulierenden, synergistischen und antagonistischen Signalen, welche die Funktion

unterschiedlicher Zielzellen regulieren. (67) Zytokine können von zahlreichen Zellen gebildet werden, so auch von den zentralen Zellen während einer Fremdkörperreaktion - den Fibroblasten und den Makrophagen. Beispielsweise tragen Fibroblasten durch die Synthese von transformierendem Wachstumsfaktor- $\beta 1$ (englisch transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), Interleukin- 1β (IL- 1β) und IL-6 zum Erhalt des Entzündungsmilieus bei (76, 78). Im Gegenzug wirken Zytokine, die von Makrophagen freigesetzt werden, wie der Fibroblastenwachstumsfaktor (englisch fibroblast growth factor, FGF), blutplättchenfreigesetzter Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF), TGF- $\beta 1$, IL- 1β , IL-6 und TNF- α auf Fibroblasten. (67) Hieraus ergeben sich komplexe Regelkreise aus Signalen, die auf die Zelle selbst (autokrin) oder die auf benachbarte Zellen wirken (parakrin) (siehe Abbildung 1-4). Als molekulare Mediatoren können Zytokine basierend auf ihrer Wirkung in Entzündungsprozessen klassifiziert werden: (I) Mediatoren, die eine starke Entzündungsreaktion stimulieren oder regulieren, (II) Chemokine, die chemische Gradienten zur gerichteten Einwanderung von Zellen zum Entzündungsort aufbauen sowie (III) Proliferation und Matrixsynthese stimulierende Wachstumsfaktoren. Die Mechanismen der materialinduzierten Zytokinfreisetzung und die Zusammensetzung des Zytokinmilieus während der Fremdkörperreaktion sind bisher nicht beschrieben (79). Studien aus angrenzenden Forschungsgebieten, insbesondere von fibrotischen Erkrankungen, verweisen jedoch auf die Beteiligung bestimmter Zytokine an einer biomaterialvermittelten Fremdkörperreaktion.

(I) In der frühen Wundheilungsphase kann ein stark proentzündliches Milieu aus Zytokinen wie IL- 1β , IL-6 und TNF- α ein Auslöser für die spätere Entwicklung einer Fibrose sein.

Die Aktivierung von Entzündungszellen sowie Fibroblasten durch das proentzündliche IL- 1β moduliert das Entzündungsmilieu und trägt hierdurch zum Erhalt einer Entzündung bei. Zum Beispiel kann IL- 1β in Fibroblasten die Freisetzung weiterer proentzündlicher Zytokine wie M-CSF, IL-6, Interleukin-8 (IL-8) und Makrophagen chemotaktisches Protein-1 (englisch macrophage chemotactic protein-1, MCP-1) stimulieren (80-83). Auf zellulärer Ebene jedoch weist IL- 1β durch die Stimulation der Kollagenbildung und der TIMP-Synthese sowie durch die Stimulation der Proliferation eine einzigartig bifunktionelle Beteiligung sowohl am Gewebsabbau als auch an der Gewebsreparatur auf (84, 85).

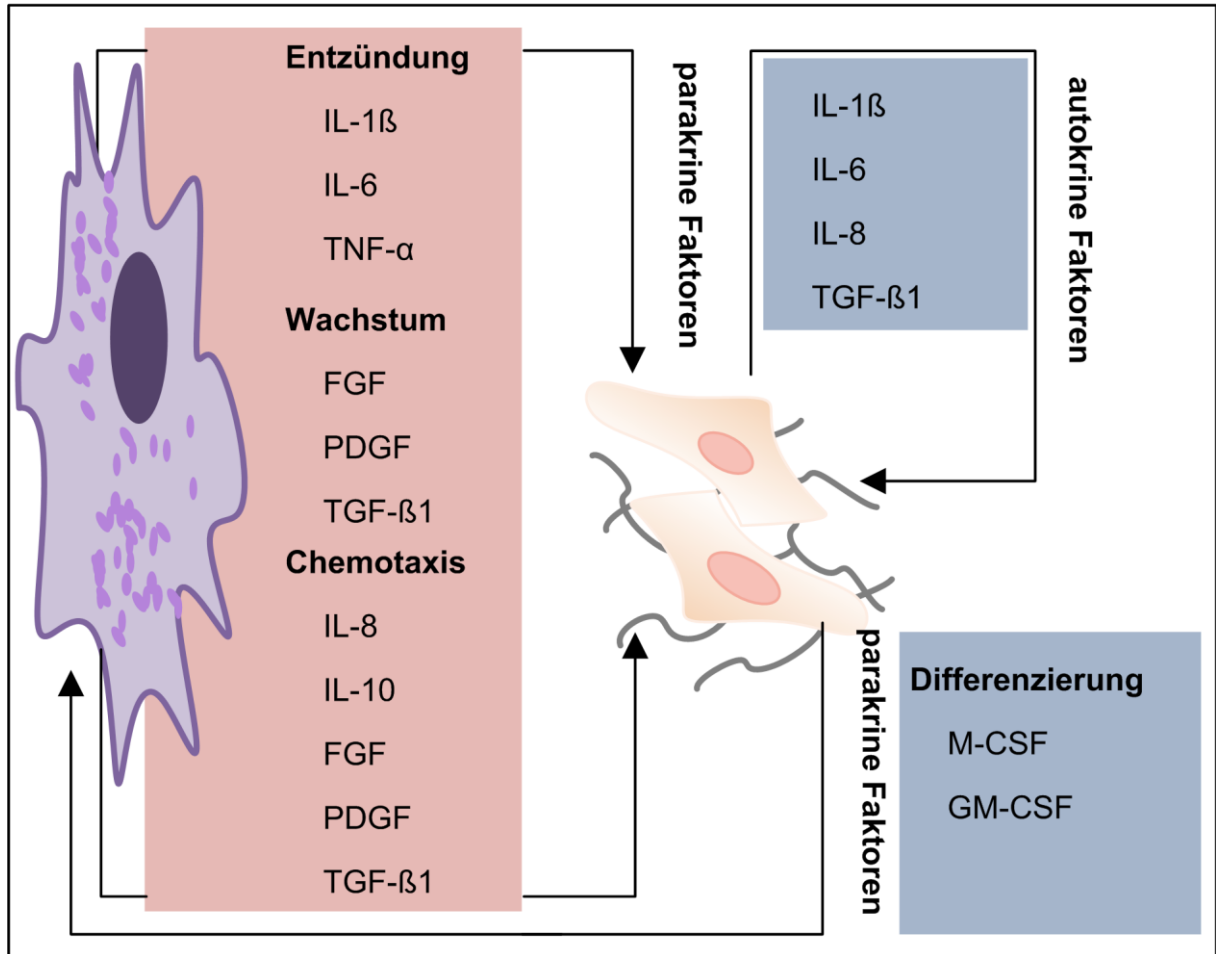


Abbildung 1-4 Makrophagen und Fibroblasten setzen Zytokine in ihre Mikroumgebung frei, die auf parakrine und autokrine Wirkungsweise eine zelluläre Reaktion auslösen.

Abbildung orientiert sich an Kendall (2014) (67).

In systemischen Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die exogene Zufuhr sowie die Überexpression von IL-1 β mit einer starken Entzündung, der Umstrukturierung von Gewebe und der Entwicklung einer Fibrose einhergeht (86, 87). Das hochpotente IL-1 β wird unter nativen Zell- und Gewebszuständen jedoch nicht in den extrazellulären Raum freigesetzt. Zusätzlich erfordert die Freisetzung aktivierende Signale wie PAMPs oder weitere Alarmsignale wie extrazelluläres ATP. Die Zusammenlagerung des Multiproteinkomplexes Inflammasom, die hieraus resultierende Aktivierung der Caspase-1 und die anschließende proteolytische Spaltung eines IL-1 β -Propeptids bilden eine stark regulierte Aktivierungskaskade. (88, 89)

Die profibrotische Wirkung von IL-1 β wird durch weitere proentzündliche Zytokine wie IL-6 ergänzt. Als proentzündliches Schlüsselzytokin stimuliert IL-6 auf lokaler Ebene beispiels-

weise die Proliferation von Fibroblasten (90). Die peritoneale Infusion sowie die wiederholte Injektion anderer proentzündlicher Stimulatoren wie zellfreie *Staphylococcus epidermidis* Überstände induzieren eine IL-6-vermittelte Fibrose (91, 92). Des Weiteren korrelieren beim Menschen mit systemischer Sklerose oder nach Infektion mit der Trematode *Opisthorchis viverrini* die IL-6-Plasmaspiegel mit dem fibrotischen Verlauf der Erkrankung (93, 94).

Die proentzündlichen Effekte von IL-1 β und IL-6 werden auf systemischer Ebene durch TNF- α ergänzt, jedoch weist TNF- α lokal eine antifibrotische Wirkung auf. TNF- α hemmt auf zellulärer Ebene die Kollagensynthese und verstärkt den Matrixabbau (95, 96). Die molekularen Mechanismen dieser lokalen Effekte sind bereits aufgeklärt: durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (englisch nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und die Bildung des Aktivatorprotein-1 (AP-1; JunB und cJun) hemmt TNF- α die Kollagenexpression (97-99). Kontrovers verweisen systemische Modelle auf profibrotische Effekte von TNF- α (100). Die Überlagerung lokaler antifibrotischer Effekte durch systemische fibrotische Effekte ist durch Distler und Kollegen (2008) dargestellt (101). Klinische Fallstudien unterstützen diese Hypothese durch den erfolgreichen Einsatz von TNF- α -Antagonisten zur Behandlung von systemischer Sklerose (102).

(II) Chemokine bauen chemische Gradienten zur gerichteten Einwanderung von Zellen zum Entzündungsort auf und wirken hierdurch indirekt auf die Entstehung einer Fibrose.

Die Freisetzung des Chemokins IL-8 durch beispielsweise Fibroblasten oder Makrophagen generiert einen chemischen Gradienten, der die Infiltration weiterer Entzündungszellen und Fibroblasten zum Gewebsdefekt ermöglicht (103-105). Zum Beispiel konnte bei Patienten mit Leberfibrose ein Zusammenhang zwischen IL-8 und der Ansammlung von Makrophagen gezeigt werden (106).

Für das Zytokin IL-10 ist ebenfalls eine chemotaktische Rekrutierung von Fibrozyten beschrieben (107). Als anti-entzündliches Zytokin kann IL-10 jedoch zu einer verminderten Kollagenanreicherung im Gewebe führen (108). Knockoutmodelle bestätigen anhand einer zunehmenden Entzündung und Fibrose die anti-entzündliche Wirkung von IL-10 (109, 110). Kontroverserweise zeigte ein IL-10-Hyperexpressionsmodell eine Rekrutierung von Fibrozyten und die Aktivierung von M2-Makrophagen – beides wichtige Teilprozesse, die zu einer Fibrose beitragen (107). Diese kontroverse Studienlage verdeutlicht die Multifunktional-

lität von IL-10 und eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit des IL-10-vermittelten Effekts auf die Bindegewebsbalance.

(III) Die Effekte der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, PDGF und FGF beschränken sich nicht nur auf Proliferations- und Matrixsyntheseprozesse, sondern leisten ebenfalls als Chemokine einen Betrag zur Entwicklung einer Fibrose.

Insbesondere der Wachstumsfaktor TGF- β 1 erfüllt eine multifunktionale Schlüsselfunktion bei der Verschiebung des Gewebsgleichgewichts zu einer höheren Kollagenablagerung. TGF- β wirkt auf die Proliferation von Zellen und die Matrixsynthese, rekrutiert weitere Immunzellen sowie Fibroblasten und induziert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (67, 111-113). Die Anwendung von TGF- β -Rezeptorantagonisten und der Knockout des TGF- β -Rezeptors verdeutlichen die zentrale Rolle von TGF- β 1 bei der Entstehung einer Fibrose (114, 115). Zum Beispiel weisen tranilastbeschichtete (TGF- β -Inhibitor) Silikonimplantate nach Implantation eine verminderte Kapseldicke, Kollagendichte und Zellzahl auf (116). Neben der Beteiligung an fremdkörperinduzierter Fibrose trägt TGF- β 1 zu anderen chronischen Entzündungsprozessen wie der Leberfibrose bei (117). Zusätzlich wird die Wirkung des hochpotenten Wachstumsfaktors TGF- β 1 durch die Wachstumsfaktoren PDGF und FGF ergänzt. Hierbei induziert der durch Makrophagen gebildete Wachstumsfaktor PDGF die Chemotaxis von Fibroblasten (118-121) sowie eine verstärkte Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese (78). Neben seiner Funktion als Fibroblastenwachstumsfaktor führt ein Gradient aus FGF zur Chemotaxis von Fibroblasten (111, 122). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von FGF in der bronchoalveolären Flüssigkeit mit der Ansammlung von Leukozyten korreliert (123).

Zusammengefasst weisen zahlreiche Zytokine einen Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose auf. Das Milieu aus proentzündlichen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wird von den Zellen in unmittelbarer Umgebung erfasst und in eine Reaktion des Bindegewebes übersetzt - erst das Zusammenspiel dieser zahlreichen Faktoren bestimmt die Quantität und Qualität der fibrösen Bindegewebskapsel.

1.3.4 Zusammensetzung der fibrösen Bindegewebskapsel um einen Fremdkörper

Bereits drei bis fünf Tage nach Implantation eines Biomaterials wird die erste provisorische Fibrinmatrix durch Granulationsgewebe aus Kollagen ersetzt. Innerhalb der ersten vier bis fünf Wochen führt die erhöhte Zellzahl in der Wundumgebung sowie eine gesteigerte Syntheseaktivität pro Zelle zu einer erhöhten Kollagensynthese. (124) Bei größeren Gewebsdefekten bildet sich im weiteren Verlauf um das Implantat eine fibröse Kapsel. (125) Natives Bindegewebe besteht zu circa 70 bis 80 Prozent des Trockengewichts aus Kollagen. Hierbei bilden Kollagen Typ I (80 bis 90 Prozent) zusammen mit Kollagen Typ III (10 bis 20 Prozent) den Hauptbestandteil des gesamten Kollagens (126, 127). Die Zugfestigkeit und stabilisierende Funktion von Kollagen im Bindegewebe wird durch seine Triplehelixstruktur gewährleistet. Diese entsteht durch posttranslationale Hydroxylierung von Prolin- und Lysinendgruppen, der Glykolysierung sowie der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen drei Propeptiden. Nach Sekretion wird die Triplehelix durch Peptidasen zu reifen Monomeren prozessiert, die sich zu Mikrofibrillen (67 nm) aus fünf Kollagenmonomeren zusammen lagern und diese wiederum bilden multimikrofibrilläre Kollagenbündel. Inter- und intramikrofibrilläre Verbindungen zwischen den Aldehydendgruppen der Aminosäuren Lysin und Hydroxylysin verleihen den Kollagenbündeln ihre Zugkraft. (75) Während einer Wundheilungsphase verschiebt sich das Kollagengleichgewicht zu einer verstärkten Bildung von Kollagen III. Hierbei kann die Neusynthese an Prokollagen III während der ersten Tage nach Gewebsverletzung auf bis zu 40 Prozent des gesamten Prokollagens ansteigen (128). Bei einem Heilungsvorgang stabilisiert Kollagen des Typs III durch den stärkeren Aufbau von Querverbindungen den Gewebsdefekt (129). Im Vergleich zu Kollagen I, bestehend aus dicken Fasern mit einer hohen Zugkraft, bildet Kollagen III dünnere, elastische Fibrillen und beeinflusst hierdurch die physikalischen Eigenschaften des Wundgewebes (130). In Narbengewebe wird die native zufällige Orientierung dicker Fasern durch dünne Kollagenfasern paralleler Ausrichtung abgelöst (131). Dagegen geht eine fehlende Kollagen-III-Bildung mit der Differenzierung zu Myofibroblasten und einer starken Wundkontraktion einher (132). Bei Regeneration der nativen Gewebsstrukturen wird im Verlauf der Wundheilung das dünne Kollagen-III-Netz durch dickere, organisierte Kollagen-I-Bündel ersetzt. Hierdurch gewinnt

das Bindegewebe erneut an Stärke, erreicht jedoch maximal 80 Prozent der ursprünglichen Zugkraft. (124, 133)

1.4 Präklinische Testverfahren zur Erfassung von Medizinprodukten

Die Komplexität der Reaktion des menschlichen Körpers auf das Einbringen eines Fremdkörpers in das Gewebe verdeutlicht einerseits die Notwendigkeit geeigneter präklinischer Testverfahren zur Abschätzung von Aspekten wie Sicherheit, Funktionalität, Effizienz und Performanz des Implantats. Andererseits führt sie zur Herausforderung geeigneter Testverfahren, die diese Komplexität abbilden, zu entwickeln.

Internationale Standards zur Biokompatibilitätstestung

Die Bewertung von Medizinprodukten, deren einzelnen Bestandteilen und deren Kombinationen richtet sich nach internationalen Standards. Hierbei fasst die Richtlinie ISO 10993 Vorgehensweisen zur Testung der Biokompatibilität zusammen (134). Die Auswahl geeigneter Testmethoden und der Testumfang orientieren sich an der klinischen Anwendung des Produkts und der vorgesehenen Kontaktdauer sowie der potentiellen Gefahr, die von einem Material ausgeht. Insbesondere wird zwischen haut- oder schleimhautexponierten Medizinprodukten, extern kommunizierenden und mit dem Körper verbundenen Medizinprodukten oder in Kontakt zu Blut, Knochen oder anderen Geweben implantierten Medizinprodukten unterschieden. Entsprechend ihrer vorgesehenen Kontaktdauer mit dem menschlichen Körper erfolgen die Einstufung in kurzzeitig (bis zu einem Tag), langfristig (bis zu 30 Tage) und dauerhaft (ab 30 Tagen) eingesetzte Medizinprodukte. Dabei fallen die Testverfahren zur Validierung der Biokompatibilität in zwei Kategorien: (I) indirekte Charakterisierungsverfahren unter Verwendung von Extrakten und Testung deren Effekt auf lebende Zellen oder Organismen und (II) direkte Testverfahren von Medizinprodukten oder deren Komponenten unter *in vitro* oder *in vivo* Bedingungen. Wie bereits beschrieben richtet sich die Anwendung der Biomaterialien in den entsprechenden Testverfahren nach dem jeweilig vorgesehenen Einsatz. Hierfür müssen die Materialien in Form, Dichte, Härte, Oberflächenbeschaffenheit, Sterilisierung und Handhabung für die Biokompatibilitätstestung übereinstimmen. (35, 36)

Standardisierte in vivo Testmethoden

Für die Testung einer lokalen Gewebsantwort muss ein Biomaterial oder ein Medizinprodukt chirurgisch an den zukünftigen Anwendungsort in den Körper eingebracht werden (35). Im Anschluss an eine mehrwöchige Testphase kann die Integration des Fremdkörpers in das Gewebe untersucht werden. Zur Charakterisierung der Qualität und Quantität der Gewebeeintegration nach Implantation des Biomaterials dienen histologische Verfahren. Diese schließen Bewertungskriterien wie die Neubildung von fibrösem, entzündlichem, nekrotischem, granulomatösem und vaskulärem Gewebe sowie die Ablagerung von Materialbestandteilen und die Bildung von Fetteinlagerungen ein. [ISO 10993-6:2007, Teil 6] (134)

Aktuelle Entwicklungen von in vitro Modellsystemen

In vitro Testsysteme finden insbesondere zur Identifizierung neuer Biomaterialkandidaten sowie als Teil mehrstufiger Testprozesse zur Bewertung von Medizinprodukten Anwendung (35). Hierbei erfassen *in vitro* Testmethoden unterschiedliche zelluläre Endpunkte wie beispielsweise die Morphologie, die Adhäsion, die Integrität, die Proliferation oder die Sekretion von Produkten. Die Integration von *in vitro* Testverfahren in standardisierte Testprozesse richtet sich nach der Verfügbarkeit validierter, verlässlicher und reproduzierbarer Methoden. Jedoch hält die regulatorische Akzeptanz von alternativen Testmethoden nicht den aktuellen Entwicklungen stand. Ein Beispiel für einen anerkannten Test ist der auf humanem Vollblut basierende, zur Testung von Pyrogenen (fieberinduzierenden Substanzen) angewandte Monozytenaktivierungstest (MAT) (79). Jedoch können anerkannte, standardisierte *in vitro* Zellkultursysteme keine dreidimensionalen Gewebsstrukturen abbilden und eignen sich nur für kurze Testphasen. Daher stellen nach wie vor Tiermodelle für die Erfassung lokaler Effekte nach Implantation eines Biomaterials in ein Gewebe den aktuellen Goldstandard dar [ISO 10993-6:2007, Teil 6] (134). Nichts desto trotz sollte die Notwendigkeit einer *in vivo* Studie begründet und keine Alternativmethode vorhanden sein. (5) Darüber hinaus adressiert die Präferenz von *in vitro* vor *in vivo* Testverfahren die Aspekte des 3R-Prinzips (Russell und Burch, 1959) „Replacement, Reduction, Refinement“ (deutsch Ersatz, Reduzierung, Verbesserung) zu einem bewussten und sorgfältigen Einsatz von Tiermodellen in der Wissenschaft (135). Beispielsweise können Vorstudien für akute Effekte zwischen Blutkomponenten und Biomaterial wie die Aktivierung der Koagulation sowie des Komplementsystems oder die Adhäsion von Zellen an der Materialoberfläche anhand von

in vitro Testungen stattfinden [ISO 10993-4:2002, Teil 4] (134). Hierbei kann die Testung *in vitro* kosten- und zeiteffizienter sein und durch die Anwendung humaner Zellen eine höhere Übertragbarkeit aufweisen. In den *in vitro* Testverfahren finden Zelltypen Anwendung, die bei Implantation in das Zielgewebe mit dem Biomaterial in Kontakt treten. Zur Untersuchung der Fremdkörperreaktion werden primäre Monozyten oder Makrophagen aus dem Blut (14, 17) oder Zelllinien wie U937 (human) (12), RAW 264.7 (murin) (18) oder P388D1 (murin) (20) eingesetzt. Testverfahren mit Zelllinien weisen im Vergleich zu primären Zellen eine hohe Zellverfügbarkeit, eine hohe Reproduzierbarkeit und damit einhergehend eine niedrigere Anzahl an Replikationszyklen auf. Die aus Tumorgewebe gewonnenen, immortalisierten Zelllinien sind jedoch im Hinblick auf Veränderungen ihres Phänotyps im Vergleich zu nativen Zellen oft unzureichend charakterisiert. (35) Zusätzlich erfordern international anerkannte *in vitro* Methoden oft eine Anpassung der Testbedingungen für die Testung von Medizinprodukten so auch der bereits beschriebene Monozytenaktivierungstest (MAT) (79). Im Hinblick auf die steigende Potenz von Pyrogenen durch Oberflächenexposition (136) erfordert das Standardverfahren unter Anwendung von Eluaten die Anpassung des Vorgehens zu einer direkten oberflächenexponierten Testung von Medizinprodukten (137, 138). Jedoch adressiert der MAT ausschließlich Aspekte der Oberflächenkontamination mit Pyrogen und lässt Biokompatibilitätsaspekte außen vor. Ein relativ neues Forschungsfeld zur Erfassung der Biokompatibilität ist die Charakterisierung des Freisetzungspfils von Entzündungsmediatoren wie den Zytokinen (79). Die Kapazität von Materialien, die Zytokinantwort zu modulieren, konnte bereits mit der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und primären Monozyten gezeigt werden (18, 139). Jedoch sind die Mechanismen der oberflächeninduzierten Freisetzung von Zytokinen und ihr Einfluss auf die Biokompatibilität bisher geringfügig verstanden (79). Insgesamt zeichnet sich in der Biomaterialforschung eine Verschiebung des analytischen Profils von zellulären Analysen (Zelltyp, Zellzahl) zu molekularen Nachweisen wie Signalproteinen (Zytokine, matrix-modulierende Proteine) ab (140, 141).

1.5 Motivation und Gesamtziel der Doktorarbeit

Aktuelle zellbasierte, standardisierte *in vitro* Modellsysteme umfassen keine Verfahren zur Testung von (I) dreidimensionalen Bindegewebsprozessen wie sie bei einer Fremdkörperreaktion eintreten und (II) decken längere Kontaktphasen zwischen Blutkomponenten und Biomaterialien nicht ab [ISO 10993-4, Teil 4] (134). Die Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen, die den Kontakt zu Blutkomponenten sowie die Reaktion des umliegenden Bindegewebes bei lokaler Implantation abbilden können, ist von großer Bedeutung für die Identifizierung potentieller Biomaterialkandidaten, die idealerweise eine verbesserte Gewebsintegration aufweisen.

Ziel dieser Doktorarbeit war:

- (I) Die Entwicklung eines indirekten, zellbasierten Modellsystems zur Untersuchung von Teilprozessen wie (a) die Chemotaxis und (b) der Bindegewebsumbau während einer biomaterialinduzierten Fremdkörperreaktion.
- (II) Die Bewertung unterschiedlicher physiologischer Testbedingungen hinsichtlich ihrer Korrelation zu literaturbasierten Biomaterialbewertungen. Hierzu sollte ein multifaktorielles, zytokinbasiertes Biokompatibilitätstestverfahren aufgebaut und ein vergleichendes Bewertungsmodell für Biomaterialien eingeführt werden.
- (III) Der Aufbau eines direkten, dreidimensionalen Kokultursystems, das die Matrixumgebung einer Wunde abbildet, Makrophagen und Fibroblasten integriert und einen Aufschluss über fibrotische Prozesse liefert.

Die notwendige Validierung der entwickelten Testverfahren erfolgte anhand von Referenzmaterialien, deren Gewebsreaktion nach Implantation in präklinischen und klinischen Studien beschrieben ist.

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Materialien in tabellarischer Form zusammengefasst. Der anschließende Methodenteil dient der Nachvollziehbarkeit und der Reproduzierbarkeit der entwickelten Methoden sowie der durchgeführten Analysen.

2.1 Verwendete Materialien

In tabellarischer Form fasst das nachfolgende Kapitel die verwendeten Gewebe und Zellen, alle biologischen und chemischen Stoffe, die angewandten Referenzmaterialien, alle Geräte, die Software und die Konsummaterialien, die Zell- und Gewebeskulturbedien sowie die verwendeten Zellkulturpuffer und alle Komponenten der analytischen Nachweisverfahren zusammen.

2.1.1 Gewebe- und Zellmaterial

Der Aufbau von zellbasierten Modellsystemen erforderte die Isolierung von Zellen und die Gewinnung von biologischen Matrixstrukturen aus Gewebe. In Tabelle 2-1 ist das in dieser Arbeit verwendete Gewebe- und Zellmaterial dargestellt.

Tabelle 2-1 Gewebe- und Zellmaterial.

| Produkt | Bezeichnung | Produktnummer | Bereitsteller (Ort, Land) |
|--------------------|--|---------------|---|
| Blutplasma (human) | gefrorenes Frischplasma, (+) Citrat-Phosphat- Dextrose, Blutgruppe 0 | | Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (München, Deutschland) |
| | Spender 1 | 80215162074 | |
| | Spender 2 | 80215134830 | |
| | Spender 3 | 80215385447 | |
| | Spender 4 | 80215385419 | |
| | Spender 5 | 80215353230 | |
| | Spender 6 | 80215420650 | |
| | Spender 7 | 80215162067 | |
| | Spender 8 | 80215661868 | |
| | Spender 9 | 80215590764 | |
| | Spender 10 | 80214120563 | |

2. Material und Methoden

| Produkt | Bezeichnung | Produktnummer | Bereitsteller (Ort, Land) |
|--|---|--|---|
| Fibroblastenzelllinie HFF-1 (human) | Pool aus zwei Spendern (Neugeborene, Vorhaut, gesund) | SCRC-1041 (LOT 63229645) | ATCC (Wesel, Deutschland) |
| Kollagen Typ I | 7,2 mg per ml in 0,1 % Essigsäure, aus Rattenschwänzen von männlichen Anzuchtratten (8 - 10 Wochen alt) | - | Eigenherstellung (Würzburg, Deutschland) |
| Leukozytenkonzentrat | anonymisiert, (+) EDTA | - | Universitätsklinikum Würzburg (Würzburg, Deutschland) |
| Vollblut (human) | gekühlte Blutkonserve, (+) Citrat-Phosphat- Dextrose, Blutgruppe A oder B Spender 1 A Rh+ K+ Spender 2 A Rh+ K+ Spender 3 A Rh+ K+ Spender 4 A Rh+ K+ Spender 5 B Rh+ K- Spender 6 A Rh+ K- Spender 7 B Rh+ K+ Spender 8 B Rh+ K+ Spender 9 B Rh+ K- Spender 10 A Rh+ K- | 80214363564 80214330356 80215272191 80215315058 80215104648 80215104993 80215691842 80215202489 80215206202 80216203014 | Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (München, Deutschland) |
| Vorhäute (human) | Spender 1 (4 Jahre, gesund, Chemotaxis) Spender 2 (4 Jahre, gesund, Fibrinstandardisierung) Spender 3 (6 Jahre, gesund, Fibrinstandardisierung) Spender 4 (7 Monate, gesund, Fibrinstandardisie- rung) Spender 5 (13 Jahre, gesund, Westernblotkontrolle) | | lokale Arztpraxis (Würzburg, Deutschland) |

2.1.2 Biologische und chemische Stoffe

Die in dieser Arbeit angewandten biologischen und chemischen Stoffe sind in Tabelle 2-2 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2-2 Biologische und chemische Stoffe.

| Stoffbezeichnung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|--|----------------------|---|
| Aceton | 5025.5 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Acrylamid Rotiphoresegel 30 (37,5:1) | 3029.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat | CN78.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) | 440140 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | 9592 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Anilinalkohol | 1.013.800.500 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Anilinblau Orange G | 1.014.400.500 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Aquatex | 1.08562.0050 | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Avidin-Meerrettichperoxidase (HRP)- Konjugat | A-7419 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazolin- 6-Sulphon)-Säure (ABTS) | A3219 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Azokarmin | 1.014.701.000 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Beta-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) | 4227.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Bovines Serumalbumin | 8076.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Bromphenolblau | A512.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Calciumchlorid (CaCl_2) | C7902-5006 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Chloralhydrat | C8338 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Chloroform | 372978 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Chondroitinsulfat | C4384 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Citronensäuremonohydrat | C1909 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) - Fluoromount | 004959-52 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | 8418 | Sigma Aldrich (München Deutschland) |
| Dispase | 17105-041 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in Pulverform | SH30003.03 | GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) |
| Entellan | 107960 | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Esenserum | D9663 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Stoffbezeichnung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|---|----------------------|---|
| Essigsäure | 6755.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Essigsaurer Alkohol | 1.137.401.000 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Ethanol | 9065.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | E5134 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Fetales Kälberserum | 41F1142K | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Fettstift | S002 | Agilent (Waldbronn, Deutschland) |
| Ficoll (1,078 g/ml) | 17-5442-03 | GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) |
| „Fragment crystallizable region“ | 130-059-901 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Rezeptor (FcR) Blockierungslösung | | |
| Glutaraldehydlösung (25 %) | G5882 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Glycerol | M6145 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Glycin | 3908.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Hämatoxylin | H9627 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Hyaluronidase | H4272 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Hydroxyethylpiperazinethan- sulfonsäure (HEPES) | H4034 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Interleukin-4 (IL-4) | 200-04 | Peptotech (New Jersey, US) |
| Isopropanol | 6752.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Kaliumbicarbonat (KHCO ₃) | P748 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Kaninchenserum | R9133 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Kollagenase | 001745401 | Serva (Heidelberg, Deutschland) |
| L-Ascorbinsäure-2-Phosphat | A8960 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 | L4391 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| magnesium- und calciumangereicherte phosphatgepufferte Saline (PBS+) | D8662 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Makrophagen koloniestimulierender Faktor (M-CSF) | 300-25 | Peptotech (New Jersey, US) |
| Mausserum | M5905 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Methanol | 34860-2.5C-R | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Milchpulver | T145.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumazid | K305.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumchlorid (NaCl) | HN00.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumcitrat | 5110.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumdesoxycholat | D6750 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Natriumdodecylsulfat | CN30.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Stoffbezeichnung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|---|----------------------|---|
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | HN01.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumhydroxid (NaOH) | 1.091.371.000 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Natriumiodat | S4007 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Natriumpyruvat | 11360-039 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Paraffin | 587 | Sasol (Hamburg, Deutschland) |
| Paraformaldehyd | P087.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Penicillin-Streptomycin | 15140122 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| phosphatgepufferte Saline (PBS) | D8537 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Phosphorwolframsäure | 1.032.400.500 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Propanol | 6752.5 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Proteaseinhibitor | 4693132001 | Roche (Mannheim, Deutschland) |
| Proteinmarker Pro Sieve Quad Color | 830537 | Biozyme (Hessisch Oldendorf, Deutschland) |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | 2367.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Thrombin | T4393 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Tranexamsäure (t-AMCA) | PZN0523241 | Pfizer Pharma (Münster, Deutschland) |
| Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) | 100-21 | Peprtech (New Jersey, US) |
| Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) | T6066 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl) | 9090.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Triton-X | T8787 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Trypsin-EDTA | 59418C | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Tween | P1379 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Salzsäure (HCl) | 4625.1 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | CN30.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Versen | 15040-033 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | 8070.2 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Weigerts' Hämatoxylin | 10225B/A.00500 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| Xylol | 9713.3 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ziegen Serum | D9663 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |

2.1.3 Referenzbiomaterialien

Der Aufbau der entwickelten Modellsysteme erfolgte auf den Oberflächen von Referenzbiomaterialien. Die Auswahl verwendeter Referenzmaterialien ist in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Tabelle 2-3 Biomaterialien.

| Biomaterial | Beschreibung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|---------------------------------|---|---------------------------|--|
| Glas | Natronkalkglasschälchen (Ø 34 mm; Ø 30 mm) | 455701 | Brand (Wertheim, Deutschland) |
| Polyethylen (PE) | Zellkulturschale (Ø 35 mm) | 81156 | Ibidi (München, Deutschland) |
| Polytetrafluorethylen (PTFE) | Rhenolase MK I-grau Oberflächenbeschichtung auf Glasschälchen (Ø 34 mm; Ø 30 mm) | V11A003620, V11A003695 | Rhenotherm GmbH (Kempen, Deutschland) |
| Silikon | Kammersystem aus Biopor® AB clearX Silikon (17 x 53 mm ²) | 28400M | Dreve Otoplastik GmbH (Unna, Deutschland) |
| Titan | Oberflächenbeschichtung auf Glasschälchen (Ø 34 mm; Ø 30 mm) | - | Tobias Schmitz (Würzburg, Deutschland) |

2.1.4 Geräte, Software und Konsummaterialien

Die Vorbereitung und die Durchführung der Testverfahren, die anschließende Analyse und die nachfolgende Auswertung der Daten erforderten verschiedene Geräte, Software und Konsummaterialien. Die angewandten Materialien sind wie folgt dargestellt: Tabelle 2-4 zeigt die verwendeten Geräte; in Tabelle 2-5 sind die verwendeten Softwares dargestellt und in Tabelle 2-6 sind die Konsummaterialien zusammengefasst.

Tabelle 2-4 Geräte.

| Gerät | Spezifizierung | Hersteller (Ort, Land) |
|--------------|-----------------------|---|
| Analysewaage | PFB 1200-2 | Kern und Sohn (München, Deutschland) |
| Autoklav | DX-Bench-top | Systec GmbH (Wettenberg, Deutschland) |
| Autoklav | Technoclav | Biomedis Laborservice (Gießen, Deutschland) |
| Blockstation | EG 150H | Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Gerät | Spezifizierung | Hersteller (Ort, Land) |
|--------------------------------|--------------------------------|---|
| Blottkammer | - | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| Durchflusszytometer | FACS Calibur | BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) |
| Einbettautomat | Microm STP 120 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Elektrophoresekammer | - | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| Fluoreszenzmikroskop | BZ-9000 | Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland) |
| Hochvakuumbeschichtungsanlage | EM ACE600 | Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland) |
| Inkubator | BDD 6220 | Thermo Electron Led (Langenselbold, Deutschland) |
| Kamera | Digital IXUS 80 IS | Canon (Krefeld, Deutschland) |
| Konfokalmikroskopieplattform | TCS SP8 | Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland) |
| Kritischpunkttrockner | BALTEK CPD030 | Baltic Präparation (Niesgau, Deutschland) |
| Mikroplattenmessgerät | Tecan Reader Infinite® M200 | Tecan (Crailsheim, Deutschland) |
| Mikrotom | SM2010R | Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland) |
| Mikrozentrifuge | SD 220VAC | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Netzteil | EV243 | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| Netzteil | EV202 | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| pH-Messgerät | Five Easy FE20 | Mettler-Toledo (Columbus, Ohio, USA) |
| Rasterelektronenmikroskop | Supra 25 | Zeiss (Oberkochen, Deutschland) |
| Thermozykler | - | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Ultraschallbad | 8510 | EMERSON Technologies (Dietzenbach, Deutschland) |
| Ultraschallgerät | Branson SSE-1 | VWR (Darmstadt, Deutschland) |
| Vortexer | Vortex Genie2G- 560E | Scientific Industries (New York, USA) |
| Westernblot Bildaufnahmesystem | FluoroChem Q | ProteinSimple (San Jose, Kalifornien, USA) |
| Zentrifuge | Heraeus Multifuge X1R | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

Tabelle 2-5 Software.

| Software | Version | Anwendung | Hersteller (Ort, Land) |
|-----------------------------------|----------------|----------------------|---|
| CellQuestPro | 6.0 | Durchflusszytometrie | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Chemotaxis- und Migrationstool | - | Chemotaxisanalyse | Ibidi GmbH (München, Deutschland) |
| EndNote | X7.7.1 | Literaturverwaltung | Thomson Reuters (New York, USA) |

2. Material und Methoden

| Software | Version | Anwendung | Hersteller (Ort, Land) |
|---|----------------|----------------------------------|--|
| FCAP Array Software | 3.0 | Zytometrische Partikelanalyse | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FlowJo | 10 | Zytometrische Analyse | Tree Star (Ashland, USA) |
| Fluorochem Q | V3.2.2.2.0 | Aufnahme der Westernblots | ProteinSimple (San Jose, Kalifornien, USA) |
| ImageJ | 1.49m | Bildbearbeitung | Nationalinstitut für Gesundheit (Bethesda, USA) |
| Keyence BZ II Viewer | 2.1 | Fluoreszenz- mikroskopie | Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland) |
| LAS X Leica | 1.1.0.12420 | Konfokalmikroskopie | Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland) |
| Manuelles Tracking Plugin für ImageJ | 2 | Chemotaxisanalyse | Fabrice Cordelieres (Orsay, Frankreich) |
| MatLab | R2014a | Chemotaxisanalyse | The MathWorks (Ismaning, Deutschland) |
| Microsoft Excel | 2010 | zahlreiche Anwendungen | Microsoft Corporation (Redmond, USA) |
| Microsoft Visio | 2010 | Bildbearbeitung | Microsoft Corporation (Redmond, USA) |
| OriginPro | 2016G | Statistik | OriginLab Corporation (Northampton, USA) |
| RStudio | 0.99.489 | Graphiken | RStudio (Boston, USA) |
| Tecan i-control | 1.1 | Mikroplattenmessung | Tecan (Männedorf, Schweiz) |
| UnscramblerX | - | Hauptkomponenten- analyse | Camo (Oslo, Norwegen) |

Tabelle 2-6 Konsummaterial.

| Konsummittel | Beschreibung | Hersteller (Ort, Land) |
|------------------------|--|---|
| Chemotaxiskammersystem | 3D μ -Slide Chemotaxis, zellkulturbe- handelt, sterilisiert | Ibidi (Martinsried, Deutschland) |
| Deckgläser | 24 × 60 mm | Menzel (Braunschweig, Deutschland) |
| Einbettfilterpapier | - | Labonord (Mönchengladbach, Deutschland) |
| Einbettkassetten | - | Klinipath (Duiven, Niederlande) |
| Einfrierröhrchen | - | Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Konsummittel | Beschreibung | Hersteller (Ort, Land) |
|-------------------------|---|---|
| Einmalpipetten | 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml | Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |
| ELISA-Mikrowellplatten | 96-Well, Nunc-Immuno-MaxiSorp, Polystyrol, durchsichtig, flacher Boden | Nunc (Wiesbaden, Deutschland) |
| FACS-Mikrotiterröhrchen | 1,2 ml | Hartenstein (Würzburg, Deutschland) |
| FACS-Röhrchen | 2 ml | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Filterspitzen | 0,1 - 10 µl, 0,1 - 100 µl, 100 - 1000 µl | Nerbe plus (Winsen/Luhe, Deutschland) |
| MACS-Mehrfachständer | - | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| MACS-Säulenadapter | mittleres Format "midi" | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| MACS-Trennsäulen | großes Format "large scale" | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Nitrocellulosemembran | Amersham Protran, Porendurchmesser Ø 0,2 µm | GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) |
| Objektträger | Glas, 76 x 26 x 1 mm, Superfrost | Menzel (Braunschweig, Deutschland) |
| Objektträger | Glas, 76 x 26 x 1 mm, Poly-L-Lysin | Menzel (Braunschweig, Deutschland) |
| Parafilm | - | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Pasteurpipetten | Glas, 120 mm, 2 ml | Brand (Wertheim, Deutschland) |
| Petrischalen | - | Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |
| Pipettenspitzen | 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl | Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |
| Reaktionsgefäße | 1,5 ml, 2 ml | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Wellplatten | 96-Well, schwarz, flacher Boden | Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zellkulturflaschen | 150 cm ² | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zellkulturkammersystem | 8-Well, Nunc-Lab-Tek, Glas | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Konsummittel | Beschreibung | Hersteller (Ort, Land) |
|-------------------------|--|---|
| Zellkulturplatten | 6-Well, 48-Well und 96-Well, transparent, flacher Boden | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zellkulturschalen | 60 cm ² | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zellkulturträgersystem | Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Zellschaber | - | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Zellsieb | Porendurchmesser Ø 40 µm | BD (Heidelberg, Deutschland) |
| Zentrifugationsröhrchen | 15 ml, 50 ml | Nerbe plus (Winsen / Luhe, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) |

2.1.5 Zell- und Gewebekulturmedium, Lösungen und Puffer

Für die Kultivierung von Zellen und Gewebe waren spezifische Medien notwendig. Tabelle 2-7 zeigt die Zell- und Gewebekulturmedien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2-7 Zell- und Gewebekulturmedien.

| Medium | Spezifizierung | Anwendung | Produktnummer | Hersteller |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|---------------|---|
| DMEM | (+) Glukose 4,5 g/l, (+) GlutaMax | Fibroblastenkultur | 61965-026 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| DMEM-Pulver | (+) L-Glutamin, (-) Natriumpyruvat | Herstellung 2x- konzentriertes DMEM | SH30003.03 | GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) |
| Minimal Essential Medium | (+) Glutamax | Chemotaxis | 41090-028 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Minimal Essential Medium | 10x konzentriert, (-) Glutamin | Chemotaxis | 11430-030 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| RPMI 1640 | (+) GlutaMax | Makrophagenkultur, Kokultur | 61870-010 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

Die Supplementierung von beispielsweise Nährstoffen wie Natriumpyruvat unterstützte die Kultivierung von Zellen zusätzlich. Die eingesetzten Supplemente und ihr Anwendungszweck sind in Tabelle 2-8 zusammen gestellt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-8 Supplemente für Kulturmedien.

| Supplement | Endkonzentration (Stockkonzentration) | Anwendung | Produkt- nummer | Hersteller |
|----------------------------|---|----------------------------------|--------------------|---|
| Ascorbinsäure- phosphat | 100 µM (100 mM in DMEM + 10 % fetales Kälberserum) | Kofaktor der Kollagensynthese | A8960-5G | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | 10 % (konzentriert) | Kyrokonservierung | D2438- 50ML | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Fetales Kälberserum | 10 % (konzentriert) | Wachstumsförderung | 41F1142K | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Natriumpyruvat | 1 mM (100 mM) | Glukosestoffwechsel | 11360-039 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Tranexamsäure (t-AMCA) | 160 µg pro ml (100 mg pro ml) | Antifibrinolytikum | PZN0523241 | Pfizer Pharma (Münster, Deutschland) |

Die Zusammensetzung des eingesetzten Kulturmediums aus einem Basalmedium und zusätzlichen Supplementen ist im jeweiligen Methoden-kapitel beschrieben. In Tabelle 2-9 sind die Enzym- und Substratlösungen zusammengestellt, die zur Kultivierung und zum Aufbau von Zell- und Gewebeskulturen notwendig waren.

Tabelle 2-9 Enzym- und Substratlösungen.

| Enzym oder Substrat | Zusammensetzung | | Verwendungszweck |
|-----------------------|---|-------------------------|--|
| Ascorbinsäurephosphat | Ascorbinsäurephosphat fetales Kälberserum in DMEM | 100 mM 10 % | diverse Zellkulturmedien |
| Calciumchlorid | CaCl ₂ in H ₂ O | 150 mM | Fibringelierung |
| Chondroitinsulfat | Chondroitinsulfat in PBS | 10 mM | Herstellung der Gelneutralisierungslösung |
| Dispase | Dispase in PBS | 2 * 10 ³ U/l | Separierung der Epidermis von Dermis |
| DMEM (2x) | DMEM-Pulver Natriumpyruvat in H ₂ O | 26,9 g/l 7,4 g/l | Herstellung der Gelneutralisierungslösung |

2. Material und Methoden

| Enzym oder Substrat | Zusammensetzung | | Verwendungszweck |
|-----------------------------------|--|-------------------------|--|
| Gelneutralisierungs- lösung I | MEM (10x) | 20 % | Kollagengelierung (Chemotaxis) |
| | HEPES-Lösung (3 M) in H ₂ O; pH 8,3 eingestellt | 5 % | |
| Gelneutralisierungs- lösung II | HEPES-Lösung (3 M) | 3 % | Kollagengelierung (Bindegewebsmodelle) |
| | Chondroitinsulfatlösung (10 mM) | 1 % | |
| | fetales Kälberserum | 3 % | |
| | in DMEM (2x); pH 8,5 eingestellt | | |
| HEPES | HEPES in PBS | 3 M | Herstellung der Gelneutralisierungslösung |
| Hyaluronidase | Hyaluronidase in H ₂ O | 0,2 % | Histologie |
| IL-4 | IL-4 | 0,1 mg/ml | Zellstimulation |
| | bovines Serumalbumin | 0,1 % | |
| | in H ₂ O | | |
| Kollagenase | Kollagenase in PBS | 5 * 10 ⁵ U/l | Fibroblastenisolierung |
| Kollagen I | Kollagen I | 7,2 mg/ml | Kollagengelherstellung |
| | Essigsäure | 0,1 % | |
| | in H ₂ O | | |
| LPS | LPS | 0,1 mg/ml | Zellstimulation |
| | bovines Serumalbumin | 0,1 % | |
| | in H ₂ O | | |
| M-CSF | M-CSF | 0,1 mg/ml | Makrophagen- differenzierung |
| | bovines Serumalbumin | 0,1 % | |
| | in H ₂ O | | |
| PBS-EDTA | EDTA in PBS | 0,54 mM | Zellpassage |
| TGF-β1 | TGF-β1 | 0,1 mg/ml | Zellstimulation |
| | bovines Serumalbumin | 0,1 % | |
| | Citronensäure | 10 mM | |
| | in H ₂ O | | |
| Thrombin | Thrombin | 20 U/ml | Fibringelierung |
| | CaCl ₂ | 150 mM | |
| | in H ₂ O | | |

2. Material und Methoden

| Enzym oder Substrat | Zusammensetzung | | Verwendungszweck |
|----------------------------|---------------------------|------|-------------------------|
| Trypsin-EDTA | Trypsin-EDTA in Versen | 10 % | Zellpassage |

Die Isolierung von Monozyten erforderte die Anwendung spezifischer Zellkulturpuffer. Die verwendeten Zellkulturpuffer sind in Tabelle 2-10 dargestellt.

Tabelle 2-10 Zellkulturpuffer.

| Lösung | Zusammensetzung | | Anwendung |
|----------------------|--|---------|---------------------------|
| Erythrolysepuffer | NaCl | 140 mM | Erythrolyse |
| | KHCO ₃ | 10 mM | |
| | EDTA | 130 µM | |
| | in H ₂ O; pH 7,2 eingestellt | | |
| MACS-Puffer | EDTA | 2 mM | magnetische Zellselektion |
| | bovines Serumalbumin | 0,5 % | |
| | in PBS; pH 7,2 eingestellt | | |
| Monozytenwaschpuffer | EDTA | 0,54 mM | Monozytenisolierung |
| | fetales Kälberserum | 1 % | |
| | in PBS | | |

2.1.6 Analytische Nachweise und Komponenten

Antikörper fanden in unterschiedlichen analytischen Nachweisverfahren wie der Immunhistologie, dem Westernblot sowie der Zytometrie Einsatz. In Tabelle 2-11 sind die spezifischen Antikörper und ihre Anwendungsbereich dargestellt.

Tabelle 2-11 Antikörper.

| Antikörper | Spezifizierung | Fluorophor | Anwendung | Verdünnung | Produktnummer | Hersteller |
|------------|-----------------------|-----------------|-------------|---------------------------------------|---------------|---|
| β-Aktin | Phalloidintoxin | Alexa Fluor 555 | Histologie | 1:40 in PBS- + 1 % BSA | A34055 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| β-Aktin | IgG2b Maus anti-human | ohne | Westernblot | 1:1000 in TBST + 5 % Milch | 3700 | Cell Signaling Technologies (Leiden, Deutschland) |
| CD3 | IgG1 Maus anti-human | APC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 17-0036-41 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD8a | IgG1 Maus anti-human | APC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 17-0088-41 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD14 | IgG2b Maus anti-human | FITC | Zytometrie | 1:2.5 in FACS-Puffer | 555-397 | BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) |
| CD20 | IgG2b Maus anti-human | APC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 17-0209-41 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD54 | IgG1 Maus anti-human | ohne | Histologie | 1:100 in Verdünnungslösung | AHS5411 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD68 | IgG2b Maus anti-human | FITC | Zytometrie | 1:10 in Permeabilisierungswaschpuffer | 11-0689-42 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Antikörper | Spezifizierung | Fluorophor | Anwendung | Verdünnung | Produktnummer | Hersteller |
|--------------------------|---|------------|------------|--|---------------|---|
| CD80 | IgG1 Maus anti-human | FITC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 11-0809-42 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD163 | IgG1 Maus anti-human | PE | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 12-1639-42 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD163 | IgG (polyklonal) Kaninchen anti-human | ohne | Histologie | 1:200 in Verdünnungslösung | PA5-32308 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| CD197 | IgG1 Maus anti-human | PE | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 130-093-621 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| CD206 | IgG1 Maus anti-human | PE | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 12-2069-42 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| IgG1 Isotypkontrolle | IgG1 Maus | APC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 17-4714 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| IgG1 Isotypkontrolle | IgG1 Maus | FITC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 11-4714-42 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| IgG1 Isotypkontrolle | IgG1 Maus | PE | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 130-092-212 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| IgG2b Isotypkontrolle | IgG2b Maus | APC | Zytometrie | 1:10 in FACS-Puffer | 17-4732 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| IgG2b Isotypkontrolle | IgG2b Maus | FITC | Zytometrie | 1:2.5 in FACS-Puffer/ 1:10 in Permeabilisierungswaschpuffer | IC0041F | R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Antikörper | Spezifizierung | Fluorophor | Anwendung | Verdünnung | Produktnummer | Hersteller |
|--------------------|---|--------------------|------------------|----------------------------------|----------------------|---|
| Kollagen I | IgG (polyklonal) Schaf anti-human | ohne | Westernblot | 1:1000 in TBST + 5 % Milch | AF6220 | R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) |
| Kollagen III | IgG (polyklonal) Kaninchen anti-human | ohne | Histologie | 1:200 in Verdünnungslösung | HPA007583 | Sigma Aldrich (München, Deutschland) |
| Sekundärantikörper | IgG (polyklonal) Esel anti-murin | Alexa Fluor 488 | Histologie | 1:400/1:500 in Verdünnungslösung | A-21202 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Sekundärantikörper | IgG (polyklonal) Esel anti-Kaninchen | Alexa Fluor 647 | Histologie | 1:500 in Verdünnungslösung | A-31573 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Sekundärantikörper | IgG (polyklonal) Ziege anti-murin, HRP-konjugiert | ohne | Westernblot | 1:10000 in TBST + 5 % Milch | 115-035-146 | Dianova (Hamburg, Deutschland) |
| Sekundärantikörper | IgG (polyklonal) Esel anti-Schaf, HRP-konjugiert | ohne | Westernblot | 1:10000 in TBST + 5 % Milch | 713-035-003 | Dianova (Hamburg, Deutschland) |

2. Material und Methoden

Analytische Nachweiskits bestehen aus mehreren Komponenten und erleichterten die Durchführung von Analysen. Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten analytischen Nachweiskits ist in Tabelle 2-12 dargestellt.

Tabelle 2-12 Analytische Nachweiskits.

| Produkt | Zusammensetzung | Anwendung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|---|--|--|----------------------|---|
| Azanfärbekit | Anilinalkohol Essigsaurer Alkohol (1 %) Azokarmin Phosphorwolframsäure (5 %) Anilinblau-Orange G | Histologische Kollagen- und Fibrinfärbung | 12079 | Morphisto (Frankfurt, Deutschland) |
| CellTiter-Glo Lumineszenzvitalitätstest | (I) CellTiter-Glo-Substrat und (II) Analysepuffer | ATP-Quantifizierung | G7570 | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| DC-Proteinnachweis | (I) alkalische Kupferartratlösung, (II) Folinreagenz und (III) Tensidlösung | Proteinquantifizierung | 5000116 | BioRad (München, Deutschland) |
| Fixierungs-Permeabilisierungs- Kit | (I) Fixierungs- und Permeabilisierungslösung sowie (II) Waschlösung (10x; verdünnt in dH ₂ O) | Durchflusszytometrie | 554714 | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| HRP-Polymer-Kit mit 3,3'- Diaminobenzidine (DAB) | Polymerverstärker Polymerreagenz DAB-Konzentrat DAB-Substratpuffer | Histologische Färbung | PD000KIT | DCS Diagnostics (Hamburg, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Produkt | Zusammensetzung | Anwendung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|--|---|------------------------|----------------------|---|
| humaner CBA gegen entzündliche Zytokine | Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12p70), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und transformierender Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) Fängerpartikel PE-Zytokindetektionsreagenz Zytokinstandard zytometrische Kalibrierpartikel PE-gekoppelte Positivkontrolle FITC-gekoppelte Positivkontrolle Waschpuffer Analysepuffer | Zytokinquantifizierung | 551811 | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| humaner FGF-ELISA | anti-human FGF-Antikörper humaner FGF-Standard anti-human FGF-Antikörper (biotingekoppelt) Avidin-HRP-Konjugat | Zytokinquantifizierung | 900-K08 | Peptotech (New Jersey, US) |

2. Material und Methoden

| Produkt | Zusammensetzung | Anwendung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|------------------------------|--|------------------------|----------------------|---|
| human PDGF-BB ELISA | anti-human PDGF-Antikörper humaner PDGF-Standard anti-human PDGF-Antikörper (biotinkoppelt) Avidin-HRP-Konjugat | Zytokinquantifizierung | 900-K04 | Peprotech (New Jersey, US) |
| humaner TGF- β 1-ELISA | 96-Mikrowellplatte mit monoklonalem Antikörper gegen humanes TGF- β 1 beschichtet Biotinkonjugat monoklonaler Antikörper gegen humanes TGF- β 1 Avidin-HRP-Konjugat humaner TGF- β 1-Standard Analysepuffer (20x; PBS mit 1% Tween 20, 10% bovines Serumalbumin) Waschpuffer (20x; PBS mit 1% Tween 20) Substratlösung (Tetramethylbenzidin) Stopplösung (1 M Phosphorsäure) | Zytokinquantifizierung | BMS249 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| Produkt | Zusammensetzung | Anwendung | Produktnummer | Hersteller (Ort, Land) |
|---|--|--------------------------|----------------------|--|
| Pan Monozyten Isolierungskit | FcR-Blockierungslösung biotingekoppelter Antikörpercocktail zur negativ Selektion von Monozyten magnetische Partikel gegen Biotin | Isolierung von Monozyten | 130-096-537 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Western Bright Chemilumineszenzsubstrat Quantum | (I) Luminolverstärker und (II) Wasserstoffperoxidlösung | Entwicklung Westernblot | 32106 | Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) |

2. Material und Methoden

Für die Durchführung von Analysen waren Puffer und Lösungen erforderlich, deren Zusammensetzung und Anwendung in Tabelle 2-13 dargestellt ist.

Tabelle 2-13 Analytische Puffer und Lösungen.

| Lösung | Zusammensetzung | | Anwendung |
|------------------------------------|---|-----------------|-------------------|
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | APS in H ₂ O | 10 % | Elektrophoresegel |
| Blotpuffer(10x) | Tris Glycin in H ₂ O | 250 mM 1,9 M | Westernblot |
| Blotpuffer (1x) | Blotpuffer (10x) Methanol in H ₂ O | 10 % 20 % | Westernblot |
| Bromphenolblaulösung | Bromphenolblau in H ₂ O | 10 % | Westernblot |
| CBA-Analysepuffer | fetales Kälberserum in RPMI | 10 % | CBA |
| ELISA-Analysepuffer (FGF-und PDGF) | Tween bovines Serumalbumin in PBS | 0,05 % 0,1 % | ELISA |
| ELISA-Analysepuffer (TGF-β1) | Tween bovines Serumalbumin in PBS | 1 % 10 % | ELISA |
| ELISA-Blockierungspuffer | bovines Serumalbumin in PBS | 1 % | ELISA |
| ELISA-Waschpuffer (FGF und PDGF) | Tween in PBS | 0,05 % | ELISA |
| ELISA-Waschpuffer (TGF-β1) | Tween in PBS | 1 % | ELISA |
| FACS-Puffer | EDTA bovines Serumalbumin in PBS | 2 mM 1 % | Zytometrie |

2. Material und Methoden

| Lösung | Zusammensetzung | | Anwendung |
|-------------------------------|--|----------|---------------------|
| Hämatoxylinlösung | Hämatoxylin | 6 g | Histologie |
| | Natriumiodat | 1 g | |
| | Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat | 250 g | |
| | Chloralhydrat | 250 g | |
| | Citronensäure | 5 g | |
| | ad 4500 ml H ₂ O; Inkubation über Nacht unter dem Abzug und ad 5000 ml dH ₂ O; anschließend muss die Lösung für mindestens 4 Wochen reifen | | |
| Lämmli-puffer (5x) | Tris (pH 8) | 337,5 mM | Westernblot |
| | Glycerol | 50 % | |
| | SDS | 10 % | |
| | Bromphenolblaulösung | 0,25 % | |
| | β-Mecaptoethanol (frisch zugeben) | 5 % | |
| Laufpuffer | Tris | 250 mM | Westernblot |
| | Glycin | 1,9 M | |
| | SDS | 1,5 % | |
| Natriumcitratpuffer (10x) | Natriumcitrat in H ₂ O; pH 6,0 einstellen | 200 mM | Demaskierungspuffer |
| Natriumcitratpuffer (1x) | Natriumcitratpuffer (10x) in H ₂ O | 10 % | Demaskierungspuffer |
| PBS mit Tween | Tween in PBS | 0,5 % | Histologie |
| Permeabilisierungspuffer | Triton-X in PBS | 0,2 % | Histologie |
| Proteaseinhibitorlösung (25x) | 1 Tablette in 2 ml H ₂ O | | Gewebelyse |

2. Material und Methoden

| Lösung | Zusammensetzung | | Anwendung |
|--|--|--------|---------------------|
| RIPA-Puffer | Tris (pH 6,8) | 10 mM | Gewebeanalyse |
| | NaCl | 100 mM | |
| | EDTA | 1 mM | |
| | Glycerol | 10 % | |
| | Triton-X | 1 % | |
| | SDS | 0,1 % | |
| | Natriumdesoxycholat | 0,5 % | |
| Silanacetonlösung | APTES in Aceton | 2 % | Silanisierung |
| TBS (10x) | Tris-HCl | 500 mM | Westernblot |
| | NaCl | 1,5 M | |
| | in H ₂ O; pH 7,6 | | |
| TBST (1x) | TBS (10x) | 10 % | Westernblot |
| | Tween | 0,05 % | |
| | in H ₂ O | | |
| Tris-EDTA-Puffer (10x) | Tris | 100 mM | Demaskierungspuffer |
| | EDTA | 10 mM | |
| | in H ₂ O; pH 9,0 einstellen | | |
| Tris-Puffer (pH 6,8) | Tris in H ₂ O; pH 6,8 einstellen | 500 mM | Elektrophoresegel |
| Tris-Puffer (pH 8,8) | Tris in H ₂ O; pH 8,8 einstellen | 2 M | Elektrophoresegel |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | H ₂ O ₂ in H ₂ O | 3 % | Histologie |

2.2 Methoden

Ethische Grundsätze zur Arbeit mit humanen Geweben

Die Verwendung von Gewebe zur Isolierung von Zellen und interzellulären Matrixkomponenten erfolgte nach Einwilligung des Patienten und unter Zustimmung der Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Abstimmung 182/10).

- Präputien (lokale Arztpraxen, Würzburg, Deutschland)
- Periphere Vollblutkonserven und gefrorenes Frischplasma (Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, München, Deutschland)
- Leukozytenkonzentrat (Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland)

2.2.1 Isolierung, Kultivierung und Differenzierung von Zellen

Die Isolierung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen war für die Entwicklung von Fremdkörpermodellen eine zentrale Voraussetzung. Die zytometrische Charakterisierung vor und nach der Differenzierung stellte ein wesentliches Qualitätskriterium der angewandten Isolierungs- und Kultivierungstechniken dar. Vordifferenzierte Makrophagen fanden zur Untersuchung von Wechselwirkungen mit der Materialoberfläche Einsatz (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Bereits direkt nach der Isolierung ließen sich Monozyten in dreidimensionale Fremdkörpermodelle integrieren (siehe Kapitel 2.2.5). Zusätzlich erforderte der spätere Aufbau von Bindegewebe die Isolierung und Kultivierung von primären Fibroblasten (siehe Kapitel 2.2.3.2). Mit dem Ziel einer höheren Standardisierung fand in der späteren Modellentwicklung (siehe Kapitel 2.2.5) die Fibroblastenzelllinie HFF-1 (englisch human foreskin fibroblasts-1) Anwendung.

Primäre humane Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen

Die Dichtegradientenzentrifugation von Leukozytenkonzentrat und die anschließende magnetische Aufreinigung ermöglichte die Isolierung humaner Monozyten. Zuerst erforderte die anschließende Dichtegradientenzentrifugation die Verdünnung des Leukozytenkonzentrats (circa 8 ml) mit Zellisolationswaschpuffer auf ein Gesamtvolumen von 50 ml oder im Fall von Leukozytenkonzentrat, das aus Vollblut hergestellt wurde, die Verdünnung im Verhältnis zwei zu drei. In einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen ließen sich 20 ml Ficoll (Saccharose-

polymer der Dichte 1,078 g pro ml) mit 25 ml Blutpuffergemisch überschichten. Die Zentrifugation bei $800 \times g_0$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Minuten ohne Bremse ermöglichte die Auftrennung der Blutbestandteile. Hierbei setzen sich Erythrozyten und Granulozyten entsprechend ihrer Dichte am Boden ab, die periphere mononukleare Zellfraktion bildete eine weißliche Phase zwischen der oberen Flüssigkeitsphase aus Plasma und Thrombozyten sowie dem Ficoll. Die zelluläre Zwischenphase ließ sich mit einer Pipette abnehmen und anschließend dreimal waschen. Hierfür erfolgte das Auffüllen mit Zellisolutionswaschpuffer auf 50 ml und anschließend die Zentrifugation für 10 Minuten bei $300 \times g_0$ mit Bremse. Die nachfolgende Lyse der Erythrozyten erleichterte die Durchführung der magnetischen Zellaufreinigung. Hierfür waren die Aufnahme und die Resuspension des gewaschenen Zellpellets in 10 ml Erythrolysepuffer und die anschließende Inkubation für 10 Minuten erforderlich. Ein weiterer Waschschrift stoppte das Fortschreiten der Reaktion. Die Gabe der Zellsuspension durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von $40 \text{ }\mu\text{m}$ vereinzelte die Zellen und erleichterte die anschließende antikörpervermittelte Selektion der Monozyten. Aus der peripheren mononuklearen Zellfraktion ließen sich durch magnetische Negativselektion nachfolgend Monozyten auf reinigen. Bei einer Negativselektion erfolgt mit Hilfe von biotinkoppelten Antikörpern die Markierung aller Zellen außer Monozyten. Hierbei fanden Antikörper gegen CD3 (T-Lymphozyten), CD7 (T-Lymphozyten), CD16 (NK-Zellen, neutrophile Granulozyten), CD19 (B-Lymphozyten), CD56 (Natürliche Killerzellen), CD123 (dendritische Zellen, basophile Granulozyten) und Glycophorin (Erythrozyten) Einsatz. Anschließend banden diese Zell-Antikörper-Komplexe über magnetische Partikel, die an Biotin koppeln, an eine magnetische Säule. Die unmarkierten Monozyten passierten hierbei die magnetische Säule und befanden sich im Durchfluss. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Hierfür kamen 1×10^7 Zellen in $30 \text{ }\mu\text{l}$ MACS-Puffer zum Einsatz. Die Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{l}$ Fc-Rezeptorblockierungslösung verhinderte die Bindung der konstanten Antikörperregion (englisch fragment crystallizable region, Fc) an den Fc-Rezeptor (FcR) von phagozytischen oder zytotoxischen Zellen. Anschließend konnte die Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{l}$ biotinkoppelten Antikörpern erfolgen. Nach Resuspension schloss eine Inkubation für 5 Minuten bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ an. Im folgenden Schritt ermöglichte die Zugabe von $30 \text{ }\mu\text{l}$ MACS-Puffer und $20 \text{ }\mu\text{l}$ magnetischen Partikeln die Bindung an Zell-Antikörper-Komplexe innerhalb von 10 Minuten bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Zur magnetischen Aufreinigung war eine große Trennsäule mit

3 ml MACS-Puffer zu befeuchten und nach Durchfluss des Volumens die Zellsuspension aufzubringen. Das dreimalige Waschen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer ermöglichte das Herauslösen der Monozyten. Anschließend befand sich die Zielpopulation im Durchfluss. Die so erhaltenen Monozyten kamen entweder direkt zum Aufbau von dreidimensionalen Fremdkörpermodellen (siehe Kapitel 2.2.5) zum Einsatz oder es schloss eine Differenzierung vor der anschließenden Biomaterialtestung an (siehe Kapitel 2.2.3 und Kapitel 2.2.4). Für die Vordifferenzierung erfolgte in einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 Zellkulturoberfläche die Aussaat von $1 \cdot 10^6$ Monozyten pro ml Medium bestehend aus 10 % fetalem Kälberserum in RPMI. Nach bereits etablierten Protokollen fand innerhalb einer Kultivierungsphase von 6 Tagen durch Zusatz von rekombinantem humanem M-CSF in einer Konzentration von 40 ng pro ml Kulturmedium die Differenzierung statt (142, 143). Die Verstärkung der Differenzierung erforderte die Erneuerung des Mediums am dritten Tag der Differenzierung. Nach 10-minütiger Vorinkubation in PBS-EDTA auf Eis ließen sich die Zellen an Tag 6 mechanisch mit einem Zellschaber von der Oberfläche lösen.

Zytometrische Charakterisierung von humanen primären Monozyten und Makrophagen

Zur Charakterisierung der Zellreinheit nach magnetischer Aufreinigung sowie des Makrophagenphänotyps im Anschluss an die Differenzierung fanden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro zytometrischer Analyse Einsatz. Jedes analysierte Antigen erforderte für den eingesetzten Antikörper das Mitführen einer entsprechenden fluorophorgekoppelten Isotypkontrolle. Vorerst erfolgte das Waschen der Zellen in 3 ml FACS-Puffer und die anschließende Zentrifugation für 5 Minuten bei $250 \times g_0$. Das Zellpellet war in 80 μl FACS-Puffer unter Zugabe von 1 μl FcR-Blockierungslösung für 15 Minuten bei 4°C zu inkubieren. Für oberflächenexponierte Antigene erfolgte nach einem erneuten Waschschrift in 50 μl FACS-Puffer die Zugabe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (Zusammenfassung der verwendeten Antikörper sowie ihre Expression ist in Tabelle 2-14 dargestellt). Die anschließende Inkubation für 30 Minuten bei 4°C fand unter Lichtausschluss statt. Für die anschließende zytometrische Analyse waren die Zellen erneut in FACS-Puffer zu waschen und in 300 μl FACS-Puffer aufzunehmen. Für intrazelluläre Proteine kamen fixierte Zellen mit aufgeschlossener Zellmembran zum Einsatz. Dies erforderte die Resuspension der Zellen in 250 μl Fixierungs- und Permeabilisierungslösung sowie die Inkubation für 20 Minuten bei 4°C .

2. Material und Methoden

Tabelle 2-14 Antikörper zur zytometrischen Charakterisierung der Monozyten nach Zellisolierung sowie der Makrophagen nach 6-tägiger Differenzierung.

| Antikörper | Expression des Antigens | Isotyp, Spezies und Reaktivität | Fluorophor | Verdünnung |
|-----------------|--|---------------------------------|------------|-----------------|
| CD3 | Extrazellulär, T-Lymphozyten | IgG1 Maus anti-human | APC | 1:10 |
| CD8a | Extrazellulär, T-Lymphozyten | IgG1 Maus anti-human | APC | 1:10 |
| CD14 | Extrazellulär, Monozyten, Makrophagen | IgG2b Maus anti-human | FITC | 1:2,5 |
| CD20 | Extrazellulär, B-Lymphozyten | IgG2b Maus anti-human | APC | 1:10 |
| CD68 | Intrazellulär, Makrophagen | IgG2b Maus anti-human | FITC | 1:10 |
| CD80 | Extrazellulär, M1-Makrophagen | IgG1 Maus anti-human | FITC | 1:10 |
| CD163 | Extrazellulär, M2-Makrophagen | IgG1 Maus anti-human | PE | 1:10 |
| CD197 | Extrazellulär, M1-Makrophagen | IgG1 Maus anti-human | PE | 1:10 |
| CD206 | Extrazellulär, Makrophagen | IgG1 Maus anti-human | PE | 1:10 |
| IgG2b | - | IgG2b Maus | APC | 1:10 |
| IgG2b | - | IgG2b Maus | FITC | 1:2,5 oder 1:10 |
| Isotypkontrolle | | | | |
| IgG1 | - | IgG1 Maus | FITC | 1:10 |
| Isotypkontrolle | | | | |
| IgG1 | - | IgG1 Maus | PE | 1:10 |
| Isotypkontrolle | | | | |

Es folgte das zweimalige Waschen der Zellen mit 250 µl Permeabilisierungswaschpuffer sowie die Zentrifugation für 5 Minuten bei 250 x g₀. Die Bindung des fluoreszenzgekoppelten Antikörpers an das intrazelluläre Antigen fand während einer Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C in 50 µl Permeabilisierungswaschpuffer statt. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen in 3 ml Permeabilisierungswaschpuffer und die Zentrifugation für 5 Minuten bei 250 x g₀. Die anschließende Analyse im Durchflusszytometer erforderte die Resuspension der

Zellen in 300 ml FACS-Puffer. Je Messzyklus erfolgte die Analyse von $1 \cdot 10^4$ Zellen. Die Auswertung konnte mit der Software FlowJo durchgeführt werden.

Humane dermale Fibroblasten

In dieser Arbeit dienten humane Präputien von gesunden Spendern zur Isolierung von primären dermalen Fibroblasten. Zur Sterilitätskontrolle erfolgte die Inkubation von 3 ml Transportlösung bestehend aus magnesium- und calciumangereicherter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS+) mit 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid. Anhaftende Blutreste ließen sich mit PBS+ entfernen und überschüssiges Fett- und Bindegewebe mit einem Skalpell abtragen. Während der Aufarbeitung gewährleistete PBS+ die Feuchthaltung der Haut. Das Schneiden der Hautbiopsie in 2 bis 3 millimeterbreite Streifen erzielte eine vergrößerte Angriffsfläche für den anschließenden enzymatischen Verdau. Es folgte ein Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Nach dem enzymatischen Verdau der zwischen Epidermis und Dermis liegenden Basalmembran mit 5 ml Dispase ($2 \cdot 10^3$ Einheiten pro l) bei 4 °C über Nacht ließ sich am nächsten Tag die Epidermis von der Dermis mit einer Pinzette trennen. Mit einem Skalpell erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Dermis zu einer homogenen Masse. Der um die Zellen liegende extrazelluläre Bindegewebsverband schloss sich weiterhin durch Inkubation mit 10 ml Kollagenase ($5 \cdot 10^5$ Einheiten pro l) innerhalb von 45 Minuten bei 37 °C auf. Eine anschließende Zentrifugation für 5 Minuten bei $250 \times g_0$, ein weiterer Waschschrift in 10 ml DMEM und die wiederholte Zentrifugation für 5 Minuten bei $250 \times g_0$ ermöglichte die Reinigung der Gewebefragmente. Die Aufnahme der aufgeschlossenen Gewebefragmente in 2 ml DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum sowie die Überführung der Suspension in eine Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm^2 diente der Anhaftung der Gewebefragmente an die Zellkulturoberfläche. Am anschließenden Tag folgte die Zugabe von zusätzlich 6 ml DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum. Der Verbrauch des Mediums durch die Zellen erforderte die Erneuerung des Kulturmediums alle 2 bis 3 Tage. Aus den Gewebefragmenten wuchsen Fibroblasten aus und bildeten einen Zellrasen. Ab einer Dichte von 70 bis 80 % mussten die Zellen vom Boden der Flasche gelöst und in geringerer Dichte in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät werden. Die Passage der Zellen fand unter Anwendung von Standardprotokollen mit Trypsin-EDTA statt. Dies erforderte das Waschen der Zellschicht mit PBS-EDTA und die anschließende Inkubation für maximal 3 Minuten mit $60 \mu\text{l}$ Trypsin-EDTA

(37 °C) pro cm² Zellkulturoberfläche. Zu den gelösten Zellen in Suspension sollte rasch die Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum erfolgen, um so die enzymatische Reaktion durch Sättigung zu stoppen. Anschließend konnten die Zellen in einer definierten Dichte von 4 * 10³ Zellen pro cm² ausgesät werden. Vor Anwendung in Versuchen erfolgte die Expansion der Fibroblasten bis zur dritten Passage (siehe Verwendung in den Versuchen Kapitel 2.2.3.1 und Kapitel 2.2.3.2).

Dermale Fibroblastenzelllinie HFF-1

Bei der Zelllinie HFF-1 (englisch human foreskin fibroblasts-1) handelt es sich um eine von ATCC (Wesel, Deutschland) 2003 aus zwei gesunden Vorhautspendern isolierte und vereinigte Fibroblastenzelllinie. Im Jahr 2016 bezog der Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (Würzburg, Deutschland) diese Zelllinie. Die Aussaat der Fibroblastenzelllinie erfolgte ebenfalls in einer definierten Dichte von 4 * 10³ Zellen pro cm² sowie die Kultivierung in 10 % fetalem Kälberserum und 1 mM Natriumpyruvat in DMEM. Die Stoffwechselprozesse der Zellen erforderten eine Erneuerung des Mediums an jedem zweiten bis dritten Tag. Die Fibroblastenzelllinie fand zum Aufbau der dreidimensionalen Fremdkörpermodelle Anwendung und erfolgte mit Zellen in der Passage 18 (siehe Kapitel 2.2.5 für die Anwendung zur Herstellung von dreidimensionalen Fremdkörpermodellen). Die Passage der Zellen war analog wie für primäre Fibroblasten durchzuführen.

2.2.2 Herstellung und Vorbereitung der Referenzbiomaterialien

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Testmaterialien dienten als Referenz für die Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen. Als standardisierte Testoberflächen fanden Schälchen aus Natronkalkglas mit einem Durchmesser von 30 sowie 34 mm der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) Einsatz. Diese eigneten sich für die Beschichtung mit Titan sowie Polytetrafluorethylen (PTFE). Hierfür war im Voraus die Reinigung der Glasschälchen für jeweils 10 Minuten in einem Ultraschallbad und danach in Aceton, Isopropanol und ultrareinem Wasser notwendig. Die anschließende Trocknung konnte unter Stickstoffbegasung erfolgen. Das Verfahren des reaktiven Magnetronspüterns ermöglichte die Titanoberflächenbeschichtung dieser Glasschälchen. Hierbei war ein Titantarget (120 mm Durchmesser, 10 mm Höhe) mit einem Abstand zwischen Ziel und Substrat von 100 mm zu verwenden. Nach Evakuierung der Prozesskammer auf einem Basisdruck von unter

$1 * 10^{-6}$ mbar konnte mit 300 W und unter Argonatmosphäre mit einem Druck von $3,4 * 10^{-3}$ mbar für 80 Minuten der Beschichtungsprozess ablaufen. Das Aufbringen der PTFE-Beschichtung auf den beschriebenen Glasschälchen erfolgte durch die Kunststoffbeschichtungsfirma Rhenotherm GmbH (Kempen, Deutschland). Hierbei kennzeichnen die aufgetragenen Schichten, bestehend aus Rhenolase MK I-grau, eine Dicke von 10 bis 20 μm , ein Härtegrad von D 72 und eine Rauigkeit von weniger als 4 μm . Als Testkörper aus Silikon ließ sich ein Kammersystem aus Biopor[®] AB clearX 70 shore A Silikon ($17 \times 53 \text{ mm}^2$) der Firma Dreve Otoplastik GmbH (Unna, Deutschland) selbst herstellen. Hierbei handelt es sich um ein transparentes, additionsvernetzendes Otoplastiksilikon, das herkömmlicherweise zur Herstellung von beispielsweise Hörhilfen Einsatz findet. Die Referenzmaterialien Glas, Titan, PTFE und Silikon erforderten vor Anwendung in den zellbasierten Testverfahren eine Reinigung für 30 Minuten in einem Ultraschallbad mit demineralisiertem Wasser. Anschließend folgte die Sterilisierung der Proben für 15 Minuten in 70 % Ethanol und das nachfolgende Autoklavieren. Sterile Zellkulturschälchen bestehend aus Polyethylen (PE; 35 mm Durchmesser) der Firma Ibidi (Martinsried, Deutschland) dienten ebenfalls als Referenzmaterial.

Histologische Färbungen ließen sich in einem 8-Well-Zellkulturkammersystem aus Glas durchführen. Zur histologischen Färbung von Zellen auf den Biomaterialien PTFE und Titan erfolgte die Beschichtung von Glasobjektträgern nach den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Verfahren. Das Verbinden der beschichteten Objektträger mit dem Rahmensystem des 8-Well-Zellkulturkammersystems ermöglichte die parallele Durchführung mehrerer Versuchsansätze. Die optischen Eigenschaften sowie der Arbeitsabstand verhinderte die Etablierung von histologischen Färbungen auf den Silikon- und PE-Oberflächen.

2.2.3 Entwicklung von indirekten zellbasierten Modellsystemen

Ein indirektes zellbasiertes Modellsystem ermöglichte die Untersuchung von Teilprozessen während einer Fremdkörperreaktion wie die Chemotaxis von Fibroblasten sowie den Umbau von Bindegewebe durch Fibroblasten in Antwort auf Sekretionsprodukte von Makrophagen.

Kultivierung von Makrophagen auf Referenzoberflächen und Gewinnung von konditioniertem Medium sowie Referenzmedium

Im Anschluss an die Differenzierung von Monozyten aus peripherem Vollblut (siehe Kapitel 2.2.1) folgte in einer Dichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 und einem Volumenoberflächenverhältnis von 0,22 ml pro cm^2 die Aussaat der gewonnenen Makrophagen in RPMI plus 10 % fetalem Kälberserum auf Titan-, Glas- und PTFE-Oberflächen. Als Referenzmedium für Wechselwirkungen zwischen Medium und Biomaterial diente ein im gleichen Volumenoberflächenverhältnis auf den jeweiligen Testoberflächen kultiviertes Medium. Im Anschluss an eine Kultivierungsphase von 48 Stunden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid ließ sich das Medium gewinnen und Zellfragmente durch Zentrifugation des Überstands bei $10.000 \times g_0$ für 5 Minuten entfernen. Zur Konservierung bis zur Anwendung in den Versuchen erfolgte die Lagerung der Überstände bei - 20 °C. Insgesamt fand von insgesamt fünf primären Zellspendern ($n = 5$) nach Inkubation auf den Referenzmaterialien die Gewinnung von konditioniertem Medium statt. Die nachfolgende Analyse von chemotaktischen Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, FGF und PDGF im konditionierten Kulturmedium sowie im Referenzmedium ermöglichte einen Rückschluss auf aktive Sekretions- sowie über passive Adsorptionsprozesse an den Materialoberflächen (Durchführung der Analysen siehe Kapitel 2.1.6).

2.2.3.1 Modell zur Chemotaxis von Fibroblasten

Migrationsexperiment

Die Migrationsexperimente orientierten sich an einem bereits publizierten Protokoll (144). Dies erforderte die Mischung von Rattenschwanzkollagen Typ I (7,2 mg pro ml in 0,1 % Essigsäure) mit einem gleichen Volumenanteil Gelneutralisierungslösung I. Anschließend erfolgte die Suspension von Fibroblasten ($6 \cdot 10^6$ pro ml) in DMEM mit 30 % fetalem Kälberserum. Die eingestellte Zellsuspension kam im Verhältnis eins zu zwei

mit dem neutralisierten Kollagengel zum Einsatz. Dabei waren um die Gelierung des Hydrogels zu verzögern alle Schritte auf Eis durchzuführen. Das Einbringen von 6 µl Kollagengel mit einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^6$ Fibroblasten pro ml in den Beobachtungskanal eines dreidimensionalen µ-Chemotaxiskammersystems erfolgte wie durch den Hersteller Ibidi (Martinsried, Deutschland) beschrieben. In den Experimenten fanden primäre Fibroblasten von einem Spender Anwendung. Nach Gelierung für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte das Befüllen der Reservoirs mit 65 µl MEM-DMEM in einem zwei zu eins Verhältnis (2:1) sowie zusätzlich 10 % fetalem Kälberserum.

Evaluierung des dreidimensionalen µ-Chemotaxiskammersystems

Der Austausch von 50 % des Reservoirvolumens (33 µl) durch TGF-β1-angereichertes MEM-DMEM (2:1) mit 10 % fetalem Kälberserum ermöglichte die Evaluation des dreidimensionalen µ-Chemotaxiskammersystems. Hierbei fand eine Endkonzentration von 12,5 pg pro ml TGF-β1 im Reservoir Anwendung. Die Evaluierung des experimentellen Aufbaus erfolgte durch Anlegen unterschiedlicher Gradienten im Kammersystem: (I) Zusatz des Stimulanz in nur einem Reservoir (unipolar), (II) Zusatz des Stimulanz in beiden Reservoirs (bipolar) oder (III) ohne Gradient, das heißt mit Standardmedium MEM-DMEM (2:1) plus 10 % fetalem Kälberserum.

Biomaterialtestung in einem dreidimensionalen µ-Chemotaxiskammersystem

Das µ-Chemotaxiskammersystem ermöglichte eine Bewertung der materialabhängigen Freisetzung von Chemokinen durch Makrophagen und deren Wirkung auf die Wanderung von Fibroblasten. Hierfür erfolgte in einem Kammerreservoir ein Austausch des Mediums im Verhältnis von 50 % des Volumenanteils (33 µl) durch zellkonditioniertes Medium. Der Ausschluss von Effekten, die auf Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und Medium zurückgehen, erforderte das Befüllen des zweiten Reservoirs mit 50 % biomaterialinkubiertem Referenzmedium (33 µl).

Echtzeitbilderfassung

An einer Konfokalmikroskopieplattform ermöglichte ein integriertes Echtzeitbilderfassungssystems die Aufnahme der Fibroblastenwanderung unter Standardkultivierungsbedingungen von 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid. Zur Beobachtung der Fibroblastenwanderung waren über einen Zeitraum von 48 Stunden alle 15 Minuten Aufnahmen zu machen. Die Wanderung

der Zellen ließ sich mit dem manuellen Tracking Plugin der Software ImageJ verfolgen. Je Experiment erfolgte die Auswertung eines Datensatz bestehend aus Bewegungstrajektorien von 20 Zellen. Hierbei lässt sich eine Bewegungstrajektorie ausgehend von einer bestimmten Startposition \vec{x}_1 der Zelle mittels n Vektoren $\{\vec{x}_i\}_{i=1}^n$ beschreiben. Das Chemotaxis- und Migrationstool der Firma Ibidi (Martinsried, Deutschland) ermöglichte die Übertragung der Bewegungstrajektorien in ein X-Y-Koordinatensystem.

Berechnung von Migrationsparametern

Die Berechnung von Migrationsparametern erforderte den Import der Datensätze in die Software MATLAB. Aus dieser Datenmatrix ließ sich aus der euklidischen Distanz d_E (in μm) und der akkumulierten Distanz d_A (in μm) die Direktheit als Maß für die Geradlinigkeit der Zellwanderung berechnen (144). Die euklidische Distanz d_E beschreibt hierbei den Abstand zwischen Start- (\vec{x}_1) und Endpunkt (\vec{x}_n) der Zellbewegung. Wohingegen die akkumulierte Distanz die Gesamtwanderungsstrecke $d_A = \sum_{i=2}^n |\vec{x}_i - \vec{x}_{i-1}|$ beschreibt. Aus beiden linearen statistischen Parametern, der euklidischen und der akkumulierten Distanz, leitet sich die Direktheit der Zellwanderung wie folgt ab:

$$\text{Direktheit} = \frac{d_E}{d_A} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Hierbei hat bei einer geradlinigen Zellwanderung die Direktheit einen Wert von eins. Die Vorwärtswanderung in Richtung des chemischen Gradienten lässt sich durch einen Einheitsvektor \vec{v} beschreiben und konnte durch den Vorwärtsmigrationsindex (*Vorwärtsmigrationsindex* $x_{\vec{v}}$) charakterisiert werden. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

$$\text{Vorwärtsmigrationsindex}_{\vec{v}} = \frac{\langle \vec{v}, \vec{x}_n - \vec{x}_1 \rangle}{d_A} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Hierbei stellt \langle , \rangle das Skalarprodukt dar. Die Projektion der Trajektorien auf einen Kreis, der sich aus $n-1$ Winkeln $\{\alpha_i\}_{i=1}^{n-1}$ zusammensetzt, beschreibt die Ausrichtung der Zellwanderung. Dabei ermöglichte die Anwendung zirkulärer Statistik die Bestimmung der Winkelverteilung (145).

Hierfür erfolgte die Ableitung des zirkulären Mittelwerts $\tilde{\alpha}$ und der mittleren Länge R der Winkelverteilung:

$$R \cos(\tilde{\alpha}) = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \cos(\alpha_i)}{n-1}, \quad R \sin(\tilde{\alpha}) = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \sin(\alpha_i)}{n-1} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Strebt die mittlere Winkellänge R gegen 1 entspricht dies einer engen, scharfen Winkelverteilung, wohingegen für sehr gleich verteilte Winkelverteilungen R gegen null tendiert (146).

Statistische Auswertung von kontinuierlichen, spenderabhängigen Daten

Nach dem Shapiro-Wilk-Test lagen die kontinuierlichen, spenderabhängigen Daten normalverteilt vor. Die Untersuchung auf statistische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mit einer one-way ANOVA für Messwiederholungen und einem anschließendem post-hoc Fishers Least-Significant-Difference-Test. Für alle Daten lagen bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ signifikante Unterschiede vor.

2.2.3.2 Bindegewebsmodelle zur Bewertung von Langzeiteffekten

Kultivierung von Bindegewebsmodellen unter konditioniertem Medium und Referenzmedium

Bindegewebsmodelle ermöglichten Studien zu Langzeiteffekten von zellkonditioniertem Medium. Hierfür erforderlich war die Mischung von Kollagen Typ I (7,2 mg pro ml in 0,1 % Essigsäure) in einem Verhältnis von zwei zu eins mit der Zellsuspension in Gelneutralisierungslösung II. Die eingesetzte Endkonzentration der Fibroblasten im Kollagengel betrug $2 \cdot 10^5$ Fibroblasten pro ml. In eine 48-Well-Zellkulturplatte ließen sich 500 μ l des Kollagen-Zell-Gemisches vorlegen. Zusätzlich diente ein Kollagenhydrogel ohne Zellen als Negativkontrolle. Je primärem Makrophagenspender ($n = 5$) erfolgte der Aufbau der Versuchsansätze in Triplikaten. Im Anschluss an eine Gelierungsphase von 30 Minuten bei 37 °C folgte die Überschichtung der Hydrogele mit 250 μ l Medium. Der Zusatz von 30 % konditioniertem Medium zu DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum ermöglichte die Untersuchung von Effekten des konditionierten Mediums. Als Referenz diente der Zusatz von gleichen Volumenanteilen materialinkubiertem Referenzmedium. Der Wirkungsbereich zwischen starker Stimulation und Standardkultivierung ließ sich durch die Anreicherung von Standardkulturmedium mit 1 ng pro ml TGF- β 1 sowie die Kultivierung in Standardkulturmedium (DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum) abdecken. Die Zugabe von

100 μM Ascorbinsäurephosphat zu allen Kulturmedien unterstützte die Kollagensynthese. Eine Erneuerung des Mediums erfolgte an jedem zweiten bis dritten Tag.

Gewebeaufarbeitung nach 14-tägiger Kultivierung

Zur Bewertung der Gewebeabnahme fand an Tag 14 von zwei Modellen die Bestimmung des Nassgewichts statt. Die nachfolgende histologische Analyse erforderte die Fixierung des dritten Modells über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd und das automatische Einbetten des fixierten Modells in Paraffin. An Gewebeschnitten auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern folgte eine Azanfärbung (siehe Kapitel 2.1.6). Anschließend ließen sich die histologischen Färbungen an einem Fluoreszenzmikroskop aufnehmen. Die Bildanalyse der mittleren Cyanintensität (MCI) mit der Software ImageJ ermöglichte eine Quantifizierung des Gewebeumbaus. Je Modell erfolgte die Aufnahme von zwei Bildern, jeweils die MCI-Analyse und die Bildung des Mittelwerts zwischen beiden Aufnahmen. Dies erforderte die Zerlegung der histologischen Bilder in die drei Farbbestandteile Blauanteil Cyan (C), Rotanteil Magenta (M), Gelbanteil Yellow (Y) und den Schwarzanteil Key (K). Anschließend war die Umwandlung des Cyankanals in ein 8-bit-Bild erforderlich. Die Histogramme der Farbintensität ermöglichten die Analyse der mittleren Cyanintensität (MCI). Zur exemplarischen Darstellung erfolgte von allen Bildern eines Bildsatzes die Subtraktion des Hintergrundes (nach der rollenden Ball Methode mit einem Durchmesser von 3000 Pixeln).

Statistische Auswertung von kontinuierlichen, spenderabhängigen Daten

Die Auswahl des statistischen Tests orientierte sich für die kontinuierlichen spenderabhängigen Daten an der mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüften Normalverteilung. Bei normalverteilten Daten erfolgte die Testung auf statistische Unterscheide zwischen den Versuchsgruppen mit einer einfachen ANOVA für Messwiederholungen und der anschließenden Durchführung eines post-hoc Fishers Least-Significant-Difference-Test. Nicht normalverteilte Daten erforderten zum Vergleich der Versuchsgruppen die Durchführung einer Friedman-ANOVA mit anschließendem paarweisem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Für alle Daten war das Signifikanzniveau auf einen p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt.

2.2.4 Vergleichender Modellansatz zur Bewertung physiologischer Testvariablen

Ein vergleichender Modellansatz ermöglichte eine Bewertung verschiedener Biomaterialien unter definierten Testbedingungen wie der Oberflächenbehandlung mit humanem autologem Blutplasma und der Stimulation mit LPS oder mit IL-4. Hierfür fanden Studien auf den Referenzmaterialien Glas, Titan, PTFE, Silikon und PE statt.

Isolierung von humanem Plasma aus Vollblut

Zur späteren Oberflächenbehandlung der Referenzmaterialien ließ sich aus humanem Vollblut durch Zentrifugation für 15 Minuten bei $2.500 \times g_0$ ohne Bremse humanes Blutplasma von den zellulären Bestandteilen des Blutes trennen. Hierbei bewirkte die Zentrifugation eine Auftrennung der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte. Die flüssigen Bestandteile des Blutes bildeten eine Schicht oberhalb der konzentrierten zellulären Bestandteile, die sich mit einer Einmalpipette aus Plastik abnehmen ließ. Für die späteren Anwendungen in den Versuchen erfolgte die Hitzeinaktivierung eines Plasmaanteils für eine Stunde bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermozykler. Anschließend ließen sich durch Zentrifugation bei $20.817 \times g_0$ für eine Minute gebildete Präzipitate abtrennen. Bis zur Anwendung in den Versuchen konnte das hergestellte hitzeinaktivierte Plasma sowie das native Plasma bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Zusätzlich ließ sich die entstandene aufgelagerte weißliche zelluläre Schicht aus peripheren mononuklearen Zellen abnehmen und Monozyten wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben isolieren. Im späteren Verfahren erfolgte die Materialtestung unter Anwendung von Plasma und Monozyten aus einem Spender.

Plasmavorbehandlung der Materialoberflächen

Zur Vorbehandlung der Materialoberflächen musste das gefrorene Plasma für 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auftauen. Anschließend folgte das gleichmäßige Verteilen des Plasmas in einem Volumenoberflächenverhältnis von $50 \text{ } \mu\text{l pro cm}^2$ auf der Biomaterialoberfläche. Die Wirkung des Stabilisators bestehend aus Citrat und Phosphat ließ sich durch Zusatz von 150 mM Calciumchloridlösung zu einer Endkonzentration von 15 mM aufheben und leitete die Koagulation des Plasmas ein. Innerhalb der anschließenden Inkubation für 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bildete sich Fibrin auf der Materialoberfläche aus.

Aussaat der primären Makrophagen auf den Referenzmaterialien

Die Varianz zwischen primären humanen Makrophagen erforderte die Testdurchführung mit Zellen von zehn individuellen Spendern ($n = 10$). Die Charakterisierung der Entzündungsreaktion von Makrophagen in Antwort auf (I) unbehandelte, (II) mit nativen plasmabehandelte und (III) mit hitzeinaktiviertem plasmabehandelte Materialoberflächen war Ziel der Studie. Weiterhin bildeten Stimulanzen im Kulturmedium das Entzündungsspektrums von M1- über M2-Makrophagen ab. Hierfür fand eine Polarisierung mit (IV) LPS (100 ng pro ml Kulturmedium) sowie (V) IL-4 (20 ng pro ml Kulturmedium) statt. In allen Versuchsansätzen erfolgte die Aussaat der Makrophagen in einer definierten Dichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 und einem Volumenoberflächenverhältnis von 0,22 ml pro cm^2 in RPMI plus 10 % fetalem Kälberserum. Die Wechselwirkung zwischen Kulturmedium und Materialoberfläche ließ sich durch die Inkubation von (VI) RPMI plus 10 % fetalem Kälberserum auf den Materialoberflächen untersuchen. Es folgte die Kultivierung für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid.

Probenentnahme im Anschluss an die 48-stündige Inkubationsphase

Im Anschluss an 48 Stunden erfolgte die Mediumgewinnung und zur Abtrennung von Zellbestandteilen eine Zentrifugation für 5 Minuten bei $10.000 \times g_0$. Bis zur Analyse der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α und TGF- β 1 waren die Zellkulturüberstände bei -20 °C zu lagern (siehe hierfür zytometrischer Nachweis mittels fluoreszenzmarkierter Partikel in Kapitel 2.1.6). Auf der Biomaterialoberfläche ließ sich direkt im Anschluss an die Versuchsdurchführung die Zellvitalität bestimmen (siehe hierfür chemilumineszenzbasierte Vitalitätsbestimmung in Kapitel 2.1.6). Die Bewertung der Zellmorphologie ermöglichte die immunhistologische Färbung von CD54 und β -Aktin in einem 8-Well-Zellkulturkammersystem (siehe hierfür immunhistologische Doppelfärbung in Kapitel 2.1.6).

Vergleichendes Bewertungs- und Rankingmodell

Nach dem Shapiro-Wilk-Test lagen die spenderabhängige Konzentration der Zytokine sowie die Daten der Vitalitätsbestimmung nicht normalverteilt vor. Daher ließen sich signifikante statistische Unterschiede zwischen den Testbedingungen mit einer Friedman ANOVA gefolgt von einem paarweisen Vergleich mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest testen. Hierfür fanden alle statistischen Tests mit der Software OriginPro statt.

Zum Vergleich der Materialien konnte ein Bewertungsmodell eingeführt werden. Hierfür waren für zwei Materialien M1 $\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n$ und M2 $\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n$ signifikante Unterschiede zwischen zwei Datensätzen aus n gemessenen Faktoren f (Messparameter) mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest festzustellen. Für alle statistischen Tests galt ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant und konnte als Bewertungsgrenze eingeführt werden:

$$\left(\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n, \{f_{M2,i}\}_{i=1}^n \right) \rightarrow \begin{cases} 0, & p > 0,05 \\ 1, & \overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n} > \overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n} \text{ und } p \leq 0,05 \\ -1, & \overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n} < \overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n} \text{ und } p \leq 0,05 \end{cases} \quad \text{Gleichung (4)}$$

Ein signifikant höherer Mittelwert für Material M1 im Vergleich zu Material M2 konnte für Material M1 in einen Signifikanzwert von eins übersetzt werden. Für einen signifikant niedrigeren Mittelwert für Material M1 im Vergleich zu Material M2 erfolgte die Bewertung von Material M1 mit einem Wert von minus eins. Wenn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialgruppen (p-Wert $> 0,05$) bestanden, erforderte dies die Eingliederung eines null Wertes in die Bewertung.

Hierbei stellt $\overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n}$ den Mittelwert des Datensatzes aus n gemessenen Faktoren f für M1 und $\overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n}$ für M2 dar. Zur Bewertung spezifischer Faktoren erfolgte die Summenbildung aus allen Signifikanzwerten des paarweisen Materialvergleichs. Dies zielte auf die messparameterabhängige Bewertung eines Materials im Vergleich zu allen anderen Materialien. Basierend auf allen Faktoren f ließ sich die messparameterabhängige Bewertung in einer Biomaterialrangordnung zusammenfassen. Hierfür erfolgte die Summenberechnung aus allen messparameterabhängigen Signifikanzwerten.

2.2.5 Dreidimensionale Gewebemodelle zur Bewertung der Fremdkörperreaktion

Die Kombination unterschiedlicher Matrixkomponenten wie Fibrin und Kollagen ermöglichte zusammen mit Fibroblasten und Monozyten den Aufbau dreidimensionaler Gewebemodelle, die eine Implantationswunde nachstellen sollten.

Herstellung eines Plasmapools

Im Gegensatz zu der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Herstellung von Plasma aus Vollblut diente gefrorenes humanes Frischplasma vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (München, Deutschland) zur Herstellung eines standardisierten Plasmapools. Hierdurch ließ sich das Plasma für einen größeren Testumfang einsetzen. Vorerst erforderte dies das Auftauen des gefrorenen Frischplasmas für 2,5 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator. Zur Standardisierung erfolgte von insgesamt zehn Plasmaspendern (n = 10) die Vereinigung gleicher Volumenanteile. Der gewonnene Plasmapool konnte bei -80 °C gelagert werden. Zur Anwendung in den nachfolgenden Versuchen tauten beispielsweise 50 ml humanes Plasma innerhalb von 2 Stunden bei 37 °C auf. Die Präzipitatablagerungen an der Wand ließen sich durch vorsichtiges Schütteln lösen.

Fibrinbildung unter Zusatz von Calcium

Die Absorptionsmessung ermöglichte die Bewertung der Fibrinbildung unter dem Zusatz unterschiedlicher Calciumkonzentrationen. Für eine optimale Fibrinbildung war die Anwendung aller Lösungen bei 37 °C Voraussetzung. In einer flachen transparenten 96-Mikrowellplatte erfolgte zu 160 µl Blutplasma der Zusatz von 20 µl Medium (DMEM plus 10 % fetales Kälberserum). Im Folgenden leitete die Zugabe von 20 µl Calciumlösung die Fibrinbildung ein. Hierbei sollte der Einfluss unterschiedlicher Calciumchloridkonzentrationen von 0 - 7,5 - 15 - 30 - 60 mM gezeigt werden. Als Referenzleerwert dienten 200 µl Wasser. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C fand die Absorptionsmessung von 280 nm bis 480 nm mit einem Abstand von 2 nm statt. Alle Versuchsansätze ließen sich in einer sechsfachen Bestimmung durchführen. Zur Auswertung der Daten erfolgte die Subtraktion des mittleren Referenzleerwerts von den jeweiligen Messwerten.

Zeitabhängige Fibrinbildung unter Zusatz von Thrombin

Die Absorptionmessung bei 320 nm im Zeitverlauf ermöglichte die Bestimmung der Fibrinbildung unter dem Einfluss verschiedener Thrombinkonzentrationen. In einer flachen transparenten 96-Mikrowellplatte ließen sich 160 µl Plasma mit 20 µl Medium (10 % fetalem Kälberserum in DMEM) und 10 µl 300 mM Calciumchloridlösung mischen. Ebenfalls in einer sechsfachen Bestimmung erfolgte anschließend der Zusatz von 10 µl Thrombinlösung zu einer Endkonzentration von 0 - 0,5 - 1 - 2 - 4 enzymatischen Einheiten pro ml Fibrinhydrogel. Über einen Zeitraum von 30 Minuten fand im Abstand von 3 Minuten die Absorptionmessung bei 320 nm statt.

Langzeitstabilisierung der Fibrinmatrix

In einer 48-Well-Zellkulturplatte ließen sich aus 100 µl Zellsuspension der Konzentration $2 \cdot 10^6$ primäre Fibroblasten pro ml DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum und 800 µl Plasma herstellen. Für zellfreie Fibrinmodelle fand anstelle der Zellsuspension der Zusatz von 100 µl DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum statt. Die Zugabe von (I) 100 µl 150 mM Calciumchloridlösung oder (II) 100 µl einer Lösung aus 150 mM Calciumchlorid und 20 enzymatischen Thrombineinheiten pro ml leitete die Gerinnung des Gemisches ein. Anschließend gelierte das Fibrin während einer Stunde bei 37 °C. Je Modell ließen sich mit Zellen von jeweils drei humanen primären Spendern Duplikate herstellen. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe von 400 µl DMEM plus 10 % fetalem Kälberserum und 100 µM Ascorbinsäurephosphat. Wie bereits von Cholewinski (2009) beschrieben, ermöglichte die zusätzliche Supplementierung des Kulturmediums mit Tranexamsäure (t-AMCA) in einer Konzentration von 160 µg pro ml eine antifibrinolytische Stabilisierung (147). Der Mediumverbrauch erforderte den Austausch des Kulturmediums an jedem zweiten bis dritten Tag. Im Anschluss erfolgte an Tag 7, 14 und 21 die Bestimmung des Nassgewichts.

Dreidimensionale Fremdkörpermodelle

Auf den Referenzmaterialien Glas, Titan und PTFE erfolgte mit primären Makrophagen von insgesamt fünf Spendern ($n = 5$) sowie mit der humanen Fibroblastenzelllinie HFF-1 der Aufbau von kollagen- und fibrinbasierten Kokulturmodellen. In direktem Kontakt zur Biomaterialoberfläche ließen sich hierfür Monozyten in ein Fibrinhydrogel einbringen. Ein fibröses kollagen- oder fibrinbasiertes Bindegewebsmodell konnte in einem Zellkulturträger-

system aufgebaut werden und auf die basale untere Modellkomponente apikal aufgebracht werden. Je Spender erfolgte der Aufbau der Modelle in Triplikaten. Auf dem Referenzmaterial Glas dienten Monokulturmodelle mit Makrophagen oder mit Fibroblasten sowie Modelle ohne Zellen als Referenz.

Basales fibrinbasiertes Gewebe

Direkt im Anschluss an die Isolierung von Monozyten aus Leukozytenkonzentrat (siehe hierfür Kapitel 2.2.1) erfolgte in direktem Kontakt zur Materialoberfläche (7 cm^2) der Aufbau von 1 ml Fibrinhydrogelen mit $1 * 10^6$ eingebrachten Monozyten. Hierfür mussten 800 μl Plasma gleichmäßig auf der Biomaterialoberfläche verteilt werden und 100 μl Zellsuspension der Konzentration $1 * 10^7$ Monozyten pro ml Kokulturmedium (RPMI plus 10 % fetales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 μM Ascorbinsäurephosphat und 160 μg pro ml t-AMCA) zugegeben werden. Ersatzweise ließen sich zellfreie Fibrinhydrogele durch Zugabe von 100 μl Kokulturmedium herstellen. Schließlich leiteten 100 μl Thrombin (20 enzymatische Einheiten pro ml) in 150 mM Calciumchloridlösung die Koagulation ein. Die Fibrinmatrix bildete sich innerhalb von 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ aus.

Apikales fibröses Bindegewebsmodell

In einem Zellkulturträgersystem mit einer Polycarbonatmembran des Porendurchmessers $0,4 \mu\text{m}$ ließen sich Bindegewebsmodelle aus (I) Fibrin sowie (II) Kollagen herstellen. In allen zellbeladenen Modellen befanden sich in einem Endvolumen von 500 μl Hydrogel $2 * 10^5$ HFF-1-Fibroblasten.

(I) Fibrinbasiertes Gewebe

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben unterstützte ein stehendes Zellkulturträgersystem den Aufbau von Fibrinhydrogelen. Zusammengefasst bestanden die Fibrinhydrogele aus 400 μl Plasma, 50 μl Zellsuspension ($4 * 10^6$ Zellen pro ml Kokulturmedium) und 50 μl Thrombin (20 enzymatische Einheiten pro ml) in 150 mM Calciumchloridlösung. Bei zellfreien Fibrinhydrogelen fand anstelle der Zellsuspension 50 μl Kokulturmedium Einsatz. Das Fibrin gelierte für 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

(II) Kollagenbasiertes Gewebe

Für die zellbeladenen kollagenbasierten Bindegewebsmodelle ließen sich HFF-1-Fibroblasten ($1,2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) in Gelneutralisierungslösung II aufnehmen und im Verhältnis eins zu zwei mit Kollagen I (7,2 mg pro ml in 0,1 % Essigsäure) mischen. Zellfreie Kollagenmodelle konnten mit zwei Volumenanteilen Kollagen Typ I und einem Volumenanteil Gelneutralisierungslösung II hergestellt werden. Innerhalb von 30 Minuten bei 37 °C gelierte das Kollagen. Im Anschluss an die Inkubationsphase ließen sich die (I) fibrinbasierten und (II) kollagenbasierten Bindegewebsmodelle im Zellkulturträgersystem auf die basalen Fibringewebe aufsetzen.

Kulturbedingungen der dreidimensionalen Fremdkörpermodelle

Die Kultivierung der Gewebemodelle erfolgte in 2 ml Kokulturmedium (RPMI plus 10 % fetales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 µM Ascorbinsäurephosphat und 160 µg pro ml t-AMCA). Die Zugabe von zusätzlich 40 ng pro ml M-CSF für die ersten 6 Tage unterstützte die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. Der Mediumverbrauch erforderte den Austausch des Kulturmediums an jedem zweiten oder dritten Tag.

Aufarbeitung der Modelle für die anschließende Analytik

Nach 13 Tagen ließ sich das Kulturmedium abnehmen und für 5 Minuten bei $10.000 \times g_0$ zentrifugieren. Bis zur Analyse der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α und TGF- β 1 lagerten die Zellkulturüberstände bei - 20 °C. Anschließend war separat das Nassgewicht des basalen und apikalen Gewebes zu erfassen. Je Spender fand die Gewichtsbestimmung für zwei Modelle statt. Für die anschließende Charakterisierung von Kollagen I und β -Aktin im Westernblot ließen sich die Bindegewebeinheiten bei - 80 °C lagern. Auf der Materialoberfläche folgte eine Vitalitätsbestimmung mit dem CellTiter-Glo-Nachweis. Für die spätere histologische Aufarbeitung erfolgte eine Fixierung des Modells über Nacht in 4 % Paraformaldehyd. Nach einer Azanfärbung ließ sich wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 beschreiben die mittlere Cyanintensität der histologischen Schnitte quantitativ auswerten. Zur exemplarischen Darstellung erfolgte für alle Bilder die Einstellung des Kontrasts. Bei der durchgeführten immunhistologischen Kollagen-III-Färbung war keine Bildbearbeitung erforderlich. Die Durchführung der Analysen ist in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

Statistische Auswertung der kontinuierlichen, spenderunabhängigen Daten

Eine Normalverteilung der kontinuierlichen, spenderunabhängigen Daten bestand nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht. Für die nicht normalverteilte Daten erfolgte zum paarweisen Vergleich der Daten eine Kruskal-Wallis-ANOVA mit anschließendem Man-Whitney-Test. Das Signifikanzniveau war mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant festgelegt.

Hauptkomponentenanalyse

Die multifaktoriellen, quantitativ erfassten Daten ließen sich in einer Hauptkomponentenanalyse reduzieren und die Datensätze so auf eine Klassifizierung der Messparameter und der Versuchsgruppen prüfen. Die Zentrierung der Daten auf den Mittelwert und die Skalierung auf die Standardabweichung ermöglichte unabhängig vom Messbereich und den Messeinheiten eine gleiche Gewichtung der Messparameter. Hierdurch ergaben sich im berechneten Datensatz für den Mittelwert ein Wert von 0 und eine Varianz von 1. Mit dem Programm UnscramblerX ließ sich eine Hauptkomponentenanalyse mit der generierten Datenmatrix durchführen. Zur Untersuchung der Unterscheidungskapazität zwischen den Referenzmaterialien umfasste die Hauptkomponentenanalyse die Daten aus den Kokulturmodellen. Hierbei erfolgte eine getrennte Analyse der kollagenbasierten Modelle und der fibrinbasierten Modelle.

2.2.6 Biochemische, immunologische und histologische Nachweisverfahren

Azanfärbung nach Heidenheim von paraffineingebetteten Gewebeschnitten

Die Azanfärbung nach Heidenheim ermöglichte eine Färbung von Kollagenstrukturen in blau und eine Färbung von Fibrinstrukturen in Rot. Die Färbung von den in Kapitel 2.2.3.2 und Kapitel 2.2.5 beschriebenen Gewebemodellen erfolgte an paraffineingebetteten Gewebeschnitten nach einem modifizierten Färbeprotokoll (Morphisto, Frankfurt, Deutschland). Die 5- μ m-dicken Gewebsschnitte ließen sich auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufziehen. Die aufgezogenen Gewebsschnitte hafteten über Nacht bei 37 °C an die Glasoberfläche an. Anschließend folgte für 60 Minuten im Wärmeschrank bei 63 °C das Schmelzen des am Gewebeschnitt anhaftenden Paraffins. Das modifizierte Färbeprotokoll ist in Tabelle 2-15 dargestellt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-15 Optimierte Vorgehensweise zur Azanfärbung nach Heidenheim.

| Lösung | Inkubationszeit | Arbeitstemperatur | Funktion |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Xylol | 5 Minuten | Raumtemperatur | Deparaffinierung |
| Xylol | 5 Minuten | | |
| Ethanol (96 %ig, denaturiert) | 4 Minuten | Raumtemperatur | Wässern |
| Ethanol (96 %ig, denaturiert) | 4 Minuten | | |
| Anilinalkohol | 1 Minute | Raumtemperatur | Vorbehandlung |
| Destilliertes Wasser | 10 Sekunden | Raumtemperatur | Waschen |
| Azokarmin | 45 Minuten | 60 °C | Färben |
| Destilliertes Wasser | 10 Sekunden | Raumtemperatur | Differenzieren |
| Essigsaurer Alkohol (1 %ig) | 1 Minute | Raumtemperatur | Abstoppen |
| Destilliertes Wasser | 10 Minuten | Raumtemperatur | Waschen |
| Phosphorwolframsäure (5 %ig) | 60 Minuten | Raumtemperatur | Beizen |
| Destilliertes Wasser | 1 Minuten | Raumtemperatur | Waschen |
| Anilin-Blau-Orange-G | 60 Minuten | Raumtemperatur | Färben |
| Destilliertes Wasser | 10 Sekunden | Raumtemperatur | Entfärben |
| Ethanol (96 %ig, denaturiert) | 2 Minuten | Raumtemperatur | Wässern |
| Ethanol (96 %ig denaturiert) | 3 Minuten | | |
| Isopropanol | 2 Minuten | | |
| Xylol | 3 Minuten | | |
| Xylol | 3 Minuten | | |

Anschließend ermöglichte das Eindecken mit Entellan eine Versiegelung der Färbung.

Chemilumineszenzbasierte Vitalitätsbestimmung mit dem CellTiter-Glo-Nachweis

Im Anschluss an die Versuchsdurchführung (siehe Kapitel 2.2.4 und 2.2.5) ließ sich die Biomaterialoberfläche mit PBS waschen und der Überstand absaugen. Vor der Anwendung im Testverfahren war die Verdünnung des CellTiter-Glo-Reagenz mit einem gleichen Volumenanteil Medium erforderlich (die Wahl des entsprechenden Mediums orientierte sich an der Versuchsdurchführung). In einem Volumenoberflächenverhältnis von 78 μl pro cm^2 folgte das Aufbringen des verdünnten Reagenz. Nach 2 Minuten Inkubation auf einem Schüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute inkubierte die Platte für weitere 10 Minuten unter Lichtausschluss. Während der Inkubationszeit ermöglichte eine ATP-abhängige Reaktion die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin. Nach der Inkubation stoppte das Überführen des Überstands in eine 24-Wellplatte die Reaktion. In Abhängigkeit von der getesteten

Materialoberfläche ließ sich das Volumen in Duplikate oder Triplikate von jeweils 200 µl aufteilen und in eine schwarze 96-Mikrowellplatte überführen. Die Lumineszenz war in einem Mikroplattenmessgerät zu bestimmen.

Enzymgekoppeltes immunadsorbierendes Nachweisverfahren von TGF-β1, FGF und PDGF im Zellkulturüberstand (englisch enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

Die Konzentrationsbestimmung der humanen Wachstumsfaktoren TGF-β1, FGF und PDGF in konditioniertem Medium sowie in Referenzmedium (siehe Kapitel 2.2.3.1, 2.2.4 und 2.2.5) erfolgte mit einem ELISA nach Angaben der Hersteller. Der durchgeführte enzymgekoppelte Immunnachweis beruht auf der Bindung des Analyt an oberflächenadsorbierte Antikörper. In einem zweiten Schritt bildet ein zweiter Antikörper zusammen mit dem oberflächenadsorbierten Immunkomplex einen Sandwich aus Primärantikörper, Analyt und Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist hierbei biotinmarkiert und ermöglicht die Bindung des Enzyms Meerrettichperoxidase (englisch horseradish peroxidase, HRP) an den Komplex. Das Enzym wiederum setzt ein Substrat zu einem farbigen Produkt um, das photometrisch bestimmt werden kann.

Humaner TGF-β1-ELISA

An die Oberfläche lagen anti-human TGF-β1-Primärantikörper gebunden vor und ermöglichten nach Vorbereitung der Proben den direkten Einsatz der 96-Mikrowellplatte. Zuvor waren 20 µl Probe in 180 µl Analysepuffer (PBS mit 1 % Tween und 10 % bovinem Serumalbumin) zu verdünnen. Die Aktivierung der Probe erfolgte mit 20 µl 1 N Salzsäure; hierfür waren die Lösungen gut zu mischen und für eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Die anschließende Zugabe von 20 µl 1 N Natriumhydroxidlösung neutralisierte den sauren pH-Wert. Der TGF-β1-Konzentrationsstandard (4 ng pro ml) ließ sich in destilliertem Wasser homogen durch Mischen und 30 Minuten Inkubation konstituieren. Im Anschluss fand in Analysepuffer eine serielle Verdünnung des Standards von 200 auf 0 pg pro ml statt. Die zweimalige Inkubation für 10 bis 15 Sekunden mit Waschpuffer (1 % Tween in PBS) ermöglichte das Befeuchten der 96-Mikrowellplatte. Pro Well folgte das Auftragen von jeweils (I) 100 µl Standard oder (II) 40 µl säureaktivierte Probe plus 60 µl Analysepuffer im Duplikat. Nach dem Verschließen mit einer Inkubationsfolie inkubierte die Platte für 2 Stunden auf einem Schüttler (400 Umdrehungen pro Minute). Nachfolgend war die Platte fünfmal für 10 bis 15 Sekunden mit jeweils 400 µl Waschpuffer zu waschen. Letztendlich

schloss die Beladung mit 100 µl biotinkoppeltem Sekundärantikörper und die Inkubation für eine Stunde auf dem Schüttler (400 Umdrehungen pro Minute) an. Wie bereits beschrieben folgte das fünfmalige Waschen der Platte. Die Zugabe von 100 µl streptavidin-gekoppelter HRP zu jedem Well und die Inkubation für eine Stunde auf dem Schüttler (400 Umdrehungen pro Minute) ermöglichte die enzymatische Kopplung an die biotinkoppelten Sekundärantikörper. Anschließend war die Platte erneut fünfmal zu waschen. Im nächsten Schritt ermöglichte die indirekt TGF-β1-gekoppelte HRP die Umsetzung von 100 µl Tetramethylbenzidinsubstrat (TMB, gelb) zum blauen Diimin. Bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm war die lichtsensitive Reaktion bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,9 des höchsten Standards (200 pg pro ml) durch 100 µl 1 M Phosphorsäure zu stoppen. Die Messung fand anschließend im Mikroplattenmessgerät bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm statt. Als Referenzwellenlänge diente eine Wellenlänge von 570 nm.

Humaner FGF- und PDGF-ELISA

Die Bestimmung der FGF- und PDGF-Konzentration erforderte die Oberflächenbeschichtung einer Maxisorb-96-Mikrowellplatte mit 100 µl des jeweiligen Primärantikörpers in einer Konzentration von 1 µg pro ml PBS über Nacht. Im Folgenden war die Platte viermal mit jeweils 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween in PBS) zu waschen. Anschließend ließen sich freie Bindungsstellen der Oberfläche mit 300 µl Blockierungspuffer (1 % bovines Serumalbumin in PBS) durch Inkubation für eine Stunde belegen. Daraufhin folgte das erneute viermalige Waschen. Als Standard fand eine serielle Verdünnung von 10 bis 0 ng pro ml in PBS mit 0,05 % Tween und 0,1 % bovinem Serumalbumin Anwendung. Im Anschluss ließen sich 100 µl Standard oder 100 µl Probe jeweils im Duplikat aufbringen und für 2 Stunden inkubieren. Vor dem Auftragen von 100 µl biotinkoppelte Sekundärantikörper (500 ng pro ml) waren vier weitere Waschschrte erforderlich. Nach einer Inkubation für 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper fanden anschließend vier Waschschrte statt. Während einer Inkubation für 30 Minuten konnten 100 µl avidin-gekoppeltes HRP-Konjugat an die Antikörper binden. Anschließend folgten weitere vier Waschschrte. Für die Umsetzung des chromogenen Substrats zu seinem grügefärbten Dianion ließen sich 100 µl 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphon)-Säure-Substratlösung (ABTS, farblos) aufbringen. Bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von

650 nm erfolgte die Messung der Farbumsetzung im zeitlichen Verlauf. Zur Konzentrationsbestimmung sollte die optische Dichte des höchsten Standards 1,2 Einheiten betragen.

Immunhistologische Doppelfärbung von CD54 und β -Aktin

Nach einem Standardprotokoll erfolgte die immunhistologische Färbung der Makrophagen auf den Materialoberflächen (siehe Versuchsdurchführung Kapitel 2.2.4 und Zusammenfassung der verwendeten Antikörper Tabelle 2-16).

Tabelle 2-16 Zusammenfassung der verwendeten Antikörper und Toxine.

| Antikörper und Toxine | Expression des Antigens | Spezies und Reaktivität | Verdünnung |
|---|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| CD54, ICAM-1 | extrazellulär | Maus, anti-human | 1:100 |
| Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488) | unspezifisch | Esel, anti-murin | 1:400 |
| Anti- β -Aktin-Phalloidintoxin (Alexa Fluor 555) | intrazellulär | keine | 1:40 |

Hierfür war das Fixieren der Zellen für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd notwendig. Für die intrazelluläre β -Aktinfärbung mussten die Zellen zusätzlich für 5 Minuten in 100 μ l PBS plus 0,2 % Triton-X permeabilisiert werden. Eine Inkubation für 20 Minuten in Antikörperverdünnungslösung mit 5 % Eselserum blockierte die unspezifische Antikörperbindung. Im Anschluss folgte die Inkubation des primären Anti-CD54-Antikörpers in der Verdünnung 1:100 bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag waren drei Waschschrte mit 0,5 % Tween in PBS durchzuführen. Für 60 Minuten inkubierte anschließend der fluorophorgekoppelte Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488, grün) in einer Verdünnung von 1:400 auf den Oberflächen. Es folgte ein weiterer Waschschrte. Für die β -Aktinfärbung schloss die Inkubation mit dem fluorophorgekoppelten Phalloidintoxin (Alexa Fluor 555, rot) in der Verdünnung 1:40 in PBS plus 1 % bovinem Serumalbumin für 20 Minuten im Dunkeln an. Nachfolgend waren zwei Waschschrte der Objektträger erforderlich. Die Zellkernfärbung und die Versiegelung erfolgten mit Dapi in Fluoromount. Die gefärbten Zellen auf Glas-, PTFE- und Titanoberflächen ließen sich an einem Konfokalmikroskop aufnehmen. Mit der Software ImageJ ließ sich der Hintergrund von allen Bildern abziehen und der Kontrast optimal einstellen. Hierbei waren alle Bilder gleichermaßen zu behandeln. Wegen der Oberflächenbeschaffenheit, der optischen Eigenschaften und des Arbeitsabstands waren Aufnahmen von Silikon- und PE-Oberflächen nicht möglich.

Immunhistologische Doppelfärbung von CD54 und CD163

Die Makrophagen auf Glasoberflächen (siehe dreidimensionale Gewebemodelle in Kapitel 2.2.5) fixierten vor der Färbung für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd und permeabilisierten für 5 Minuten durch 0,5 % Tween in PBS. Die unspezifische Antikörperbindung ließ sich mit 5 % Eselserum in Antikörperverdünnungslösung und Inkubation für 30 Minuten blockieren. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der primären Antikörper (I) CD54 im Verhältnis 1:100 und (II) CD163 im Verhältnis 1:200 in Antikörperverdünnungspuffer und die gleichzeitige Inkubation beider Antikörper auf den Glasoberflächen über Nacht bei 4 °C (siehe Tabelle 2-17).

Tabelle 2-17 Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die kombinierte Färbung von CD54 und CD163.

| Antikörper | Antigenexpression | Spezies und Reaktivität | Verdünnung |
|---|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| CD54, ICAM-1 | extrazellulär | Maus, anti-human | 1:100 |
| CD163 | extrazellulär | Kaninchen, anti-human | 1:200 |
| Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488) | unspezifisch | Esel, anti-murin | 1:500 |
| Sekundärantikörper (Alexa Fluor 647) | unspezifisch | Esel, anti-Kaninchen | 1:500 |

Vor der Inkubation mit den sekundären Antikörpern waren die Oberflächen dreimal in PBS plus 0,5 % Tween für 5 Minuten zu waschen. Für die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe inkubierten die sekundären Antikörper gegen die Spezies (I) Maus und (II) Kaninchen in der Verdünnung 1:500 in Antikörperverdünnungslösung für 1 Stunde auf der Oberfläche. Es schlossen drei weitere Waschschritte an. Die wässrige Färbung ließ sich nachfolgend mit Fluoromount und Dapi eindecken.

Immunhistologische Färbung von Kollagen III in paraffineingebetteten Gewebsschnitten

Die Silanisierung der Objektträger für 1 Minute in 2 % Silanacetonlösung erzielte ein verbessertes Anhaften der aufgezogenen Gewebsschnitte. Anschließend waren die Objektträger zweimal für jeweils 1 Minute in Aceton zu waschen und über Nacht zu trocknen. Für die Färbung folgte das Aufziehen von 5-µm-dicken Gewebeschnitten (siehe Kapitel 2.2.5 Herstellung von dreidimensionalen Gewebemodellen) auf die Objektträger und das Anhaften dieser an die Glasoberfläche bei 37 °C über Nacht. Die Inkubation für 60 Minuten bei 63 °C

2. Material und Methoden

ermöglichte das Schmelzen des am Gewebe anhaftenden Paraffins. Im Anschluss ließen sich die Gewebsschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinieren und hydrophilisieren (siehe Tabelle 2-18).

Tabelle 2-18 Entparaffinieren der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe.

| Lösung | Inkubationszeit | Arbeitstemperatur | Funktion |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Xylol | 10 Minuten | Raumtemperatur | Entparaffinieren |
| Xylol | 10 Minuten | | |
| Ethanol 96 %, denaturiert | 2 Minuten | Raumtemperatur | Wässern |
| Ethanol 70 %, denaturiert | 2 Minuten | | |
| Ethanol 50 % | 2 Minuten | | |
| Demineralisiertes Wasser | Kurz eintauchen | | |

Die Inkubation der Schnitte in Demaskierungspuffer ermöglichte unter Erhitzen in einem Dampfgarer die Demaskierung der Epitope (die Wahl des Demaskierungspuffers richtete sich nach dem jeweiligen Primärantikörper, siehe hierfür Tabelle 2-19).

Tabelle 2-19 Aufschluss der Epitope mit Demaskierungspuffer.

| Antikörper | Demaskierungspuffer | Inkubationszeit | Arbeitstemperatur |
|--------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| Kollagen III | Natriumcitratpuffer, pH 6,0 | 20 Minuten | Hitze |

Nach dem Abkühlen für 20 Minuten folgte das Überführen der Gewebeschnitte in demineralisiertes Wasser und mit einem Fettstift die Umrandung des Schnitts. Im Gewebe vorkommende endogene Peroxidasen erforderten eine Inaktivierung für 10 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung. Die Objektträger waren nachfolgend in PBS plus 0,5 % Tween einmal kurz und anschließend erneut für 2 Minuten zu waschen. Das Blockieren der Proteinbindungsstellen mit jeweils 5 % Ziegen- und Eselserum für 30 Minuten reduzierte die unspezifische Bindung des Primärantikörpers. Die Bindung des Primärantikörpers (siehe Tabelle 2-20) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag waren erneut drei Waschschriffe für 5 Minuten in PBS plus 0,5 % Tween durchzuführen.

Tabelle 2-20 Eigenschaften des verwendeten Primärantikörpers.

| Antikörper | Expression des Antigens | Spezies und Reaktivität | Verdünnung |
|--------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| Kollagen III | extrazellulär | Kaninchen | 1:200 |

2. Material und Methoden

Die Bindung des Primärantikörpers an das Epitop des Antigens ließ sich durch Inkubation für 10 bis 20 Minuten mit 1 bis 2 Tropfen eines HRP-Polymer-DAB-Systems bestehend aus Polymerverstärker, sekundärem Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Antikörpern nachweisen. Anschließend fanden drei weitere Waschschriffe für 5 Minuten in PBS plus 0,5 % Tween statt. Im nächsten Schritt inkubierte die DAB-Lösung bestehend aus 30 µl DAB-Konzentrat in 1 ml DAB-Puffer unter mikroskopischer Kontrolle auf dem Gewebe. Nach 5 bis 7 Minuten war die Farbentwicklung durch das Waschen für 5 Minuten in PBS plus 0,5 % Tween zu stoppen. Anschließend folgte die Gegenfärbung der Zellkerne nach einem Standardprotokoll zur sauren Hämatoxylinfärbung nach Mayer (siehe Tabelle 2-21).

Tabelle 2-21 Färbeprotokoll nach Mayer zur sauren Hämatoxylinfärbung.

| Lösung | Inkubationszeit | Arbeitstemperatur | Funktion |
|---------------------------|-----------------|-------------------|------------|
| Demineralisiertes Wasser | kurz Schwenken | Raumtemperatur | Wässern |
| Hämatoxylinlösung | 15 Minuten | Raumtemperatur | Färben |
| Demineralisiertes Wasser | kurz Schwenken | Raumtemperatur | |
| Handwarmes Leitungswasser | 10 Minuten | Raumtemperatur | Bläuen |
| Ethanol (70 %ig) | 2 Minuten | Raumtemperatur | Entwässern |
| Ethanol (96 %ig) | 2 Minuten | | |
| Isopropanol | 2 Minuten | | |
| Isopropanol | 2 Minuten | | |
| Xylol | 2 Minuten | | |
| Xylol | 2 Minuten | | |
| Ethanol (96 %ig) | 2 Minuten | | |
| Isopropanol | 2 Minuten | | |
| Isopropanol | 2 Minuten | | |
| Xylol | 2 Minuten | | |
| Xylol | 2 Minuten | | |

Raster Elektronenmikroskopie

Die Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie erforderte das Entwässern des Gewebes (siehe Kapitel 2.2.5 zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebemodellen). Vorerst erfolgten vier Waschschriffe in PBS und die Fixierung für zweimal 10 Minuten mit 6 % Glutardialdehyd in PBS. Anschließend waren die Proben fünfmal für jeweils 5 Minuten in PBS auf Eis zu waschen. Es folgte eine Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden

2. Material und Methoden

Acetonreihe (siehe Tabelle 2-22). Die kritische Punkttrocknung der Gewebeproben ließ sich in einem automatisierten Trocknungssystem durchführen. Im Kammersystem war das Überführen der Proben in 100 % Aceton erforderlich.

Tabelle 2-22 Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe.

| Lösung | Inkubationszeit |
|------------------|------------------------|
| Aceton (30 %ig) | 15 Minuten |
| Aceton (50 %ig) | 20 Minuten |
| Aceton (75 %ig) | 30 Minuten |
| Aceton (90 %ig) | 45 Minuten |
| Aceton (100 %ig) | 6 x 30 Minuten |

Bei 8 °C unter Druck (73,75 bar) verdrängte flüssiges Kohlenstoffdioxid das Aceton. Die Gewebeproben ließen sich bei einer Temperatur von 40 °C in den kritischen Zustand (kritischer Punkt von Kohlenstoffdioxid: 30,98 °C bei einem Druck von über 73,75 bar) überführen und trockneten hierbei. Anschließend ermöglichte ein Hochvakuumbeschichtungsverfahren das Aufbringen von Platin (1 nm) auf die Gewebeproben. Die Aufnahmen erfolgten an einem Rasterelektronenmikroskop Supra 25 von Zeiss (Oberkochen, Deutschland) mit einer Beschleunigungsspannung von 2 kV.

Westernblot

Mittels Gelelektrophorese können Proteinmischungen in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Hierfür erforderlich waren der Aufschluss der Gewebeproben (siehe Kapitel 2.2.5), die Bestimmung und das Einstellen der Proteinkonzentration. Zusätzlich zu den Versuchsproben dienten 200 mg humane Haut als Vergleichswert für den Kollagengehalt in einem nativen Gewebe. Ergänzend ermöglichte eine Zellsuspension von $4 \cdot 10^6$ HFF-1-Fibroblasten pro ml RIPA-Puffer als Maximalwert die Berechnung der relativen Expressionsdichte. Die Lyse des Gewebes erfolgte durch Zugabe von 480 µl RIPA-Puffer sowie 20 µl Proteaseinhibitor. Anschließend ermöglichten drei Ultraschallbehandlungszyklen mit einer Amplitude von 10 % für jeweils 10 Sekunden den Aufschluss der eisgekühlten Gewebeproben. Während dem Aufschlussverfahren diente eine Pause von 20 Sekunden dem Kühlen der Proben zwischen den Zyklen. Im nächsten Schritt ermöglichten drei Gefrierzyklen zwischen flüssigem Stickstoff (-196 °C) und temperiertem Wasser (37 °C) den weiteren Aufschluss. Eine Zentrifugation bei $10.000 \times g_0$ für 20 Minuten

konnte unlösliche Bestandteile abtrennen. Der Überstand ließ sich bei - 20 °C eingefroren Lagern.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand mit dem DC-Proteinnachweis nach Angaben des Herstellers Biorad (München, Deutschland) statt. Im Detail erfolgte eine serielle Verdünnung eines Albuminstandards von 2000 bis 0 µg Protein pro ml RIPA-Puffer. Die Probenkonzentration ließ sich mit unverdünnten, zehnfach, zwanzigfach und fünfzigfach in RIPA-Puffer verdünnten Proben bestimmen. Der kolorimetrische Nachweis erforderte die Zugabe von (I) 50 µl Standard oder (II) 50 µl Probe sowie 25 µl Kupferartratlösung und 200 µl Folinreagenz in eine 96-Mikrowellplatte. Hierbei reagierte Kupfer mit den Proteinen und oxidierte die Peptide durch Reduktion des Folinreagenz. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln ließ sich die Farbentwicklung bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm in einem Mikroplattenmessgerät messen. Die mitgeführte serielle Verdünnung des Standardproteins Albumin ermöglichte den Rückschluss auf die Proteinkonzentration der Proben. Für den Einsatz im Westernblot erfolgte im Anschluss die Fällung definierter Proteinmengen: für die Kollagenmodelle waren pro Ansatz 20 µg Protein und für die Fibrinmodelle 50 µg Protein sowie 20 µg Protein von HFF-1-Fibroblasten und humaner Haut vorzubereiten. Das entsprechende Volumen der Proteinlösung ließ sich mit ultrareinem Wasser auf ein Endvolumen von 200 µl einstellen. Die Proteinlösung war schrittweise durch 800 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 600 µl ultrareinem Wasser zu ergänzen - jeder Schritt erforderte ausreichendes Mischen der Komponenten. Die Zentrifugation für 5 Minuten bei 20.817 x g₀ ermöglichte eine Auftrennung in eine organische untere Phase aus Chloroform und eine hydrophile obere Phase aus Wasser und Methanol. In der organischen unteren Phase lagen die Proteine gelöst vor. Der hydrophile Überstand war anschließend zu verwerfen. Nach der Proteinfällung mit 800 µl Methanol erfolgte das Pelletieren der Proteine durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.817 x g₀. Nach dem Entfernen des Überstands ließ sich das Proteinpellet an der Luft trocknen. Anschließend ließen sich die Proteine in 12 µl RIPA-Puffer plus 3 µl fünffachkonzentriertem Laemmli-Puffer lösen und die Denaturierung der Proteine durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95 °C durchführen.

Als Trägermaterial in der Elektrophorese dienten Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgele. Hierbei bindet Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) an die hydrophoben Regionen des Proteins und hebt so die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureendgruppen auf. Die entfaltete Struktur der SDS-Komplexe verschiedener Proteine unterscheidet

2. Material und Methoden

sich bei vergleichbaren hydrodynamischen Eigenschaften in ihrer Größe und ist damit unabhängig von der ursprünglichen Proteinladung. Die anschließende Elektrophorese trennte die SDS-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Porengröße des Gels konnte so variiert werden, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergab. Für Prokollagen I mit einem Molekulargewicht von 140 kDa eigneten sich Trenngele mit einem Acrylamidanteil von 5 %; für den Nachweis von β -Aktin (43 kDa) fanden Trenngele mit einem Acrylamidanteil von 10 % Verwendung (Herstellung siehe Tabelle 2-23).

Tabelle 2-23 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

| SDS-Elektrophoresegel | Zusammensetzung | Volumen |
|-----------------------|----------------------|------------|
| 5 %iges Trenngel | Tris (2 M, pH 8,8) | 2 ml |
| | SDS (20 %) | 50 μ l |
| | Acrylamid (37,5:1) | 1,7 ml |
| | H ₂ O | 6,2 ml |
| | TEMED | 5 μ l |
| | APS (10 %) | 60 μ l |
| 10 %iges Trenngel | Tris (2 M, pH 8,8) | 2 ml |
| | SDS (20 %) | 50 μ l |
| | Acrylamid (37,5:1) | 3,3 ml |
| | H ₂ O | 4,6 ml |
| | TEMED | 5 μ l |
| | APS (10 %) | 60 μ l |
| 5 %iges Sammelgel | Tris (0,5 M, pH 6,8) | 1,5 ml |
| | SDS (20 %) | 50 μ l |
| | Acrylamid (37,5:1) | 1,7 ml |
| | H ₂ O | 6,7 ml |
| | TEMED | 10 μ l |
| | APS (10 %) | 90 μ l |

Nach einer Gelierphase von 30 Minuten ließ sich ein 5 %iges Sammelgel auf das Trenngel aufschichten. Für die Elektrophorese war die Kammer mit Laufpuffer zu befüllen und jede Geltasche vor dem Beladen ausreichend zu spülen. Die Taschen des Gels ließen sich mit 5 μ l Proteinmarker oder 15 μ l Proteinlösung beladen. Mit Hilfe des Proteinmarkers bestehend aus Eichproteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht zwischen 4,6 und 300 kDa fand später die Einordnung des Molekulargewichts des untersuchten Proteins statt. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem elektrischen Feld unter konstanter Spannung von 100 V für

2 Stunden (peq-Lab EV243 Netzteil). Im Anschluss folgte durch ein elektrisches Feld senkrecht zum Trenngel das Übertragen der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine adsorbierende Membran. Dadurch ließ sich eine Kopie des Gels, ein Abklatsch, herstellen. Hierfür erforderlich war das Aufziehen des Trenngels auf eine Nitrocellulosemembran des Porendurchmessers von 0,2 µm. Auf jeder Seite dienten drei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman) der Feuchthaltung des Sandwichs. Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran fand für 2 Stunden mit einer Stromstärke von 1 mA pro cm² Gelfläche statt (peq-Lab EV202 Netzteil). Der Proteintransfer auf eine Membran ermöglichte den nachfolgenden antikörpervermittelten Nachweis einzelner Proteine. Die Immundetektion erforderte das Blockieren der restlichen Proteinbindungsstellen der adsorbierenden Membran. Hierfür war die Nitrocellulosemembran mit 5 % Milch in TBST für 1 Stunde zu blocken. Im Folgenden konnte die Detektion des Proteins mit einem Primärantikörper in der Verdünnung 1:1000 in TBST plus 5 % Milchpulver sowie 0,05 % Natriumazid erfolgen. Der Primärantikörper inkubierte auf der Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler (200 Umdrehungen pro Minute). Am nächsten Morgen waren drei Waschschrte für 15 Minuten auf einem Schüttler (200 Umdrehungen pro Minute) erforderlich (siehe Tabelle 2-24).

Tabelle 2-24 Zusammenfassung der im Westernblot verwendeten Antikörper.

| Antikörper | Expression des Antigens | Spezies und Reaktivität | Verdünnung |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Kollagen I | extra- / intrazellulär | Schaf, anti-human | 1:1000 5 % Milch in TBST |
| β-Aktin | intrazellulär | Maus, anti-human | 1:1000 5 % Milch in TBST |
| Sekundär-antikörper | unspezifisch | Ziege, anti-Maus | 1:10000 5 % Milch in TBST |
| Sekundär-antikörper | unspezifisch | Esel, anti-Schaf | 1:10000 5 % Milch in TBST |

Ein Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper war in der Verdünnung 1:10000 in TBST plus 5 % Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran zu inkubieren. Anschließend erfolgten drei Waschschrte der Membran für 15 Minuten in TBST auf dem Schüttler. Der mit einer Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper katalysierte die Oxidation von Luminol und ermöglichte so einen antikörpervermittelten Chemilumineszenznachweis des Proteins. Hierfür erfolgte die Entwicklung der Membran mit einer Mischung aus 1 ml Luminolverstärkerlösung und 1 ml Peroxidlösung. Mit dem Bilderfassungssystem

FluorochromQ ließ sich nach einer Minute die Chemilumineszenz aufnehmen. Die Bestimmung der Bandendichte erforderte die Umwandlung des erfassten Bildes in ein 8-Bit-Bild (Graustufen) mit der Software ImageJ. Der Hintergrund der Bilder war einheitlich von allen Bildern abzuziehen und der Kontrast einzustellen. Das Analysetool von ImageJ ermöglichte die Bestimmung der Fläche unter dem Histogramm der Grauverteilung. Die relative Dichte ließ sich als Flächenquotient von der jeweiligen Versuchsgruppe zu einem Referenzwert berechnen. In diesen Versuchen erfolgte die Normierung der relativen Dichte auf die Bande der Zellsuspension aus HFF-1-Fibroblasten.

Zytometrischer Nachweis von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α im Zellkulturüberstand mittels fluoreszenzmarkierter Partikel (englisch cytometric bead array, CBA)

Eine quantitative Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand (siehe Versuchsdurchführung Kapitel 2.2.4 und 2.2.5) ermöglichte eine zerstörungsfreie Charakterisierung des Entzündungsgeschehens. Ergänzend zur Analyse einzelner Zytokine mit dem ELISA konnte ein gebündeltes Nachweisverfahren „Cytometric Bead Array“ (CBA) gleichzeitig mehrere Zytokine in einem geringen Probenvolumen nachweisen. Das Verfahren basiert auf der Bindung des Analyten an einen APC-fluoreszenzmarkierten Fängerpartikel (APC, Allophycocyanin) und der anschließenden konzentrationsabhängigen Bindung eines zweiten PE-fluoreszenzmarkierten Detektionspartikels (PE, Phycoerythrin) an diesen Komplex. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit einem Durchflusszytometer.

Mit einem vordefinierten Entzündungsanalyseset ließen sich die humanen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg, Deutschland) bestimmen. Vorbereitend waren die Standardsphären in 2 ml Analysepuffer für 15 Minuten vorsichtig zu mischen. Anschließend fand eine serielle Verdünnung des Standards von 5000 bis 0 pg pro ml in Analysepuffer statt. Für den Nachweis ließen sich von jedem Fängerpartikel 2,5 μ l mischen. Anschließend folgte die zweifache, zehnfache und hundertfache Verdünnung der Proben in Analysepuffer. Nachdem dem Befeuchten einer 96-Mikrowellplatte mit 100 μ l Waschpuffer und dem Verwerfen des Überstands folgte das Aufbringen von jeweils 12,5 μ l Partikelmix, (I) Standard oder (II) Probe und Detektionsreagenz (PE-gekoppelt). Hierbei war bei jeder Zugabe durch Mischen eine Agglomeration der Partikel zu vermeiden. Hierfür erfolgte die Inkubation der Platte für 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute auf dem Schüttler. Während den folgenden 3 Stunden

bildeten sich Komplexe aus Fängerpartikel, Zytokinen und Detektionspartikeln. Überschüssige Partikel ließen sich mit 200 µl Waschpuffer und der nachfolgenden Zentrifugation für 5 Minuten bei $200 \times g_0$ entfernen. Für die Analyse waren die Proben in 200 µl Waschpuffer aufzunehmen. Im Durchflusszytometer fand zur Bestimmung der Konzentration die Detektion von 1800 Partikeln statt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software FCAP Array.

2.2.7 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Software OriginPro. Für jedes entwickelte Modellsystem ist die Wahl des jeweiligen Tests am Ende der Kapitel 2.2.3, 2.2.4 und 2.2.5 separat zusammengefasst. Die Graphiken konnten mit der Software R erstellt und in der Software Visio zusammengestellt werden. Die Graphiken sowie Darstellungen im Text entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler; hierbei soll der Standardfehler die Verlässlichkeit des Mittelwerts ausdrücken. Ausschließlich die Ergebnisse der zytometrischen Charakterisierung von Monozyten- und Makrophagen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und verdeutlichen in diesem Fall die geringe Varianz zwischen den Spendern.

3. Ergebnisse

Aufgrund der zentralen Funktion von Makrophagen, einen Fremdkörper sensorisch zu erfassen und das erfasste Signal in eine Veränderung des Entzündungsmilieus zu übersetzen, war die Isolierung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen Voraussetzung für die nachfolgende Entwicklung von zellbasierten Fremdkörpermodellensystemen. Die zytometrische Charakterisierung der isolierten Monozyten sowie der Makrophagen nach Differenzierung stellte ein wichtiges Qualitätskriterium für die nachfolgende Anwendung in den Versuchen dar. Für die Validierung der entwickelten Modellsysteme hinsichtlich ihrer Verlässlichkeit war die Auswahl geeigneter Referenzmaterialien erforderlich. Hierfür bildete eine retrospektive Zusammenfassung präklinischer und klinischer Studien, die die Gewebereaktion nach Implantation untersuchten, ein wichtiges Bewertungskriterium der *in vitro* generierten Daten.

Während einer Fremdkörperreaktion stellen die Anreicherung von Fibroblasten sowie die Ablagerung von Bindegewebe zwei wichtige Teilprozesse dar. In einem indirekten Charakterisierungsverfahren ließ sich die Reaktion von Makrophagen auf den Kontakt mit Materialoberflächen erfassen und deren Einfluss auf beide Teilprozesse aufzeigen (2). Weiterhin bilden die gewählten Testbedingungen die Grenzen eines Modellsystems und beeinflussen dadurch wesentlich dessen Aussagekraft. Hinsichtlich der Entzündungsreaktion von Makrophagen ermöglichte eine zweidimensionale Materialstudie die Bewertung unterschiedlicher physiologischer Testbedingungen wie die Oberflächenbehandlung mit humanem Blutplasma, die Kontamination der Materialoberfläche mit bakteriellen Bestandteilen und das Milieu aus löslichen Entzündungsmediatoren in einer Wunde. Nach einer vergleichenden statistischen Modellierung des in Antwort auf die jeweiligen Referenzmaterialien induzierten multiparametrischen Entzündungsprofils erfolgte anschließend unter den jeweiligen Testbedingungen eine Bewertung der Materialien (3). Die Erkenntnisse aus den Studien Jannasch *et al.* (2017) dienten zur Weiterentwicklung eines dreidimensionalen Gewebemodells, das sich sowohl aus den zentralen Zellen während einer Fremdkörperreaktion zusammensetzt als auch die komplexe Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in einer Wundnische nachbildet (2, 3). Das Gewebemodell ließ sich durch verschiedene quantitative Entzündungs- und Gewebsparameter charakterisieren und dessen Unterscheidungskapazität konnte eine Hauptkomponentenanalyse aufzeigen.

3.1 Charakterisierung von Monozyten und Makrophagen

Für die Differenzierung zu gewebständigen Makrophagen bilden die im Blut zirkulierenden Monozyten ein Reservoir an Vorläuferzellen. (62) Dies verdeutlicht, dass die Isolierung von Monozyten aus dem Blut sowie deren anschließende Differenzierung zu Makrophagen wichtige Teilschritte für die Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen darstellten. Die Dichtegradientenzentrifugation eines Blutpuffergemischs ermöglichte eine Anreicherung von Monozyten in der peripheren mononuklearen Blutzellfraktion. Im Menschen bestehen etwa 10 % der Leukozyten aus Monozyten (62). Daher war es erforderlich, aus der bereits konzentrierten peripheren mononuklearen Blutzellfraktion die Monozyten weiterhin zu selektieren. Eine antikörpervermittelte, magnetische Markierung und die anschließende magnetische Abtrennung aller markierten, nicht monozytären Bestandteile wie Lymphozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen ermöglichte die Aufreinigung von Monozyten (siehe Kapitel 2.2.1). Anschließend konnten in der Zytometrie spezifische Zellcharakteristika wie die Größe und die Granularität der Zellen sowie die Expression spezifischer Unterscheidungsmerkmale, sogenannter „Cluster of Differentiation“ (CD), untersucht werden (siehe Tabelle 3-1). Nach Durchführung des selektiven Isolierungsverfahrens wiesen die Monozyten eine Reinheit von circa 90 % auf (Abbildung 3-1). Die isolierte Zellpopulation zeigte den Monozytenmarker CD14, war jedoch negativ für die Lymphozytenmarker CD3 (T-Lymphozyten), CD8 (T-Lymphozyten) und CD20 (B-Lymphozyten). Dies bestätigt, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation um Monozyten handelte. *In vivo* differenzieren Monozyten direkt bei Übertritt aus dem Gefäßsystem in das Gewebe (62). *In vitro* konnte die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch hämatopoetische Reifungsfaktoren wie GM-CSF oder M-CSF eingeleitet werden. Hierbei bestimmt der Einsatz des jeweiligen Reifungsfaktors das Entzündungsprofil der differenzierten Makrophagen (148). Im Verlauf der Fremdkörperreaktion sind unterschiedliche Makrophagenphänotypen in der Wunde zu beobachten: in einer ersten sekretorischen Entzündungsphase greifen M1-Makrophagen das Biomaterial sowie das umliegende Gewebe an. Im späteren Verlauf der Immunantwort wird das umliegende Gewebe durch M2-Makrophagen zum Umbau des Gewebes sowie zur Neubildung von extrazellulärer Matrix stimuliert (65).

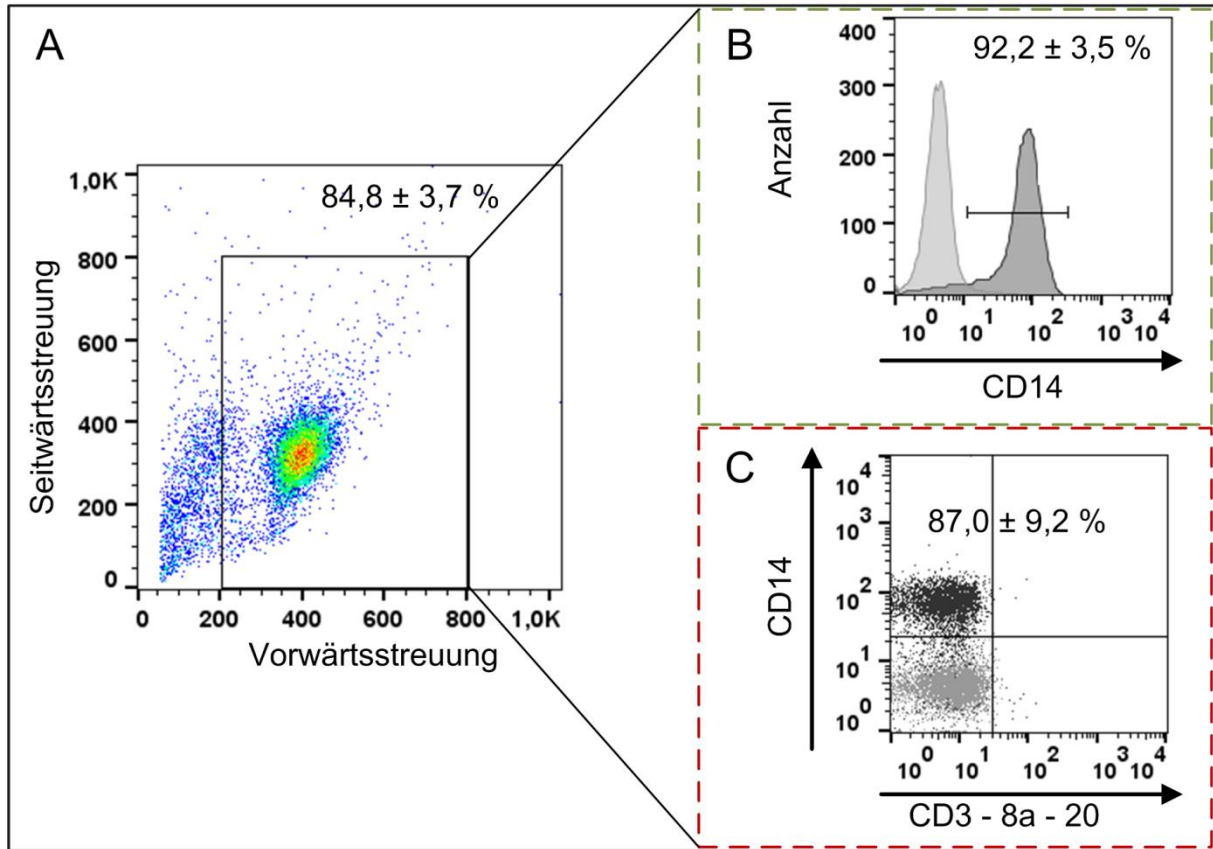


Abbildung 3-1 Zytometrische Charakterisierung der Monozyten nach magnetischer Selektion aus der peripheren mononuklearen Blutzellfraktion.

(A) Die Monozyten wiesen eine spezifische Vorwärts- und Seitwärtsstreuung auf. Ein Anteil von circa 85 % der isolierten Zellen war vital und 15 % der Zellsuspension bestanden aus Zellfragmenten. Die Färbung spezifischer Oberflächenmarker und die anschließende Charakterisierung verdeutlichte eine Reinheit der Monozytenpopulation von circa 90 %. (B) Die isolierten Monozyten waren positiv für den Monozytenmarker CD14 und (C) negativ für die Marker CD3, CD8a und CD20. Die Graphik in (A) stellt ein Dot-Plot dar, dabei wird die Analyse für die einzelnen Zellen in Form eines Punktes in ein X-Y-Koordinatensystem übertragen. Alle anderen Darstellungsweisen sind Histogramme, diese tragen die Fluoreszenzintensität gegen die Zellanzahl auf. In lichtgrau sind die Isotypkontrollen dargestellt und in dunkelgrau die jeweiligen Fluoreszenzfärbungen. Die Diagramme zeigen exemplarisch für einen Spender das Ergebnis. Die Prozentangaben fassen die Mittelwerte und Standardabweichung von drei Blutspendern zusammen (n = 3). Die verwendete Abkürzung CD steht für „Cluster of differentiation“ (englisch).

Die Beteiligung an der Wundheilung und der Fibrose begründete die Differenzierung der Monozyten zu einem moderat antientzündlichen M2-Phänotyp und der anschließenden Anwendung dieser differenzierten Makrophagen zum Aufbau der Modellsysteme (52). Hierfür erfolgte der Zusatz von M-CSF für sechs Tage zum Kulturmedium (148-150). Die spezifische Expression bestimmter Unterscheidungsmerkmale „Cluster of Differentiation“ (CD) ermöglichte die Charakterisierung des induzierten Phänotyps (Abbildung 3-2).

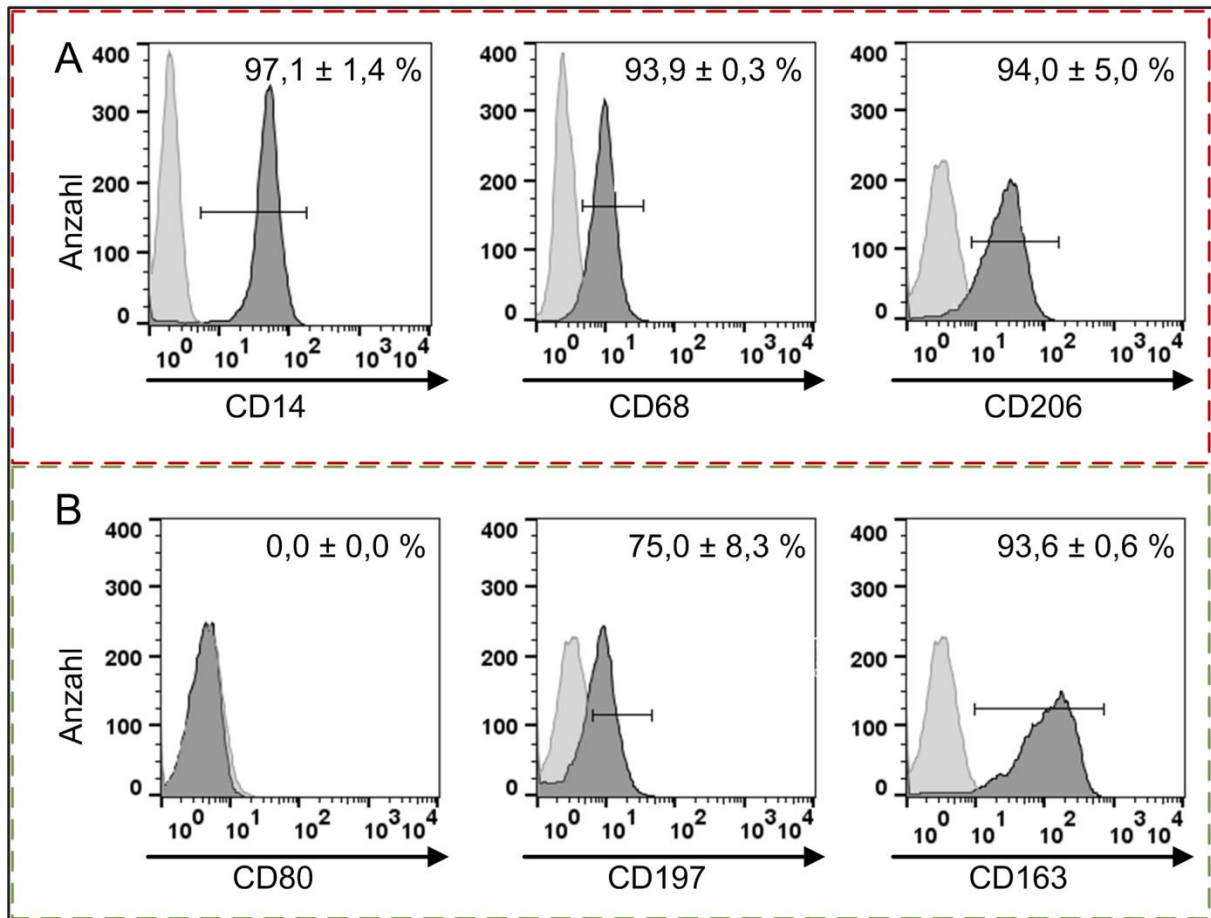


Abbildung 3-2 Verifizierung des Differenzierungsprofils von M2-Makrophagen nach Isolierung aus Vollblut.

(A) Nach der Differenzierungsphase von sechs Tagen unter M-CSF-Stimulation ließen sich die Makrophagenmarker CD14, CD68 und CD206 nachweisen. (B) Die phänotypischen Unterscheidungsmerkmale zu M1-Makrophagen zeigten die differenzierten M2-Makrophagen. Die Zelloberfläche von M2-Makrophagen exprimierte den M1-phänotypische Marker CD80 nicht. Im Gegensatz hierzu wies der Marker CD197 eine gewebspezifische Expression auf: nach Isolierung der Monozyten aus Vollblut (im Diagramm dargestellt) waren die Makrophagen positiv für den Marker CD197, wohingegen die Isolierung aus Leukozytenkonzentrat zu keiner Expression führte. Die Differenzierung zum M1-Phänotyp konnte durch die Expression des Markers CD163 bestätigt werden. Die Histogramme repräsentieren exemplarisch das Differenzierungsprofil von einem Spender. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichung fassen für drei Vollblutspender ($n = 3$) das Expressionsprofil zusammen und verdeutlichen eine hohe Stabilität der Expression. Die lichtgrauen Histogramme stellen die jeweiligen Isotypkontrollen dar. Die Abkürzung CD steht für „cluster of differentiation“ (englisch).

Wie bereits für die isolierten Monozyten gezeigt, exprimierten die differenzierten Makrophagen ebenfalls den Marker CD14. Die Differenzierungsmarker CD68 und CD206 bestätigten den Differenzierungsstatus der Zellen. Klassischerweise exprimieren M1-Makrophagen CD80, dagegen bestätigte die Abwesenheit von CD80 den M2-Phänotyp.

3. Ergebnisse

Tabelle 3-1 Funktion der charakterisierten Unterscheidungsmerkmale.

| Marker | Funktion | Expression |
|--------|---|------------------------|
| CD3 | Komponente des T-Zellrezeptorkomplexes | T-Lymphozyten |
| CD8a | Korezeptor des T-Lymphozytenrezeptors | T-Lymphozyten |
| CD14 | Opsoninrezeptor für LPS und Peptidoglykane | Monozyten, Makrophagen |
| CD20 | Regulatorisches Protein des B-Lymphozytenrezeptors | B-Lymphozyten |
| CD68 | LDL-bindendes, intrazelluläres Glykoprotein | Makrophagen |
| CD80 | Kostimulierendes Signal für die Aktivierung von T-Lymphozyten | M1-Makrophagen |
| CD163 | Fängerrezeptor für den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex | M2-Makrophagen |
| CD197 | Chemokinrezeptor | M1-Makrophagen |
| CD206 | Mannoserezeptor | Makrophagen |

Des Weiteren zeigte die spezifische Expression des Markers CD163 die erfolgreiche Differenzierung zum M2-Phänotyp. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Marker CD197 in Abhängigkeit von der Isolierungsquelle auf der Oberfläche der Makrophagen exprimiert wurde. Die aus Vollblut isolierten Monozyten wiesen nach Differenzierung zu Makrophagen den Marker CD197 zu $75,0 \pm 8,3$ % auf. Dagegen konnte nach der Isolierung von Monozyten aus Leukozytenkonzentrat und der anschließenden Differenzierung zu Makrophagen keine Expression des Markers CD197 gezeigt werden. Nach der Isolierung von Monozyten aus Leukozytenkonzentrat war die Expression aller anderen Marker jedoch vergleichbar mit dem in Abbildung 3-2 nach der Zellisolierung aus Vollblut gezeigten Expressionsprofil. Nach der Isolierung aus Leukozytenkonzentrat exprimierten die Makrophagen (n = 5 Spender) die Marker CD14 ($98,6 \pm 0,6$ %), CD68 ($90,3 \pm 9,6$ %), CD163 ($93,1 \pm 3,7$ %) und CD206 ($90,0 \pm 5,0$ %). Die Expression des Markers CD80 fand ebenfalls nicht statt. Zusammenfassend ermöglichte die Negativselektion eine Isolierung von Monozyten, die sich nach folgend in einer sechstägigen Differenzierungsphase mit M-CSF zu M2-Makrophagen differenzieren ließen. Im Anschluss an die Differenzierung konnten die Makrophagen in den Modellsystemen zur Charakterisierung von Biomaterialien eingesetzt werden.

3.2 Auswahl geeigneter Referenzbiomaterialien

Die Anwendung von Referenzbiomaterialien in der Modellentwicklung diene der Validierung der Verlässlichkeit von den entwickelten Modellsystemen. Hierfür eigneten sich Referenzmaterialien, die (I) in der regenerativen Medizin eine breite Anwendung finden und (II) deren Gewebsreaktion anhand von präklinischen und klinischen Studien beschrieben ist. In einer Sekundärerhebung konnten Biomaterialien identifiziert werden, die diese Kriterien erfüllen. Zum Aufbau der Modellsysteme fanden die Biomaterialien Polytetrafluorethylen (PTFE), Titan, Silikon und Polyethylen (PE) als Referenzmaterialien Anwendung. Als Standardzellkulturoberfläche erfolgte die Testentwicklung auf Glasoberflächen.

(I) In der regenerativen Medizin erfüllen die angewendeten Referenzmaterialien ein breites Anwendungsspektrum.

Während PTFE als Bestandteil von vaskulären und neuronalen Prothesen sowie zur subkutanen Augmentation eingesetzt wird (129, 151, 152), findet Titan hauptsächlich als Zahn- oder Knochenersatz Anwendung (153-155). Zum Ersatz von Weichgewebe wie beispielsweise Brust- oder Larynxgewebe erfolgt der Einsatz von Silikonimplantaten (156, 157). PE wird als Bestandteil von künstlichen Gelenken (158, 159) sowie zur Gesichts- und Kopfaugmentation (160, 161) implantiert.

(II) Präklinische und klinische Studien ermöglichten eine Bewertung der Referenzmaterialien im Hinblick auf ihre Gewebsintegration und die Bindegewebsbildung nach lokaler Implantation (siehe Zusammenfassung Tabelle 3-2).

Eine Metaanalyse, die alle definierten Referenzmaterialien umfasst, war nicht vorhanden. Jedoch erlaubte eine Sekundärerhebung, die zahlreiche präklinische und klinische Studien zusammenfasste, eine Bewertung der Referenzmaterialien hinsichtlich ihres fibrotischen Potentials. In diese Erhebung konnten je Referenzmaterial drei bis fünf Studien als Referenzen einfließen. Hierbei umfassten die Studien zur Bewertung der Referenzmaterialien nach Implantation klinische, histologische und funktionelle Endpunkte. Beispiele für klinische Bewertungskriterien sind die Revision, die Langzeitüberlebensrate oder die Komplikationsinzidenz der eingesetzten Biomaterialien. Nach Implantation dienten die Qualität und die Quantität des gebildeten Gewebes um das Biomaterial ebenfalls als Bewertungskriterien. Hierunter fallen histologische Veränderungen wie die Kapseldicke, die

3. Ergebnisse

Infiltrierung von Zellen, die Durchblutung des Gewebes, die Dichte des Bindegewebes, das Verhältnis zwischen Bindegewebe und funktionellem Gewebe und die Einlagerung von Flüssigkeit. Bei Implantaten, die optimaler Weise eine stabile Form kennzeichnet, war die Kontraktion des Weichgewebes ein Beispiel für ein funktionelles Bewertungskriterium (siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Präklinische und klinische Studien ermöglichten eine vergleichende Bewertung der eingesetzten Referenzbiomaterialien.

| Autor, Jahr (Referenz) | Studienkategorie [Spezies, Anwendung] | Material | Ergebnis |
|-----------------------------------|--|------------------|--|
| Kindsfater, 2015 (159) | Klinische Studie [human, Knielager] | PE | PE wies keine Revision, Osteolyse oder Abscheidung der Implantate auf. |
| Desphande, 2010 (161) | Klinische Studie [human, Gesichts- und Skelettaugmentation] | PE | PE zeigte eine gute Langzeitüberlebensrate und eine geringe Komplikationsinzidenz. |
| Wellisz, 1993 (160) | Klinische Studie [human, Gesichts- und Skelettaugmentation] | poröses PE | Poröses PE kennzeichnete eine gute Gewebsintegration. |
| Suska, 2008 (162) | Präklinische Studie [Ratte, subkutanes Implantat] | Titan, Kupfer | Im Vergleich zu Kupfer wurde Titan durch eine dünnere fibröse Kapsel mit geringeren entzündlichen Infiltraten umschlossen. |
| Ungersböck, 1994 (163) | Präklinische Studie [Kaninchen, Tibiaimplantat] | Titan, Edelstahl | Im Vergleich zu Edelstahl war die Bindegewebskapsel um Titan dünner und die Zellzahl entzündlicher Zellen geringer. |
| Shannon, 1997 (164) | Präklinische Studie [Ratte, subkutanes Implantat] | Titan, Edelstahl | Zwischen Titan und Edelstahl bestanden keine Unterschiede in der Kapseldicke und Zellantwort. Qualitativ unterschied sich die Kapsel um das Titanimplantat durch eine lockere, weniger dichte Packung des Gewebes. |
| Thomsen, 1986 (165) | Präklinische Studie [Ratte, abdominal Wandimplantat] | Titan, PTFE | Das Titanimplantat stand in direktem Kontakt zum umliegenden Bindegewebe. Im Gegensatz dazu wurde das PTFE-Implantat durch eine fibröse Kapsel umschlossen. |

3. Ergebnisse

| Autor, Jahr (Referenz) | Studienkategorie [Spezies, Anwendung] | Material | Ergebnis |
|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| von Recum, 1978 (166) | Präklinische Studie [Hund, Aortapatch] | PTFE, Polyurethan | Polyurethan umgab eine fluide Zyste, wohingegen PTFE eine moderat, anhaftende fibröse Kapsel umgrenzte. |
| Batniji, 2002 (167) | Präklinische Studie [Kaninchen, subperiostal Implantat] | PTFE, Silikon | Das Silikonimplantat wies im Vergleich zu PTFE-Implantaten eine signifikant dickere Kapselbildung und eine geringe Gefäßneubildung auf. |
| Ustundag, 2005 (168) | Präklinische Studie [Kaninchen, Paraglottisimplantat] | PTFE, Silikon | Um Silikon bildete sich eine fibröse Kapsel, wohingegen PTFE eine geringfügige Kapselbildung induzierte. |
| Trumpy, 1996 (169) | Präklinische Studie [human, subkutanes Implantat] | PTFE, hartes und weiches Silikon | Alle Materialien führten zur Kapselbildung, die in ihrer Ausprägung von weichem Silikon über PTFE zu hartem Silikon abnahm. |
| Siggelkow, 2003 (34) | Klinische Studie [human, Brustimplantat] | Silikon | Ein Hauptgrund für das Explantieren eines intakten Implantats war die Kapselkontraktion, welche mit dem fibrösen Gewebsbildung korrelierte. |

Aus der Studienlage konnte ein Bewertungsrang für jedes Referenzmaterial im Vergleich zu allen anderen Referenzmaterialien abgeleitet werden und erlaubte eine Prognose über die fibrotischen Eigenschaften der Referenzmaterialien. Das so ermittelte fibrotische Potential der Referenzmaterialien nimmt von PE, Titan, PTFE über Silikon zu. So wiesen Implantate aus PE ein gutes Langzeitüberleben mit einer geringen Komplikationsrate im Menschen auf (159-161). Im Vergleich hierzu konnte in präklinischen Tierstudien ebenfalls für Titan eine geringe fibrotische Gewebsantwort gezeigt werden (162-165). Im Gegensatz dazu führte die Implantation von PTFE eine moderate Entzündungsantwort und eine fibröse Einkapselung herbei (165, 166). Nach Implantation von Silikon ließ sich eine dicke fibröse Kapselbildung beobachten (34, 167-169). Trotz des sehr breiten Anwendungsbereichs von Silikonimplantaten und deren Einsatz bestehen zusätzlich Bedenken hinsichtlich systemischer Effekte wie Hypersensitivitätsreaktionen (157, 170). Zusammenfassend bildete die beschriebene Bewertung der Referenzmaterialien ein Validierungskriterium für die Verlässlichkeit der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen, entwickelten Modellsysteme. Zur Durchführung

von Testverfahren mussten die Referenzmaterialien in ein Format überführt werden, welches eine oberflächenexponierte Zelltestung ermöglichte. Hierfür eigneten sich Schälchen, die aus dem jeweiligen Material hergestellt wurden (Glas, PE, Silikon) oder auf die eine Oberflächenbeschichtung aufgebracht wurde (PTFE, Titan). Vorteil dieser Testobjekte war, dass die gesamte Oberfläche (die Horizontalen als auch die Vertikalen) des Testobjekts aus dem jeweiligen Referenzmaterial bestand und die Zellen ohne eine Ausweichmöglichkeit unmittelbar der Testoberfläche ausgesetzt waren. Die herbeigeführte Oberflächenexposition ermöglichte einen Rückschluss auf Effekte, die vom jeweiligen Referenzmaterial ausgingen.

3.3 Entwicklung von indirekten zellbasierten Modellsystemen

Im Verlauf einer fibrösen Kapselbildung tragen Teilprozesse wie die Wanderung von Fibroblasten zum lokalen Gewebsdefekt und die Aktivierung gewebsständiger Fibroblasten zur fibrösen Progression der Fremdkörperreaktion bei. Hierbei vereinfachten indirekte zellbasierte Modellsysteme die Untersuchung von Teilprozessen während einer biomaterialinduzierten Gewebsantwort wie (a) die Chemotaxis von Fibroblasten und (b) der Gewebsumbau (siehe Versuchsaufbau Abbildung 3-3). Für die Charakterisierung in einem entkoppelten, indirekten Testverfahren konnte der Kulturüberstand von M2-Makrophagen, die für 48 Stunden auf den Referenzbiomaterialien Glas, Titan oder PTFE kultiviert wurden, gewonnen werden. Der Einfluss von freigesetzten Sekretionsprodukten im Kulturmedium auf die Chemotaxis von Fibroblasten und den Umbau eines dreidimensionalen Bindegewebsmodell sollte nachfolgend untersucht werden.

3.3.1 Chemotaxis von Fibroblasten in Antwort auf materialinduzierte Konditionierung

Während einer Fremdkörperreaktion kann die Proliferation vorhandener sowie die Rekrutierung weiterer Fibroblasten zur zellulären Anreicherung in der Wundumgebung führen und die Neusynthese von Bindegewebe unterstützen. Die gerichtete Wanderung von Fibroblasten durch das Gewebe zum Entzündungsherd wird durch steigende chemische Gradienten koordiniert (Chemotaxis).

3. Ergebnisse

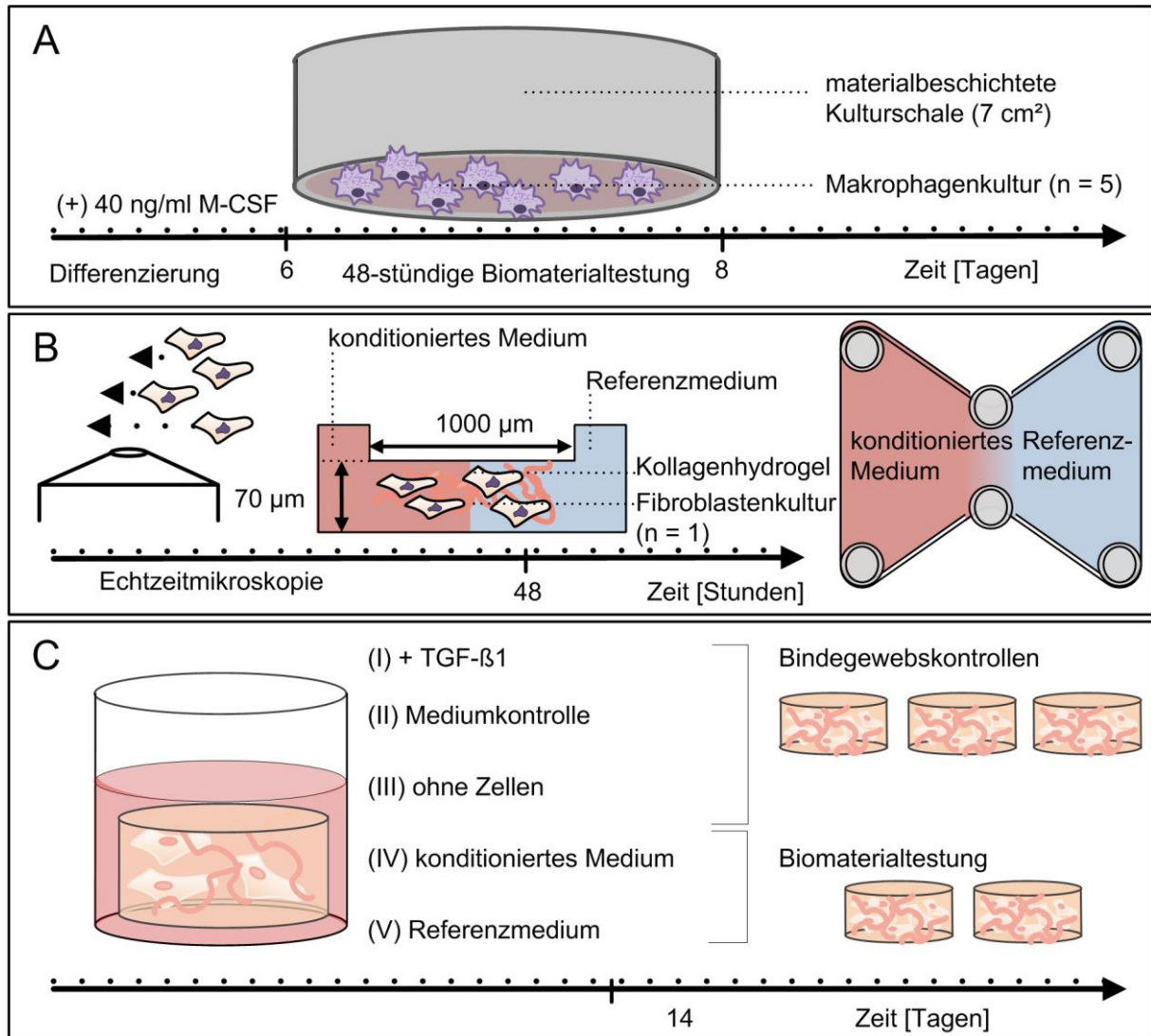


Abbildung 3-3 Indirektes Modellsystem zur Charakterisierung der biomaterialinduzierten Chemotaxis sowie des Bindegewebsbaus.

(A) Nach Differenzierung für sechs Tage unter dem Einfluss von M-CSF erfolgte die Kultivierung der M2-Makrophagen für 48 Stunden auf Glas-, Titan- und PTFE-Oberflächen. Als Antwort auf die Biomaterialoberfläche setzten die Makrophagen lösliche Mediatoren wie beispielsweise Zytokine in den Zellkulturüberstand frei. Der gewonnene konditionierte Zellkulturüberstand konnte im entwickelten indirekten Modellsystem charakterisiert werden. (B) Ein Zweikammersystem ermöglichte die Bestimmung der Chemotaxis von Fibroblasten in Richtung des konditionierten Mediums im Vergleich zu einem biomaterialinkubiertem Referenzmedium als Kontrolle. In den zentralen Beobachtungskanal zwischen beiden Mediumreservoirs erfolgte hierfür das Einbringen der Fibroblasten zusammen mit einem Kollagen-I-Hydrogel und ermöglichte die Chemotaxisuntersuchung in einer dreidimensionalen, biomimetischen Mikroumgebung. An einer beheizten und begasten konfokalen Mikroskopieplattform ließen sich über einen Zeitraum von 48 Stunden Echtzeitaufnahmen machen. Zusätzlich zu den akuten chemotaktischen Effekten wiesen die freigesetzten löslichen Mediatoren im konditionierten Medium ebenfalls Langzeiteffekte auf. (C) Die fibrotischen Eigenschaften der Zellkulturüberstände konnten mit Hilfe von dreidimensionalen Gewebemodellen in einer Kultivierungsphase von 14 Tagen untersucht werden. Hierfür wurden humane dermale Fibroblasten in ein dreidimensionales Kollagenhydrogel eingebracht und unter konditionierten Kulturbedingungen für 14 Tage kultiviert. Biomaterialinkubiertes Medium diente hierbei ebenfalls als Kontrolle für Materialadsorptionseffekte. In diesem indirekten Charakterisierungsverfahren konnte das konditionierte Medium von fünf Makrophagenspendern untersucht werden (n = 5).

Hierbei setzen materialständige Makrophagen zahlreiche Sekretionsprodukte frei, die durch Diffusion Stoffgradienten aufbauen und auf Fibroblasten chemotaktisch wirken können. Beispiele hierfür sind die Wachstumsfaktoren FGF, PDGF und TGF- β 1 (siehe Kapitel 1.3.2). Dies verdeutlicht, dass die Rekrutierung von Fibroblasten einen zentralen Schritt zur anschließenden Verkapselung eines Fremdkörpers darstellt. Die Summe dieser Sekretionsprodukte und deren Effekt auf die Chemotaxis von Fibroblasten konnte *in vitro* in einem dreidimensionalen Kammersystem erfasst werden und sollte als Bewertungskriterium von Biomaterialien herangezogen werden.

Die Zusammensetzung der Chemokine PDGF, FGF und TGF- β 1 im Zellkulturüberstand stand unter dem Einfluss von Adsorptionsprozessen an der Biomaterialoberfläche sowie aktiven Sekretionsprozessen.

Ergänzend zur Messung der induzierten Chemotaxis lieferte die Messung von Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF und TGF- β 1 im Kulturüberstand ein Verständnis für Adsorptionsprozesse und zelluläre Syntheseprozesse auf den Referenzbiomaterialien (siehe Abbildung 3-4). Die Adsorption von Proteinen auf einer Materialoberfläche tritt unmittelbar bei Kontakt eines Fremdkörpers mit Körperflüssigkeiten wie Blutplasma oder interstitieller Flüssigkeit ein. Der experimentelle Versuchsansatz mit Serum als Supplement im Kulturmedium enthielt natürlicherweise Proteine wie Wachstumsfaktoren und erlaubte die biomimetische Nachstellung des ersten Kontakts eines Biomaterials mit der Blutflüssigkeit. Die Proteinadhäsion unterstützt die sensorische Erkennung und die Adhäsion von Zellen an einer Biomaterialoberfläche. Im Anschluss an die Versuchsdurchführung konnte die Adhärenz der primären Makrophagen auf den Referenzbiomaterialien durch die immunhistologische Färbung des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (CD54) sowie der Zellkerne bestätigt werden (siehe Abbildung 3-4 A). Zur Bewertung der materialabhängigen Proteinadsorption erfolgte die Konzentrationsbestimmung von PDGF, FGF und TGF- β 1 im Referenzmedium, das auf den jeweiligen Materialoberflächen inkubiert wurde (siehe Abbildung 3-4 B-D). Zwischen den Referenzbiomaterialien Glass, PTFE und Titan bestand eine Materialabhängigkeit der Proteinadsorption. Die Wachstumsfaktoren PDGF und FGF adsorbierten an eine Glasoberfläche stark, an eine Oberfläche aus PTFE moderat und an Titanoberflächen geringfügig. Die Adsorption von TGF- β 1 war für Glas- und PTFE-Oberflächen vergleichbar, wohingegen Titan nur eine geringfügige Adsorptionskapazität für TGF- β 1 aufwies.

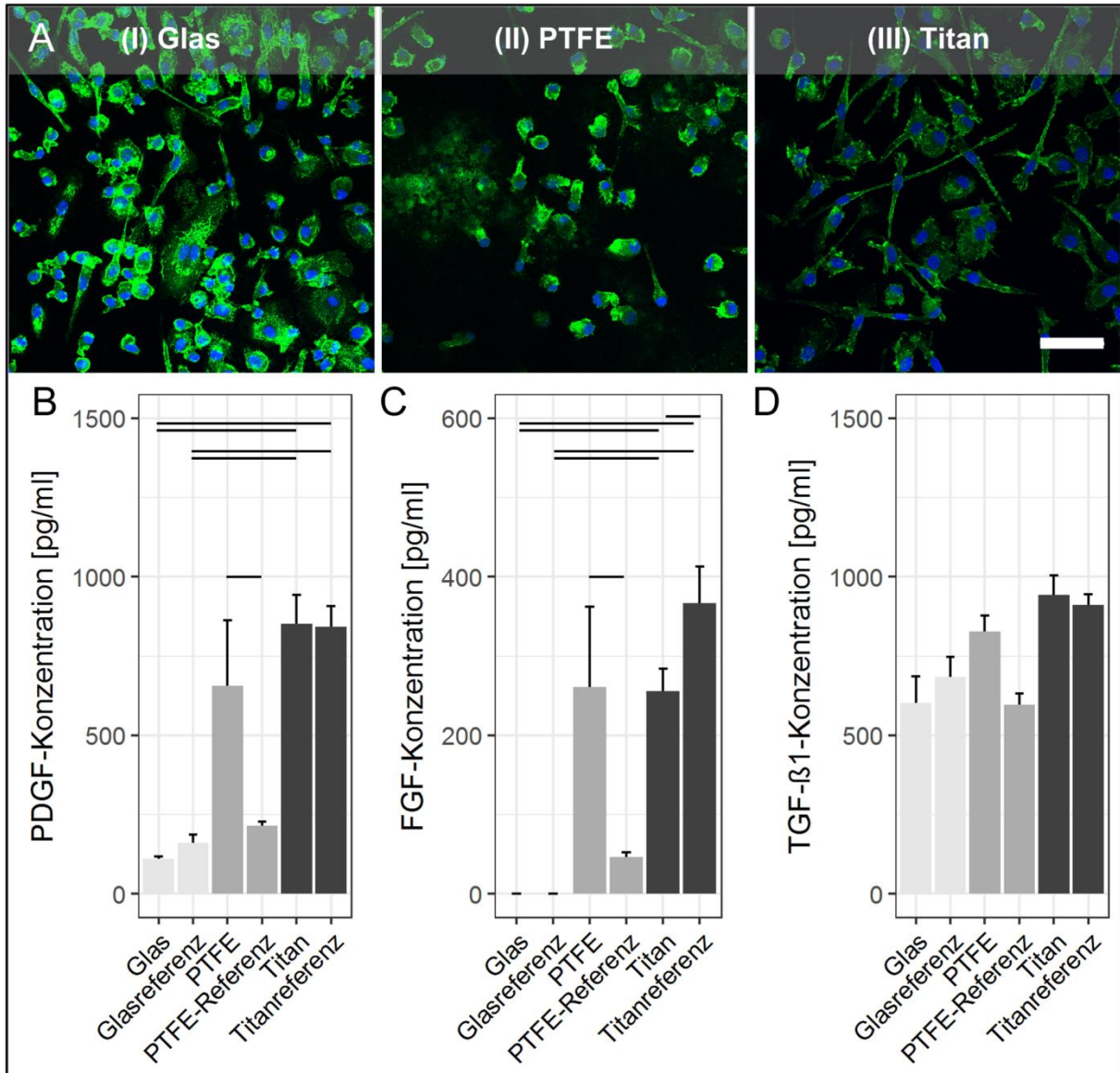


Abbildung 3-4 Die zelluläre Adhäsion, die aktive Freisetzung und die passive Adsorption von Wachstumsfaktoren an die Materialoberflächen.

(A) Nach 48 Stunden verdeutlicht das Adhäsionsmolekül 1 (CD54, grün) sowie die nukleare DAPI-Färbung (blau) die materialabhängige Adhäsion und Morphologie der Makrophagen auf den Referenzmaterialien Glas, PTFE und Titan. Die histologischen Färbungen auf den Referenzmaterialien konnten an einem konfokalen Lasermikroskop erfasst werden. Der Maßstababalken entspricht 50 μm und gilt für alle Abbildungen. Die materialinduzierte aktive Sekretion von Wachstumsfaktoren durch die Makrophagen sowie die passive Adsorption an die Biomaterialoberflächen konnte für (B) PDGF, (C) FGF und (D) TGF- β 1 im konditionierten Medium sowie im Referenzmedium gezeigt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden für PDGF und FGF (p -Wert $\leq 0,05$). Jedoch wiesen die TGF- β 1-Spiegel keine signifikanten Unterschiede auf (p -Wert = 0,17). Hierbei war ein p -Wert von $\leq 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt. Die Daten setzen sich aus Überständen von insgesamt fünf Spendern zusammen ($n = 5$). Die Balkendiagramme stellen Mittelwerte und Standardfehler dar.

Die materialabhängige Adsorption von Proteinen an entsprechende Referenzmaterialien verdeutlichte die Notwendigkeit, das jeweilige Referenzmedium im Zweikammersystem zur Untersuchung der Chemotaxis mitzuführen. Hierdurch war unter Ausschluss von Proteinadsorptionseffekten die Bewertung von materialinduzierten, zellulären Sekretionsprozessen möglich. In der Praxis ließen sich hierfür ein Reservoir mit Referenzmedium und das zweite Reservoir mit zellkonditioniertem Medium beladen. Im Vergleich zum jeweiligen zellfreien Referenzmedium führte die Kultur von Makrophagen auf den Referenzmaterialien keine Veränderung des PDGF-, FGF- und TGF- β 1-Spiegels herbei. Ausschließlich auf PTFE-Oberflächen war eine aktive Sekretion der Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und TGF- β 1 zu messen. In zellkonditioniertem Medium stieg die PDGF-Konzentration im Vergleich zum Referenzmedium von $214,4 \pm 12,7$ pg pro ml auf $656,4 \pm 205,7$ pg pro ml signifikant an (p-Wert = 0,003). Die FGF-Konzentration wies eine signifikante Zunahme von $46,7 \pm 5,4$ pg pro ml auf $261,0 \pm 101,2$ pg pro ml auf (p-Wert = 0,004). Eine Steigerung des TGF- β 1-Spiegels von $596,6 \pm 36,0$ pg pro ml auf $827,1 \pm 51,0$ pg pro ml konnte in zellkonditioniertem Medium gemessen werden (p-Wert = 0,17). Interessanterweise konnte zusätzlich zur materialabhängigen Proteinsekretion ein materialabhängiger Proteinkonsum beobachtet werden. Beispielsweise nahm die FGF-Konzentration bei Kultivierung von Makrophagen auf Titanoberflächen von $366,4 \pm 46,1$ pg pro ml im Referenzmedium auf $256,0 \pm 28,2$ pg pro ml im konditionierten Medium signifikant ab.

Chemotaxisstudien in einer dreidimensionalen Mikroumgebung

Für Chemotaxisstudien entwickelte Boyden (1962) ein vertikalorientiertes Zweikammersystem, das durch eine mikroporöse Filtermembran untergliedert ist (171). In der unteren, basalen Kammer können Testsubstanzen angereichert werden und die Chemotaxis der Zellen von der oberen, apikalen Kammer durch die Poren der Filtermembran in die untere Kammer quantitativ bestimmt werden. Im Gegensatz zum klassischen, zweidimensionalen Boydensystem bilden kollagenbasierte Modellsysteme die Chemotaxis von Fibroblasten unter dreidimensionalen Testbedingungen ab (172). Grinell und Kollegen (2006) untersuchten beispielsweise die Chemotaxis von Fibroblasten aus einem Kollagenhydrogel in ein zellfreies, mit Chemoattraktanz angereichertes Kollagenhydrogel, jedoch erfassten diese Analysen lediglich einen definierten Endpunkt und konnten die Dynamik der Zellmigration nicht aufnehmen (172).

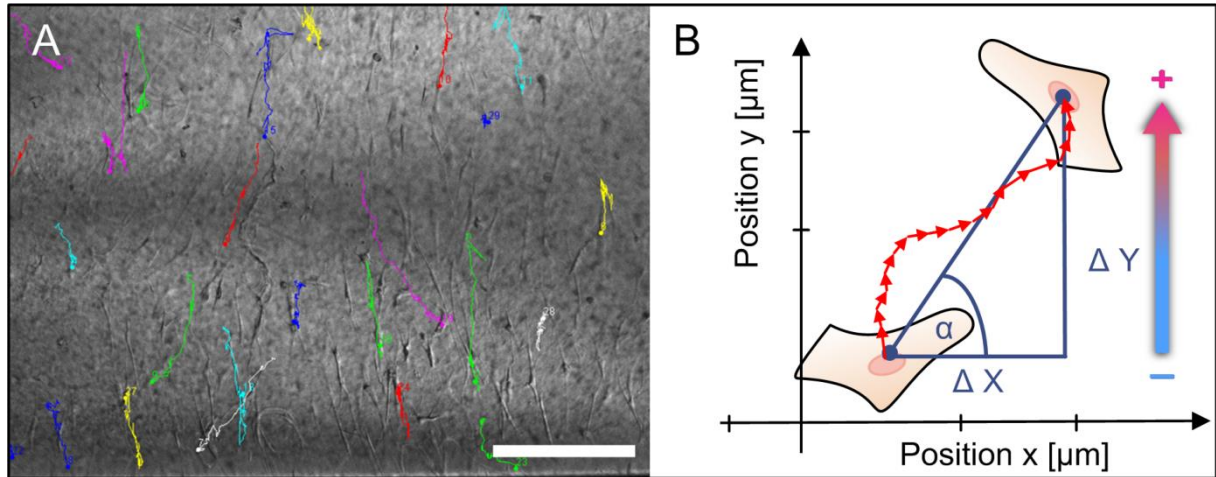


Abbildung 3-5 Bildanalyse der Chemotaxis von Fibroblasten.

(A) Die Bewegungstrajektorien der Fibroblasten im Kollagen-I-Hydrogel ließen sich durch Echtzeitrafferaufnahmen mikroskopisch erfassen. In der mikroskopischen Aufnahme ist exemplarisch die Bewegungstrajektorie von einzelnen Zellen als farbige Linien dargestellt. Der Maßstab bildet 250 µm ab. (B) Jede einzelne Bewegungstrajektorie konnte in ein Koordinatensystem übertragen werden. Hierbei war der Startpunkt der Zelle als Ursprung festgelegt. Die Bewegungstrajektorie ließ sich in Teilschritte untergliedern, deren Länge und Richtung die Bewegung der Fibroblasten beschrieb. Diese Parameter ermöglichten die statistische Charakterisierung des Bewegungsvorgangs.

Die horizontale Orientierung des von Ibidi (München, Deutschland) entwickelten µ-Chemotaxiskammersystems in Form eines Objektträgers ermöglichte in einer dreidimensionalen Matrix die mikroskopische Aufnahme der Zellmigration unter Echtzeitbedingungen (144). Das bereits etablierte Kammersystem besteht aus zwei Reservoirs, die durch einen zentralen Beobachtungskanal unterteilt sind. In den zentralen Beobachtungskanal (Querschnitt 1000 µm Breite mal 70 µm Höhe) lassen sich in eine dreidimensionale physiologische Trägerstruktur aus Kollagen Typ I eine definierte Anzahl an Fibroblasten einbringen. Anschließend können die flankierenden Reservoirs mit Kulturmedium befüllt und ein löslicher Lockstoff eingebracht werden. Das Einbringen eines Lockstoffs in ein Reservoir führt zum Aufbau eines linearen Stoffgradienten im Beobachtungskanal. Mit einem definierten Fluorophorgradienten validierten Zengel und Kollegen (2011) die Linearität des Gradienten über den Beobachtungskanal sowie dessen Langzeitstabilität über einen Messzeitraum von 48 Stunden(144). Die Evaluation des µ-Chemotaxiskammersystems zur Bewertung des Attraktivitätspotentials der verschiedenen Referenzmaterialien Glas, PTFE und Titan erfolgte anhand bestimmter konditionierter Zellkulturüberstände. Bei der Testung von Biomaterialien ermöglichte das Zweikammerdesign den kontrollierten Vergleich von (I) zellkonditioniertem Medium bestehend aus Kulturmedium von materialständigen M2-

Makrophagen zu (II) einem Referenzmedium, das ohne Zellen auf dem jeweiligen Biomaterial inkubiert wurde. Dieser balancierte experimentelle Aufbau kompensiert zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und dem Testsubstrat Proteinadsorptionseffekte. Mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen ließ sich über einen Zeitraum von 48 Stunden der Weg der Zellen im Beobachtungskanal erfassen (siehe Abbildung 3-5). Die Zellbewegung konnte manuell über die Software ImageJ verfolgt und die Positionskordinaten ausgewertet werden. Die Berechnung linearer und zirkulärer statistischer Parameter wie die Geradlinigkeit der Zellwanderung (siehe Kapitel 2.2.3.1 Gleichung 1) sowie der Vorwärtstrend der Migrationsbewegung (Kapitel 2.2.3.1 Gleichung 2) oder die Winkelverteilung zwischen den Teilschritten der Bewegungstrajektorien (Kapitel 2.2.3.1 Gleichung 3) erlaubte eine detaillierte Charakterisierung der Migrationsprozesse.

Als chemotaktisches Attraktanz eignete sich der Wachstumsfaktor TGF- β 1 zur direkten Validierung des experimentellen Designs.

Größere Moleküle wie Chemokine mit einer typischerweise kleineren Diffusionskonstante weisen eine geringere Dynamik als ein Fluorophormolekül auf. Dieser Zusammenhang bestärkt die Verlässlichkeit des bereits beschriebenen indirekten Validierungsverfahrens von Zengel und Kollegen (2011) (144). Zusätzlich erfolgte in dieser Arbeit die Validierung des Kammersystems direkt mit Fibroblasten in ihrer dreidimensionalen Kollagenmikroumgebung (Abbildung 3-6 A). Hierfür wurde die Migration von Fibroblasten in Reaktion auf einen definierten Wachstumsfaktorgradienten aus TGF- β 1 über das beschriebene Bildanalyseverfahren erfasst und die Bewegungstrajektorien über einen Zeitraum von 48 Stunden aufgenommen. Die gewonnenen Bewegungskordinaten konnten in ein Koordinatensystem übertragen werden. Die direkte Validierung des Kammersystems erfolgte mit definierten Gradienten in (I) uni- und (II) bidirektionaler Ausrichtung sowie (III) ohne chemischen Gradienten. Bei uni- oder bidirektional ausgerichteten chemischen TGF- β 1-Gradienten wanderten die Fibroblasten in Richtung der Gradienten. Im Vergleich zu einem unidirektional ausgerichteten Gradienten fiel bei bidirektionaler Ausrichtung des Gradienten sowie ohne Gradient der Schwerpunkt der Wanderungsrichtung von allen Bewegungstrajektorien im Ursprungspunkt zusammen. In Y-Richtung lag die Wanderungsdistanz zwischen Start- und Endpunkt ohne Gradient bei 150 μ m und in den Versuchsansätzen mit Gradienten bei 300 μ m.

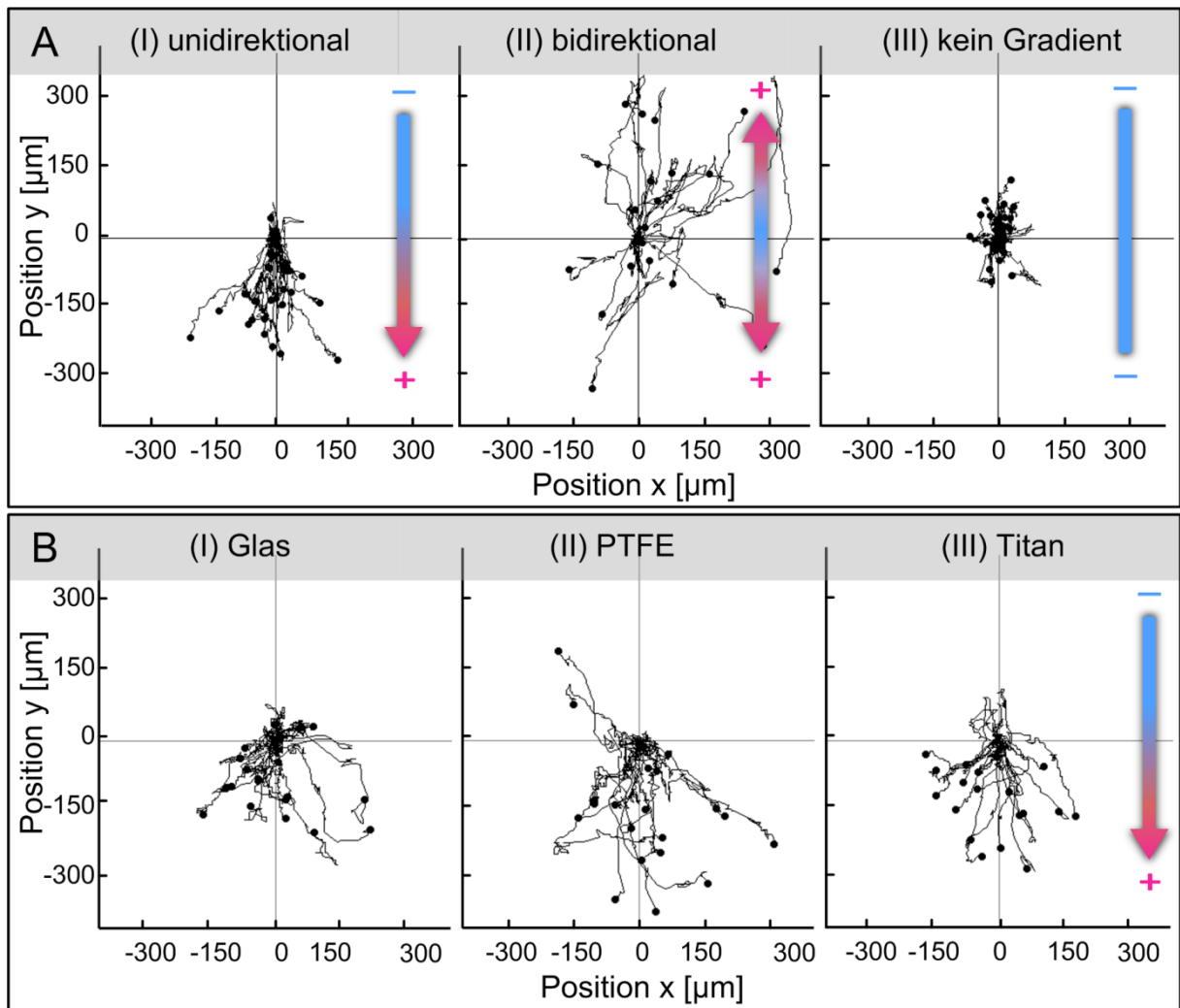


Abbildung 3-6 Übertrag der Bewegungstrajektorien in ein Koordinatensystem.

(A) Die Validierung des Zweikammersystems erfolgte mit definierten TGF- β 1-Gradienten. Hierfür wurde die Wanderung der Fibroblasten in Richtung (I) eines unidirektionalen Gradienten sowie in Richtung (II) eines bidirektionalen Gradienten und (III) ohne den Einfluss eines Gradienten erfasst. (B) Anschließend konnte zur Charakterisierung der Referenzmaterialien die Reaktion auf konditioniertes Medium im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium untersucht werden. Die Kultivierung von Makrophagen für 48 Stunden auf (I) Glas, (II) PTFE- oder (III) Titanoberflächen führte zu einer Chemotaxis in Richtung des chemischen Gradienten. Zur Bestimmung der Zellbewegung erfolgte die Auswertung der Bewegungstrajektorien von 20 individuellen Zellen. Die Graphiken stellen exemplarisch die Wanderung der Fibroblasten als Antwort auf das konditionierte Medium eines Makrophagenspenders dar.

Die Chemoattraktivität der konditionierten Medien nach Kultivierung von Makrophagen auf den Referenzmaterialien unterschied sich.

Materialständige Makrophagen setzten Chemokine frei, die eine gerichtete Chemotaxis von Fibroblasten in Richtung des zellkonditionierten Mediums induzierten (siehe Abbildung 3-6 B). Bei allen Referenzmaterialien richtete sich die Orientierung der zellulären Bewegung entlang der chemischen Gradienten aus. Die Fibroblasten wanderten hierbei mit einer mittleren Geschwindigkeit von $7,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ pro Minute. Jedoch bestanden zwischen den Referenzmaterialien keine Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit. Lineare und zirkuläre statistische Parameter ermöglichten anschließend eine Analyse der Migrationsbewegung. Die Bewertung bestimmter Kulturüberstände hinsichtlich ihrer Chemoattraktivität ließ indirekt einen Rückschluss auf die Attraktivitätspotentiale der Referenzmaterialien zu (Abbildung 3-7). Für einfache statistische Parameter wie die Distanz zwischen Start- und Endpunkt (euklidische Distanz) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien. Die euklidische Distanz reichte von $112,0 \pm 7,0 \mu\text{m}$ in Reaktion auf glasinduzierte Effekte bis zu $154,4 \pm 16,2 \mu\text{m}$ für titaninduzierte Effekte. Für die Direktheit der Migrationsbewegung (siehe Gleichung 1 beschrieben in Kapitel 2.2.3.1) bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien Glas ($0,32 \pm 0,03$) und Titan ($0,43 \pm 0,03$) sowie zwischen den Referenzmaterialien Glas und PTFE ($0,42 \pm 0,03$). Die Effizienz der Migration in Richtung des chemischen Gradienten konnte mit Hilfe des Vorwärtsmigrationsindex_y (siehe Gleichung 2 in Kapitel 2.2.3.1) beschrieben werden. Hierbei ergaben sich im Vergleich zu Glas ($0,22 \pm 0,03$) signifikant höhere Werte von $0,34 \pm 0,02$ für Titan und $0,31 \pm 0,02$ für PTFE. Die Anwendung zirkulärer statistischer Parameter wie die Winkelverteilung R (siehe Gleichung 3 in Kapitel 2.2.3.1) ermöglichte die Identifizierung signifikanter Unterschiede zwischen allen Materialien. Mit einer mittleren R -Winkellänge von $0,48 \pm 0,01$ wies Titan eine stark ausgeprägte, scharf eingegrenzte Winkelverteilung auf. Im Vergleich hierzu lag die mittlere Winkellänge von R für Glas bei $0,33 \pm 0,01$ und für PTFE bei $0,41 \pm 0,01$.

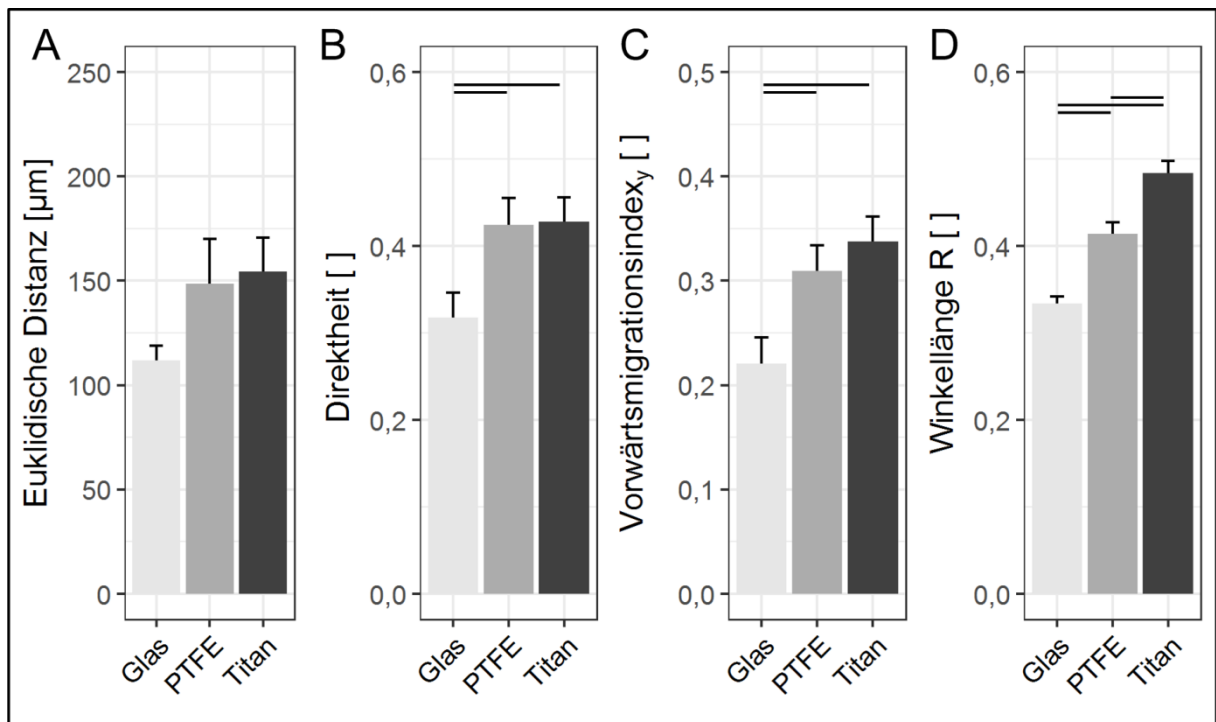


Abbildung 3-7 Lineare und zirkuläre statistische Parameter zur Charakterisierung der Chemotaxis von Fibroblasten.

Von den ermittelten Migrationskoordinaten ließen sich statistische Parameter ableiten. (A) Die Differenz zwischen Start- und Endpunkt der Zellmigration beschreibt die euklidische Distanz der Zellmigration. Hierbei bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien. (B) Die Direktheit der Zellwanderung ergibt sich aus dem Quotienten aus euklidischer sowie akkumulierter Distanz und charakterisierte die Geradlinigkeit der Zellbewegung. (C) Die Effizienz der Zellwanderung in Richtung des chemischen Gradienten (Y-Richtung) konnte durch den Vorwärtsmigrationsindex_y erfasst werden. (D) Die mittlere Winkellänge R liefert Aufschluss über die Winkelverteilung während eines Migrationsprozesses. Signifikante Unterschiede konnten sowohl für die Direktheit, den Vorwärtsmigrationsindex_y sowie die mittlere Winkellänge R bestimmt werden ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Die Bewegungstrajektorien von Fibroblasten ($n = 20$ pro Spender) wurden von jeweils fünf Makrophagenspendern ($n = 5$) analysiert. Die Balkendiagramme stellen Mittelwert und Standardfehler dar.

Die Ergebnisse verdeutlichten, dass das entwickelte indirekte zellbasierte Modellsystem eine Unterscheidungskapazität zwischen den Referenzmaterialien Glas, PTFE und Titan aufwies. Hierbei lieferten einfache, lineare statistische Parameter wie die Direktheit oder der Vorwärtsmigrationsindex_y eine Auftrennung zwischen Glas und PTFE sowie Glas und Titan. Jedoch ermöglichte die Auswertung zirkulärer Parameter zusätzlich die Unterscheidung von PTFE und Titan. Hieraus konnte ein steigendes chemotaktisches Potential von Glas über PTFE zu Titan abgeleitet werden.

3.3.2 Langzeiteffekte auf den Bindegewebsumbau

Die Implantation eines Biomaterials kann zu einem verstärkten Auf- und Umbau von extrazellulärer Matrix führen. Unter diesem Gesichtspunkt stellen Veränderungen der extrazellulären Matrix ein wichtiges Bewertungskriterium zur Abschätzung einer Gewebekapselbildung bei der Implantation eines Biomaterials dar. Die Kontaktaktivierung von oberflächenständigen Makrophagen durch einen Fremdkörper führt zur Freisetzung von Zytokinen in die extrazelluläre Flüssigkeit. In einem entkoppelten Modellansatz konnte *in vitro* der Einfluss von materialinduzierten Sekretionsprozessen auf ein Bindegewebsmodell gezeigt werden (Versuchsaufbau siehe Abbildung 3-3). Hierbei bilden Kollagenfasern die native biophysikalische Grundsubstanz der extrazellulären Gewebematrix und konnten in Kombination mit dem bindegewebsbildenden Fibroblasten zum Aufbau von Bindegewebsstrukturen genutzt werden. Zur Untersuchung von Materialeffekten wurde das konditionierte Medium von materialständigen M2-Makrophagen auf Bindegewebsmodelle bestehend aus Fibroblasten in einem Kollagen-I-Hydrogel überführt und unter diesen konditionierten Bedingungen für 14 Tage kultiviert. Hierbei fanden die bereits in der Chemotaxis angewendeten, konditionierten Zellkulturüberstände von auf Glas-, Titan- oder PTFE-Oberflächen kultivierten primären Makrophagen Einsatz. Zum Ausschluss von Proteinadsorptionseffekten und für die Identifizierung von zellvermittelten Effekten wurde zusätzlich materialinkubiertes Referenzmedium auf den Bindegewebsmodellen kultiviert und im Versuchsansatz als Kontrolle mitgeführt.

Der Wachstumsfaktor TGF- β 1 eignete sich zur Validierung des Bindegewebsmodells, wohingegen konditioniertes Medium im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium eine Charakterisierung von materialinduzierten Effekten ermöglichte.

Gewebsständige Fibroblasten können zu Myofibroblasten differenzieren und ähnlich wie Muskelzellen eine Kontraktion des Bindegewebes und somit den Verschluss des Wunddefekts herbeiführen (125, 173). Die Kontraktion von Wundgewebe um einen Fremdkörper kann die Funktionalität eines Implantats beeinträchtigen. Beispielsweise führte die Gewebskontraktion um Brustimplantate zur Deformation des Silikons. Hierbei erforderte der Formverlust das Explantieren intakter Implantate. (34) Die Stimulation von kollagenbasierten Bindegewebsmodellen mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 konnte *in vitro* eine Kontraktion des Bindegewebes hervorrufen und eignete sich als Positivreferenz im entwickelten Modellsystem (174).

In dieser Arbeit erfolgte die Validierung des Bindegewebsmodells (siehe Abbildung 3-8 B) durch (I) die Supplementierung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 zum Kulturmedium und (II) den Vergleich mit Bindegewebsmodellen, die ohne zusätzliche Stimulation kultiviert wurden sowie (III) den Vergleich mit Kollagen-I-Hydrogelen ohne Zellen. Hierbei entsprach die Gewichtsabnahme von Modellen ohne Zellen (345 ± 16 mg) über Modelle mit Zellen (127 ± 10 mg) zu Modellen unter TGF- β 1-Stimulation (85 ± 6 mg) dem zu erwartenden Effekt. Die Kultivierung unter (IV) zellkonditioniertem Medium im Vergleich zu (V) materialinkubiertem Referenzmedium ermöglichte eine Bewertung von zellvermittelten Materialeffekten.

Die Umstrukturierung der Bindegewebsmodelle nach Kultivierung unter zellkonditioniertem Medium führte eine Abnahme des Nassgewichts herbei.

Nach 14-tägiger Kultivierung war die Kontraktion des Bindegewebes für alle Versuchsansätze makroskopisch sichtbar. Beispielhaft festgehalten ist die Kontraktion des Bindegewebes nach Kultivierung unter konditioniertem Medium im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium photographisch in Abbildung 3-8 A. Die beobachteten Kontraktionseffekte stimmten mit der Gewichtsabnahme der Bindegewebsmodelle überein (siehe Abbildung 3-8 B). Im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium ließ sich für alle getesteten Referenzmaterialien eine signifikante Gewichtsabnahme durch die Effekte des zellkonditionierten Mediums beobachten. Im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium stieg die relative Gewichtsabnahme von Glas (Δ - 60 mg) und PTFE (Δ - 60 mg) zu Titan (Δ - 90 mg). Im Vergleich zum Ausgangsgewicht von 500 mg lag das finale Gewicht nach Kultivierung unter titaninkubiertem Referenzmedium (320 ± 31 mg) jedoch signifikant höher im Vergleich zu den induzierten Effekten von glasinkubiertem Medium (180 ± 13 mg) und PTFE-inkubiertem Medium (190 ± 15 mg). Vergleichbare Signifikanzmuster waren bei Kultivierung in zellkonditioniertem Medium zu beobachten. Das konditionierte Medium von titanständigen Makrophagen (230 ± 34 mg) induzierte eine geringere Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kultivierung von Makrophagen auf Glasoberflächen (120 ± 15 mg) und PTFE-Oberflächen (130 ± 18 mg).

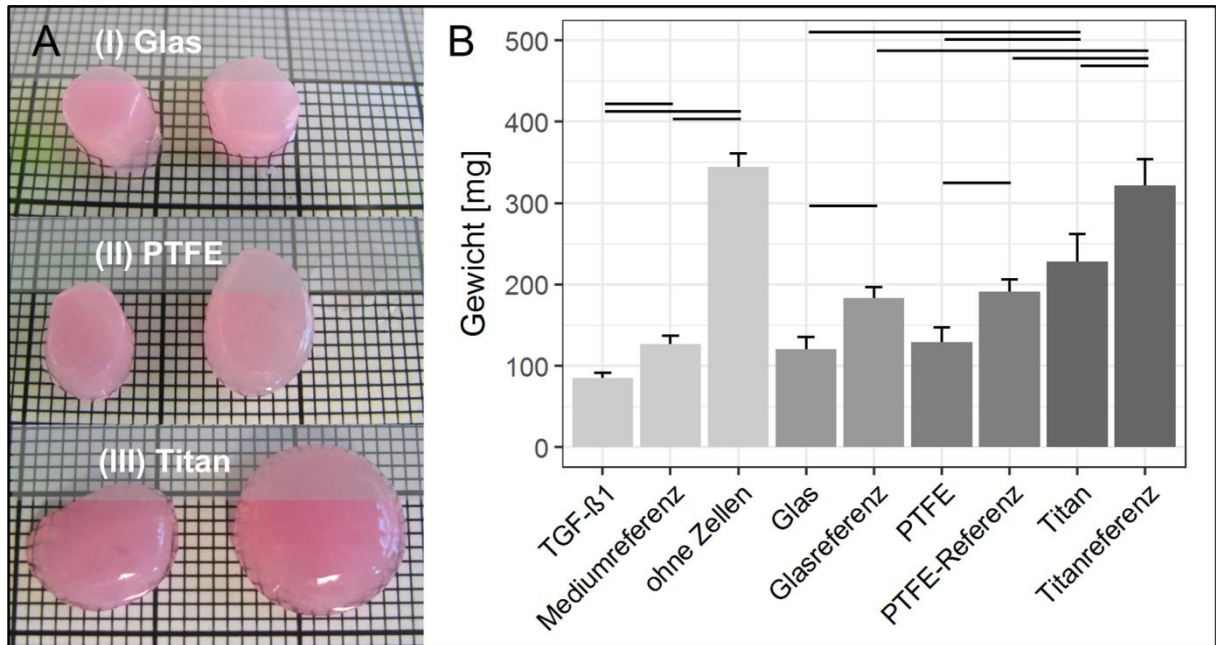


Abbildung 3-8 Bewertung von zellkonditioniertem Medium und dessen Effekt auf den Bindegewebsumbau.

(A) An Tag 14 wiesen die unter konditioniertem Medium kultivierten Kollagenhydrogele (links) im Vergleich zu den Modellen, die unter dem jeweiligen materialinkubierten Referenzmedium kultiviert wurden (rechts) eine stärkere Kontraktion auf. (B) Die beobachteten Effekte korrelierten mit der Abnahme des Nassgewichts. Der Vergleich mit dem jeweiligen Referenzmedium diente der Identifizierung von zellspezifischen Effekten. Im Versuchsaufbau wurde das konditionierte Medium von fünf Makrophagenspendern ($n = 5$) auf jeweils drei Bindegewebsmodelle ($n = 3$) aufgetragen. Das Balkendiagramm visualisiert den Mittelwert und den Standardfehler. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ lässt sich als Indikator für signifikante Unterschiede annehmen.

Die histologische Azanfärbung von Kollagenfasern (blau) unterstützte die Beobachtungen der Gewebskontraktion und der Gewichtsabnahme (Abbildung 3-9).

Ein Bildanalyseverfahren ermöglichte die Bestimmung der mittleren Cyanintensität (MCI) und hierdurch eine quantitative Bewertung der histologischen Färbungen. Die Validität der Methode konnte anhand der TGF-β1-stimulierten Modelle gezeigt werden. Hier führte die Stimulation mit TGF-β1 zu einer dichteren Kollagenfaserstruktur, die mit einem steigenden MCI von $36,5 \pm 4,2$ ohne Stimulation auf $62,3 \pm 5,8$ im TGF-β1-stimulierten Gewebe einherging. Vergleichsweise niedrig fiel die MCI von Kollagenhydrogelen aus lockeren Kollagenfasern ohne Zellen aus ($MCI 19,5 \pm 3,8$). Des Weiteren führte zellkonditioniertes Medium im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium zu einer Verdichtung der Kollagenfasern. Ein materialabhängiges Ranking der Referenzmaterialien ergab sich aus der relativen Zunahme des MCI von Titan ($\Delta MCI 8,8$) über Glas ($\Delta MCI 26,9$) zu PTFE ($\Delta MCI 28,4$).

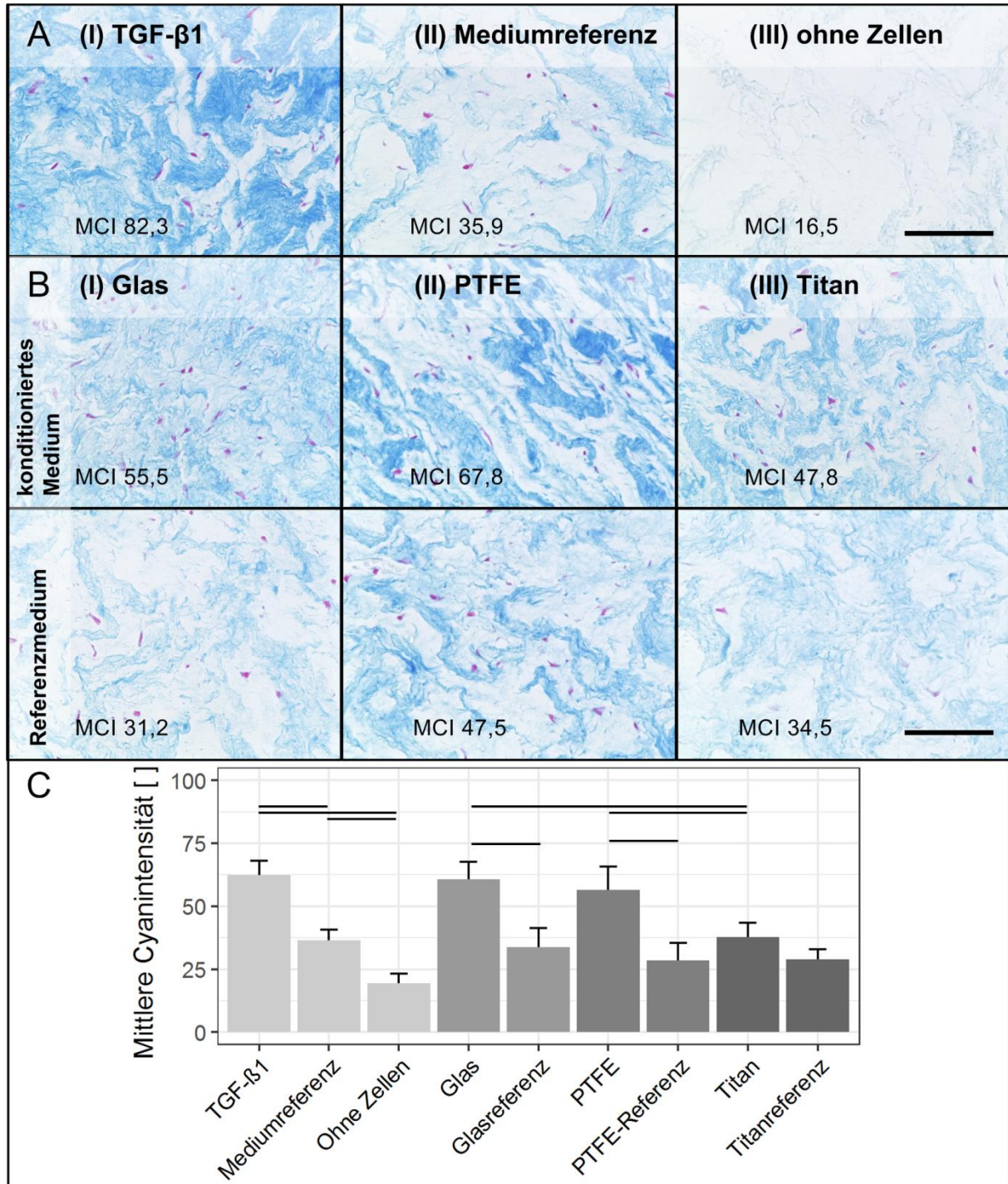


Abbildung 3-9 Azanfärbung von Kollagenstrukturen in den Bindegewebsmodellen.

(A) Als Referenz dienten Modelle nach Kultivierung (I) unter TGF- β 1-Stimulation, (II) in Zellkulturmedium sowie (III) ein Hydrogel ohne Zellen. (B) Die Kultivierung von Makrophagen auf den Referenzmaterialien (I) Glas, (II) PTFE und (III) Titan führte im Bindegewebsmodellensystem eine materialabhängige Kollagenablagerung herbei. Der dargestellte Maßstabalken bildet 100 μ m ab und ist für alle Abbildungen gültig. (C) Die beobachteten Effekte ließen sich über die Analyse der mittleren Cyanintensität quantitativ bewerten. Hierfür erfolgte je Makrophagenspender ($n = 5$) die Charakterisierung von einem Gewebsmodell und jeweils die quantitative Auswertung von zwei Aufnahmen ($n = 2$). Im Balkendiagramm dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler. Die Abkürzung MCI steht für mittlere Cyanintensität.

Die durch zellkonditioniertes Medium herbeigeführte absolute MCI führte bei Kultivierung von Makrophagen auf Titanoberflächen zu einem Wert von $37,8 \pm 5,6$ und einen Wert von $60,8 \pm 6,9$ bei Kultivierung der Makrophagen auf Glasoberflächen. Makrophagen, die auf PTFE-Oberflächen kultiviert wurden, induzierten einen relativ starken Effekt auf die Kollagenhydrogele. Hierbei bildeten sich dicke konzentrierte Kollagenbündel mit in einer MCI von $56,4 \pm 9,4$ aus. Zusammengefasst zeigten die gewählten Endpunkte der Gewebskontraktion und Gewichtsreduktion sowie die histologische quantitative Bewertung der Kollagenablagerung ein steigendes fibrotisches Potential von Glas und PTFE zu Titan auf. Dagegen waren die induzierten Effekte von Glas und PTFE vergleichbar. Das entwickelte indirekte zellbasierte Modellsystem wies wie bereits für das Modellsystem zur Bewertung der Chemotaxis beschrieben ebenfalls eine Unterscheidungskapazität auf, jedoch waren die Ergebnisse und die Bewertung der beiden Referenzmaterialien PTFE und Titan divergent.

3.4 Multiparametrische Modellierung zur Bewertung von Testbedingungen

Die geringe Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Biomaterialstudien stellt ein Hindernis für die Akzeptanz von *in vitro* Studien zur Reduzierung von Tierversuchen dar (175). Neben technischen Testbedingungen wie dem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, die Entnahme von Proben oder die Wahl geeigneter Messparameter beeinflussen ebenfalls strukturelle sowie biochemische Testbedingungen die Bewertung eines Biomaterials *in vitro*. Die Wahl geeigneter, prädiktiver Testbedingungen bildet eine Herausforderung der *in vitro* Modellsystementwicklung. In einem vergleichenden Modellansatz konnten unterschiedliche strukturelle und biochemische Testbedingungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entzündungsreaktion von Makrophagen auf Biomaterialien untersucht werden. Letztendlich erfolgte die Bewertung der Biomaterialien unter dem Einfluss dieser Variablen. Nach Implantation eines Biomaterials in den menschlichen Organismus ist es einer Umgebung ausgesetzt, die durch verschiedene Variablen bestimmt wird. Jede einzelne Variable unterliegt hierbei komplexen Mechanismen und diese wiederum sind nicht komplett entschlüsselt, somit sind die Variablen nicht kontrollierbar und deren Varianz nicht vorhersehbar.(45) Die in dieser Studie untersuchten Variablen umfassen Einflussgrößen während einer Fremdkörperreaktion wie die Kontamination eines Biomaterials mit LPS, die Wechselwirkung zwischen humanem Plasma mit der

Materialoberfläche sowie die Gegenwart des Zytokins IL-4 (Abbildung 3-10). Bei Implantation in ein Gewebe bilden die gewählten Testvariablen strukturelle sowie biochemische Komponenten in der Mikroumgebung des Fremdkörpers ab: eine unzureichende Reinigung und den Verbleib von bakteriellen Bestandteilen auf der Biomaterialoberfläche, den Kontakt zur Blutflüssigkeit nach Implantation sowie das Milieu aus löslichen Mediatoren in Gegenwart benachbarter entzündlicher Zellen wie Granulozyten und T_{H2}-Lymphozyten. Bei Übertritt aus dem vaskulären System in das Gewebe differenzieren Monozyten zu Makrophagen (62). Dies begründete die Anwendung differenzierter Makrophagen im Modellsystem. Die Differenzierung zu Makrophagen geht mit der Veränderung von Zellcharakteristika und der zellulären Funktionalität einher. Auf Grund ihrer Beteiligung an der chronischen Gewebsantwort auf ein Biomaterial fand die Differenzierung zu Makrophagen unter Anwendung von M-CSF des M2-Phänotyps statt (148, 150). Der Zusatz von LPS oder IL-4 während der Kultivierungsphase auf den Referenzmaterialien ermöglichte die Modellierung eines breiten Entzündungsspektrums. LPS induzierte eine starke Entzündung und polarisierte den Übergang von M2- zum M1-Phänotyp, wohingegen IL-4 den M2-Phänotyp stärkte und die zelluläre Adhäsion und die Fusion mehrerer Zellen zu Gigantenzellen unterstützte (70, 150, 176). Das Entzündungsprofil konnte mit multifaktoriellen Zytokinanalysen untersucht werden und die Vitalität der Makrophagen auf den Referenzmaterialien erfasst werden. Die gewählten Messparameter (eingeleitet in Kapitel 1.3.3) lassen sich hierbei drei zentralen Einflussgrößen während einer fremdkörperinduzierten Fibrose zuordnen:

- (I) Die chronische Zellantwort auf einen Fremdkörper setzt die Persistenz vitaler Makrophagen auf der Materialoberfläche voraus.
- (II) Eine starke Entzündung in der Akutphase des Fremdkörperkontakts beeinflusst den späteren fibrotischen Verlauf.
- (III) Ein Chemokingradient unterstützt die gerichtete Wanderung von weiteren Entzündungszellen sowie Fibroblasten zum Implantat.

Diese Annahmen begründeten die Auswahl und Interpretation der quantitativen Messparameter. Nach Kultivierung der Makrophagen auf den Referenzmaterialien erfolgte zur Charakterisierung der Zellvitalität auf der Materialoberfläche die ATP-Quantifizierung.

3. Ergebnisse

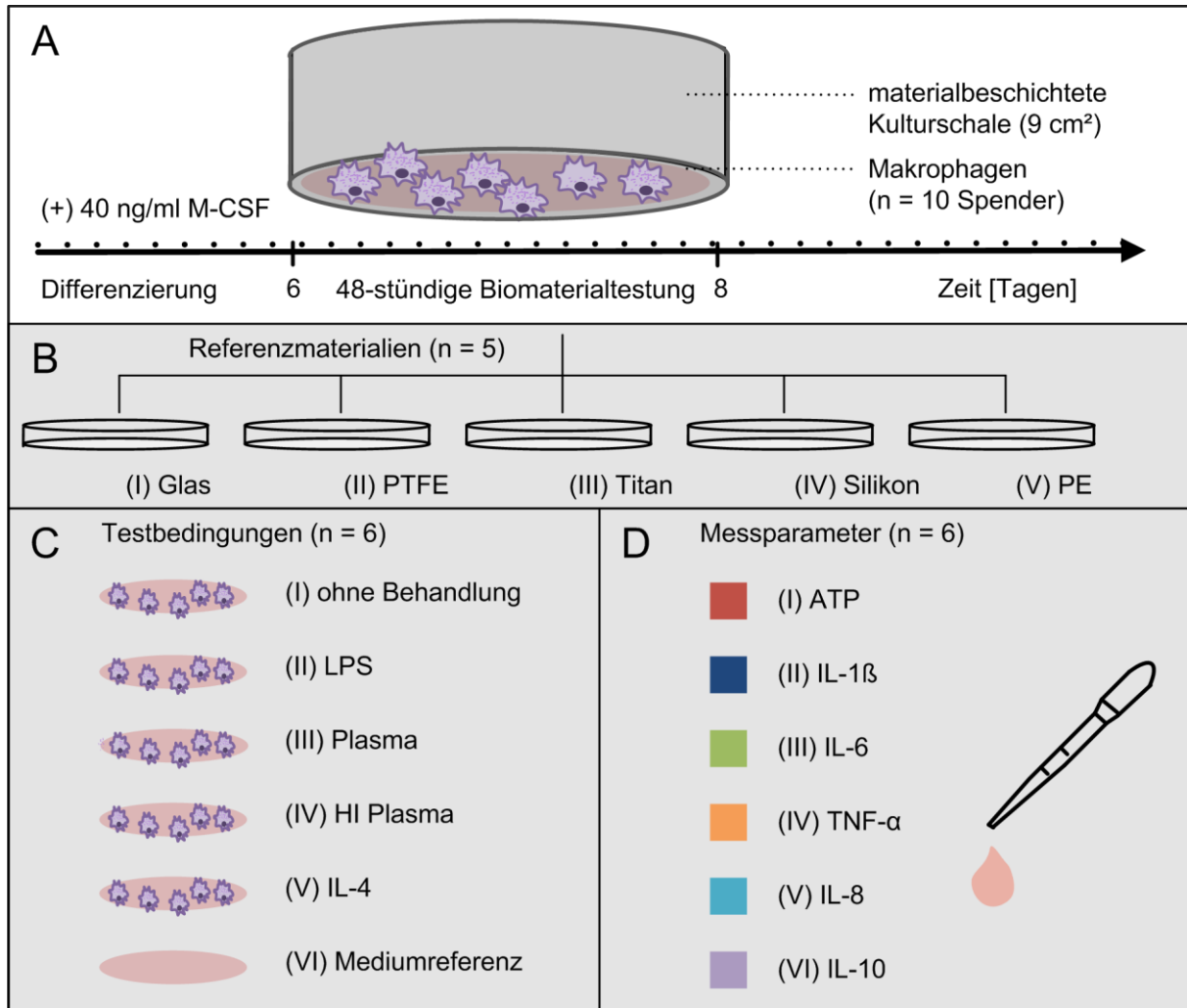


Abbildung 3-10 Vergleichendes Modellsystem zur Bewertung von Testbedingungen.

(A) Humane primäre Monozyten konnten unter M-CSF zu M2-Makrophagen differenzieren. Anschließend erfolgte die Kultivierung der M2-Makrophagen für 48 Stunden auf (B) den Referenzmaterialien Glas, PTFE, Titan, Silikon und PE. (C) Auf den Testoberflächen sollten Testbedingungen untersucht werden, die biomimetisch die biochemische und strukturelle Nische bei Implantation eines Materials abbilden. Die Oberflächenkontamination mit LPS polarisierte die Makrophagen zu einer starken Entzündung. Im Gegensatz hierzu stärkte die Gegenwart von IL-4 die Langlebigkeit der Makrophagen sowie die Fusion zu mehrkernigen Zellen. Die Wechselwirkung zwischen Plasmaproteinen und Material konnte durch die Oberflächenbehandlung mit Blutplasma abgebildet werden. Im Vergleich zum nativen Blutplasma führte das Erhitzen zur Inaktivierung von labilen Proteinen wie Komplement-, Wachstums- und Blutgerinnungsfaktoren. Als Kontrollen dienten Versuchsansätze ohne Behandlung sowie ohne Zellen. (D) Im Anschluss an die Kultivierungsphase erfolgte die Bestimmung der materialassoziierten Vitalität sowie von löslichen Zytokinen im konditionierten Kulturüberstand. Die Versuchsansätze konnten mit primären Makrophagen von zehn Spendern (n = 10) durchgeführt werden.

Im Zellkulturüberstand konnten die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α als proentzündliche Messparameter bestimmt werden. Zusätzlich ließen sich die Zytokine IL-8, IL-10 und TGF- β 1 als chemotaktische Messparameter beziehungsweise als direkte profibrotische Messparameter analysieren. Zusammenführend ermöglichten multifaktorielle Analysen die Einführung eines Bewertungsmodells für die Referenzmaterialien Glas, PTFE, Titan, Silikon und PE (siehe Gleichung 4 in Kapitel 2.2.4). Der anschließende Vergleich der Biomaterialbewertung zu präklinischen und klinischen Studien (siehe Kapitel 2.2.2) erzielte eine Validierung der Testbedingungen hinsichtlich ihrer Korrelation zur Studienlage und ließ eine Bewertung ihrer prädiktiven Aussagekraft zu.

Die Testbedingungen beeinflussten die Morphologie der materialadhärenten Makrophagen.

Im Anschluss an die 48-stündige Testphase verdeutlichte die Färbung des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (CD54) und des intrazellulären Strukturproteins β -Aktin die Adhäsion sowie die Morphologie der Makrophagen auf Glas-, Titan- und PTFE-Oberflächen (Abbildung 3-11). Hierbei war das Anhaften der Makrophagen an die Oberfläche Voraussetzung für die sensorische Erfassung der Materialeigenschaften und die Umsetzung des Signals in eine Reaktion auf den Fremdkörper wie beispielsweise die Freisetzung von Zytokinen. Jedoch verhinderten die Topographie, die optischen Eigenschaften sowie der Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Objekt die Aufnahme von histologischen Bildern auf Silikon- und PE-Oberflächen. Die Materialeigenschaften verdeutlichten die Grenzen der Anwendbarkeit histologischer Verfahren zur direkten Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Materialoberfläche. Auf den Referenzmaterialien Glas, Titan und PTFE konnte nach 48 Stunden die Abhängigkeit der Zellmorphologie von den gewählten Testbedingungen visualisiert werden. Ohne Vorbehandlung oder ohne Stimulation zeigten die Makrophagen auf den Glas-, Titan- und PTFE-Oberflächen eine zirkuläre Morphologie. Im Gegensatz hierzu induzierte die Stimulation mit LPS eine verstärkte zelluläre Adhärenz auf Glasoberflächen sowie die Bildung von Zellgruppen auf Titan- und PTFE-Oberflächen. Nach Behandlung der Glas- und Titanoberflächen mit Plasma war die Ausbildung von zytoplasmatischen Ausläufern zu beobachten. Die Behandlung der Materialoberflächen mit hitzeinaktiviertem Plasma ging wie zu erwarten mit einer geringeren zellulären Adhärenz einher.

3. Ergebnisse

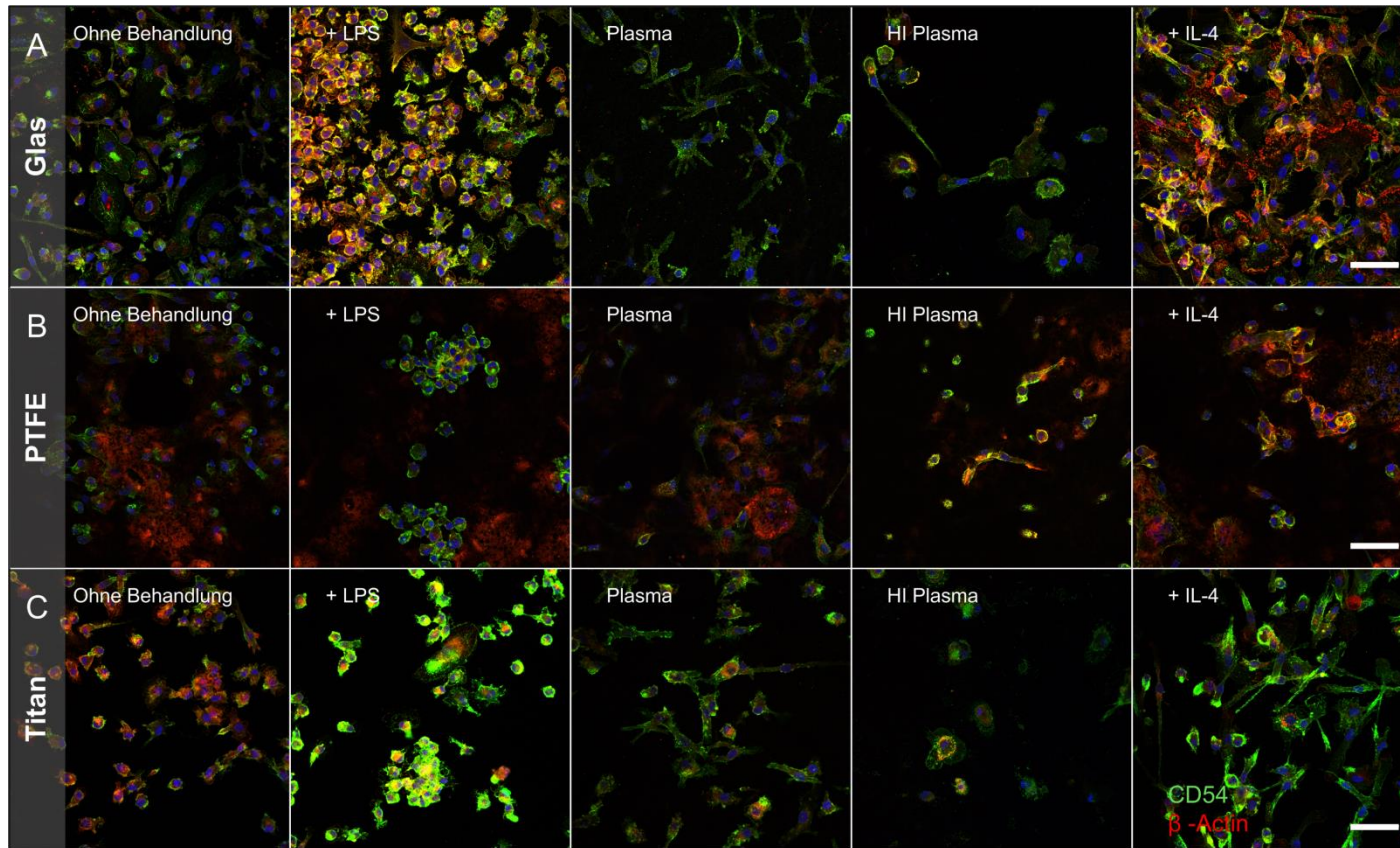


Abbildung 3-11 Morphologie und Adhäsion der Makrophagen an Glas-, PTFE- und Titanoberflächen in Abhängigkeit von den Testbedingungen.

Die immunhistologische Färbung des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (CD54, grün) und β -Aktin (rot) verdeutlichte morphologische Unterschiede zwischen den Testbedingungen und den Referenzmaterialien (A) Glas, (B) PTFE und (C) Titan. Eine ungleichmäßige Topographie sowie ein hoher Arbeitsabstand verhinderten die Aufnahme von Bildern auf Silikon- und PE-Oberflächen. Die Maßstab Balken bilden 50 μ m ab und sind für alle Bilder gültig. Die folgenden Abkürzungen sind: LPS für Lipopolysaccharid, HI für hitzeinaktiviert, IL für Interleukin.

In Abhängigkeit von der Materialoberfläche beeinflusste interessanterweise die Stimulation mit dem Zytokin IL-4 die Zellmorphologie: Auf Glasoberflächen bildeten die Makrophagen eine stark verzahnte, epitheloide Zellschicht. Wohingegen die Makrophagen auf Titanoberflächen eine längliche Morphologie annahmen. Jedoch konnte das Zytokin IL-4 die Ausbildung von Zellgruppen auf PTFE-Oberflächen nicht unterdrücken.

Die Vitalität der Zellen auf allen Referenzmaterialien war abhängig von den Testbedingungen.

Begründet auf der Annahme, dass vitale Zellen eine chronische Reaktivität auf einen Fremdkörper zeigen, ist die Quantifizierung von materialadhärenten Zellen sowie von Zellinfiltraten ein anerkanntes Bewertungskriterium der Biokompatibilität [ISO 10993-6:2007, Teil 6] (134). Wie bereits für die Referenzmaterialien Silikon und PE beschrieben, beeinflussten die Eigenschaften der Testoberflächen die mikroskopische Quantifizierung von Zellzahlen. Um auch auf den Oberflächen, die mikroskopisch nicht erfasst werden konnten, die Zellvitalität zu bestimmen, eigneten sich ersatzweise biochemische, semiquantitative Methoden wie die lumineszenzbasierte ATP-Messung (CellTiter) (siehe Abbildung 3-12). Als direktes, oberflächenexponiertes Analyseverfahren arbeitet diese semiquantitative Messmethode ohne Zellverluste während extensiver Waschschriffe. Sie deckt die gesamte Testoberfläche ab und eignet sich zur Anwendung auf unterschiedlichen Testobjekten. Interessanterweise korrelierten die durch die histologische Färbung erfassten Zellzahlen nicht mit den Ergebnissen der Vitalitätsbestimmung (siehe Abbildung 3-11). Zum Beispiel fiel der ATP-Messwert bei LPS-Stimulation ab, wohingegen die IL-4-Stimulation zu einer Zunahme der Vitalität führte - jedoch war unter beiden Testbedingungen eine starke Zelladhäsion an die Materialoberflächen zu beobachten. Dies verdeutlichte, dass die ATP-Spiegel abhängig von mehreren Einflussgrößen sind: (I) der Zellzahl auf der Materialoberfläche und (II) dem metabolischen Zustand der Zellen. In proentzündlichen M1-Makrophagen erfolgt der Glukosestoffwechsel durch aerobe Glykolyse, die eine schnellere ATP-Synthese ermöglicht, jedoch mit einem geringeren Energieertrag (dies ergibt 2 ATP Moleküle pro Glukosemolekül) einhergeht. Im Gegensatz dazu generieren M2-Makrophagen klassisch über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung ATP (hierbei entstehen 36 ATP Moleküle pro Glukosemolekül). (177, 178)

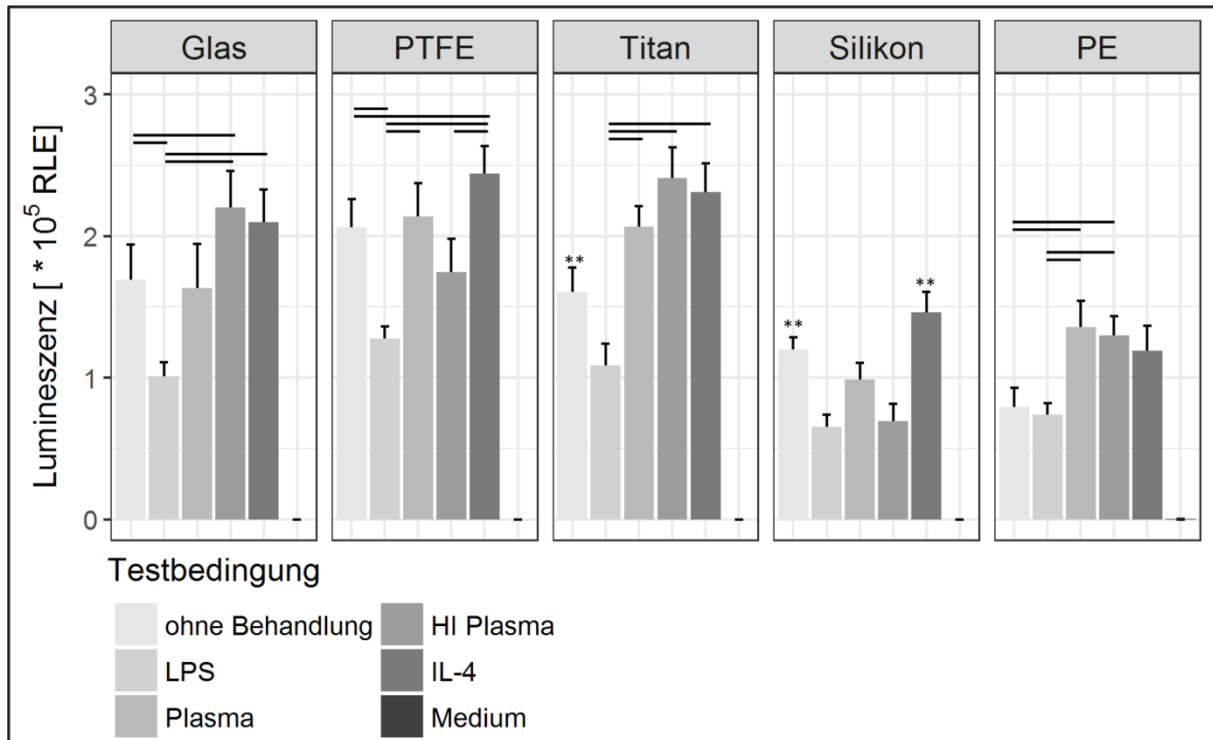


Abbildung 3-12 Vitalität der materialadhärenten Makrophagen in Abhängigkeit von den Testbedingungen.

Direkt im Anschluss an die Kultivierungsphase von 48 Stunden konnte auf den Referenzmaterialien mit einem lumineszenzbasierten Test (CellTiter) ATP semiquantitativ bestimmt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Testbedingungen bestanden auf allen Referenzmaterialien Glas, PTFE, Titan, Silikon und PE. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler dargestellt und setzen sich aus Messwerten von zehn abhängigen Spendern ($n = 10$) zusammen. Das Signifikanzniveau ist mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Zu allen anderen Versuchsgruppen signifikante Daten sind mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet. Die folgenden Abkürzungen sind: LPS für Lipopolysaccharid, HI für hitzeinaktiviert, IL für Interleukin und RLE für relative Lichteinheiten.

Die Quantifizierung von ATP entsprach auf allen Referenzmaterialien diesen Erwartungen: die LPS- und IL-4-stimulierten Testbedingungen bildeten die untere sowie die obere Grenze des Messbereichs ab. Dies deutet darauf hin, dass die Breite des experimentellen Designs das Entzündungsspektrum von M1- und M2-Makrophagen abdeckte. Signifikante Unterschiede zwischen den Testbedingungen zeigten, wie stark die Bewertung von Referenzmaterialien von den gewählten Testbedingungen abhängt. Im Vergleich zu allen anderen Testbedingungen führte beispielsweise die Kultivierung von Makrophagen ohne zusätzliche Behandlung auf Titan- und Silikonoberflächen zu signifikanten Unterschieden in der Zellvitalität. Die Oberflächenbehandlung mit hitzeinaktiviertem sowie nativem Plasma verdeutlichte einen materialabhängigen Effekt auf die Vitalität der Makrophagen. Nach einer Plasmaoberflächenbehandlung lag die materialassoziierte Vitalität auf Glas, Titan, PTFE und PE im höheren

Messbereich, wohingegen auf Silikonoberflächen eine geringe Vitalität nachzuweisen war. Unabhängig von den gewählten Testbedingungen wurde die Vitalität durch die Materialeigenschaften beeinflusst, so war die Vitalität auf Silikon- und PE-Oberflächen im Vergleich zu allen anderen Referenzmaterialien gering.

Die Testbedingungen beeinflussten die Zytokinfreisetzung.

Ein relativ neues Feld in der Biokompatibilitätsforschung ist die Charakterisierung von Biomaterialien hinsichtlich ihrer Eigenschaften, eine zellvermittelte Freisetzung von löslichen Entzündungsmediatoren auszulösen (79). Die Eigenschaft von Biomaterialien, die Freisetzung von Zytokinen zu modulieren, konnte bereits für die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 sowie für primäre Monozyten gezeigt werden (18, 139). Obwohl die Mechanismen der oberflächeninduzierten Zytokinfreisetzung und deren Funktion bei der Entwicklung einer Fibrose bis heute nicht aufgeklärt sind (79), lassen Studien aus angrenzenden Forschungsfeldern einen Rückschluss auf deren Einfluss und die Entstehung einer Fibrose zu (siehe hierfür Kapitel 1.3.3). In den durchgeführten Versuchen wies die Freisetzung der Zytokine durch primäre materialständige Makrophagen eine hohe Varianz zwischen den Spendern auf. Die Erhöhung der Replikationszyklen auf zehn Spender ermöglichte eine Abdeckung der hohen Varianz zwischen den Spendern und stärkte die Verlässlichkeit der Daten. Nach der Kultivierung für 48 Stunden bei 37 °C diente auf den Referenzmaterialien inkubiertes Kulturmedium zur Bestimmung der Schwellenkonzentration der gemessenen Parameter. Hierbei ist anzumerken, dass die Oberflächenbehandlung mit nativem oder hitzeinaktiviertem Plasma im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium keine Erhöhung des Zytokinspiegels herbeiführte und dass das eingesetzte Referenzmedium demnach eine geeignete Kontrolle war. Des Weiteren führte die Stimulation mit LPS zu einem Anstieg der meisten Zytokine. Ausschließlich die TGF- β 1-Spiegel blieben unbeeinflusst. Auf Grund des deutlich niedrigeren Zytokinspiegels unter allen anderen Testbedingungen und zur besseren Auflösung der Unterschiede zwischen den Testbedingungen wurden die Daten unter LPS-Stimulation in einem separaten Schaubild zusammengefasst (siehe Abbildung 3-13).

Eine Entzündung zu Beginn des Kontakts zwischen Zellen und dem Biomaterial stellt einen Schlüsselmechanismus für die chronische Antwort auf einen Fremdkörper dar (101). Hierfür konnte die Konzentration proentzündlicher Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Zellkulturüberstand nach 48 Stunden bestimmt werden.

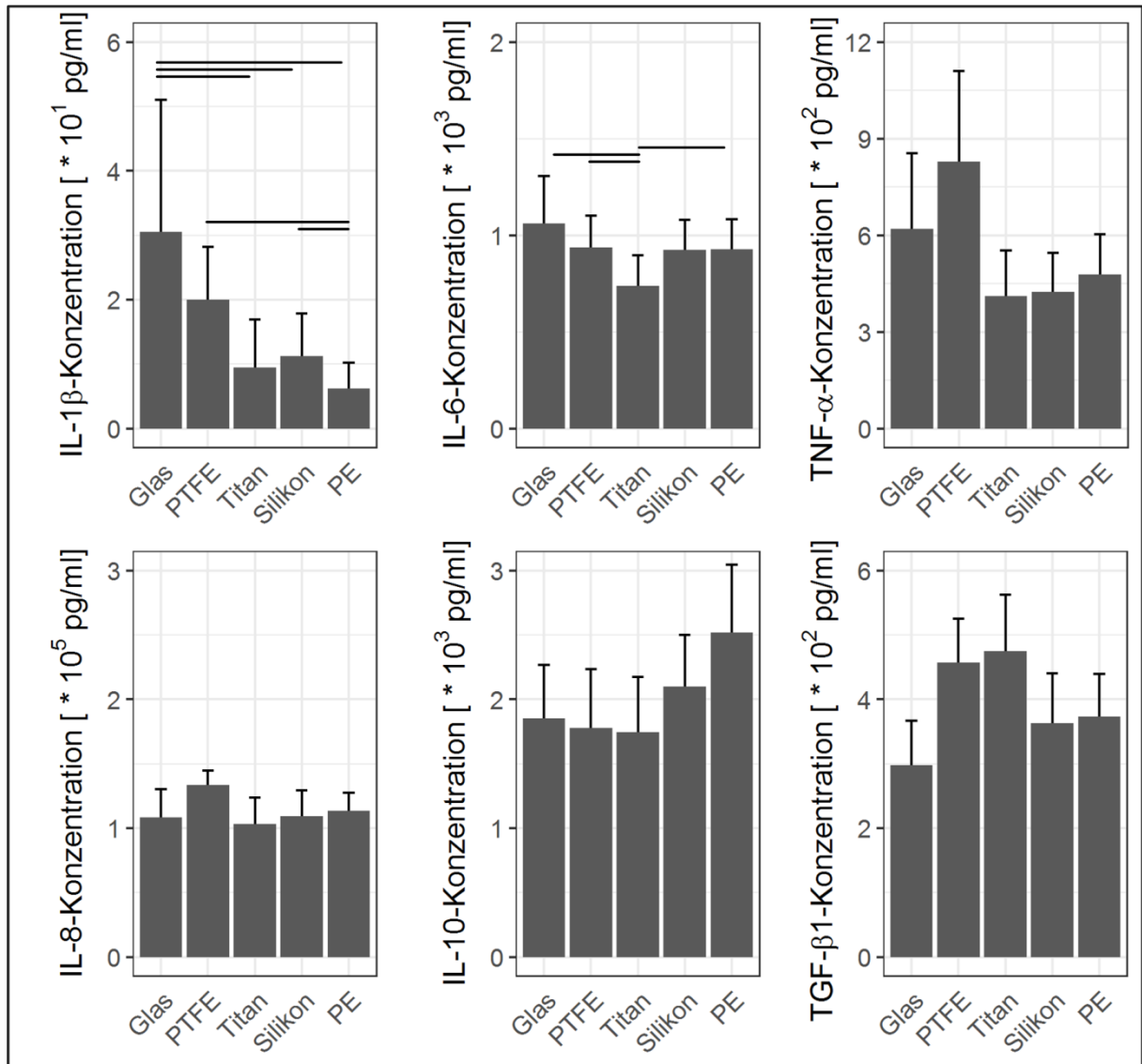


Abbildung 3-13 Im Vergleich zu den materiainduzierten Effekten führte die Stimulation der Makrophagen mit LPS eine höhere Ausschüttung der Zytokine herbei.

Die Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 und IL-10 wurden unter LPS-Stimulation vermehrt ausgeschüttet, lediglich TGF- β 1-Spiegel wiesen im Vergleich zu den unstimulierten Testbedingungen keine Veränderung der Freisetzung auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Materialien ließen sich ausschließlich für IL-1 β und IL-6 feststellen. Die Balkendiagramme fassen die Mittelwerte und Standardfehler aus den Daten von zehn abhängigen Spendern (n = 10) zusammen. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ ist signifikant.

Im Hinblick auf die Testvariablen unterschieden sich die IL-1 β -Spiegel zwischen den Materialien und den Testbedingungen nicht. Auf den meisten Referenzmaterialien lag die Freisetzung des Zytokins IL-1 β unterhalb der Messgrenze. Ähnlich zeigten nur Makrophagen weniger Spender eine Freisetzung von IL-1 β als Reaktion auf PTFE- und Silikonoberflächen (siehe Abbildung 3-14 A). Im Gegensatz zu IL-1 β setzen die Makrophagen das Zytokin IL-6 in Abhängigkeit von den Testbedingungen frei (siehe Abbildung 3-14 B). Auf allen

Materialien führte die Stimulation mit dem Zytokin IL-4 zu einer Abnahme des IL-6-Spiegels. Ein modulierender Effekt der Testbedingungen konnte auf Glasoberflächen beobachtet werden. Hierbei waren signifikant höhere IL-6-Spiegel für unbehandelte Testbedingungen (87 ± 57 pg pro ml) im Vergleich zu mit hitzeinaktiviertem plasmabehandelten Oberflächen (31 ± 13 pg pro ml) und IL-4-stimulierten Testbedingungen (9 ± 3 pg pro ml) zu beobachten. Titan-, PTFE- und Silikonoberflächen stimulierten insbesondere bei Vorbehandlung der Testoberflächen mit hitzeinaktiviertem Plasma die Freisetzung von TNF- α (siehe Abbildung 3-14): Titan (283 ± 151 pg pro ml), PTFE (305 ± 72 pg pro ml) und Silikon (596 ± 218 pg pro ml). Eine modulierende Kapazität der Wechselwirkung zwischen Plasma und Material konnte auf Titan und PTFE beobachtet werden. Auf diesen Materialien führte die Oberflächenbehandlung mit Plasma eine Abnahme des TNF- α -Spiegels (Titan: 20 ± 4 pg pro ml; PTFE; 58 ± 27 pg pro ml) herbei. Im Gegensatz hierzu induzierte die Plasmabehandlung von Silikonoberflächen (355 ± 156 pg pro ml) jedoch eine Zunahme des TNF- α -Spiegels. Zusätzlich bestand auf Silikonoberflächen eine starke Abhängigkeit der TNF- α -Freisetzung von den Testbedingungen. Die Materialeigenschaft, eine durch Makrophagen vermittelte Chemotaxis von Zellen herbeizuführen, konnte im Versuchsansatz durch die Freisetzung von IL-8 erfasst werden (104-106). Im Modellsystem fand die Freisetzung von IL-8 in Abhängigkeit von den Testbedingungen statt (siehe Abbildung 3-15 A). Hierbei führte die Behandlung von Glasoberflächen mit nativem Plasma ($78 \pm 18 * 10^3$ pg pro ml) im Vergleich zu hitzeinaktiviertem Plasma ($45 \pm 11 * 10^3$ pg pro ml) zu einer signifikanten Zunahme des IL-8-Spiegels. Außerdem war auf allen Referenzmaterialien nach Stimulation mit IL-4 eine signifikante Abnahme des IL-8-Spiegels zu beobachten. Darüber hinaus zeigten M2-Makrophagen im Anschluss an die Differenzierung eine phänotypische IL-10-Freisetzung (antientzündlich) auf (siehe Abbildung 3-15 B), wobei kein IL-12 (proentzündlich) freigesetzt wurde. Zusätzlich benötigte die Freisetzung von IL-10 eine kostimulierende Aktivierung, wie sie beispielsweise durch LPS oder Materialeigenschaften herbeigeführt werden kann. Trotz proentzündlicher LPS-Stimulation führte die Aktivierung des aus M2-Makrophagen transpolarisierten M1-Phänotyps zu einem blockierten IL-10- versus IL-12-Freisetzungsprofil. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmten mit den von Verreck und Kollegen (2006) gezeigten Beobachtungen überein und demonstrierten über die Testphase von 48 Stunden die Stabilität des Differenzierungsprofils. (142)

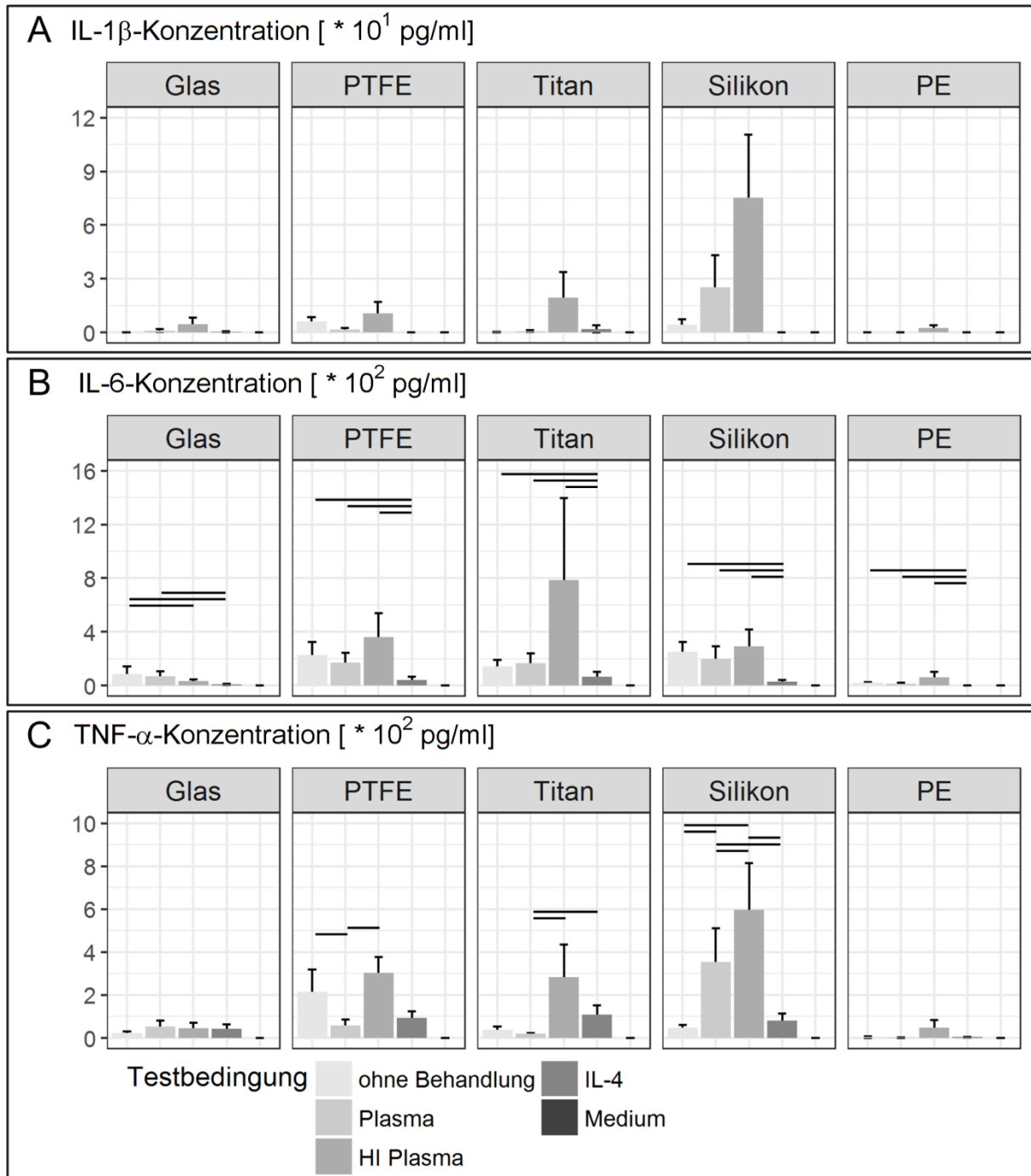


Abbildung 3-14 Sekretion von proentzündlichen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

Die Kultivierung von Makrophagen auf den Referenzmaterialien führte zur Aktivierung der Makrophagen und zur Freisetzung von Zytokinen. Die Reaktion der Makrophagen auf die Referenzmaterialien war hierbei von den Testbedingungen abhängig. (A) Interessanterweise bestand zwischen den Testbedingungen keine Unterschiede in der IL-1 β -Freisetzung. (B) Auf Glasoberflächen wies IL-6 jedoch eine starke Abhängigkeit von den Testbedingungen auf. (C) Wohingegen für Testungen auf PTFE-, Titan- und Silikonoberflächen TNF- α in Abhängigkeit von den Testbedingungen freigesetzt wurde. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardfehler von zehn Spendern (n = 10). Ein p-Wert von $\leq 0,05$ ist als Signifikanzgrenze festgelegt. Die Daten nach LPS-Stimulation zeigt Abbildung 3-13. Die folgenden Abkürzungen definieren HI als hitzeinaktiviert und IL als Interleukin.

3. Ergebnisse

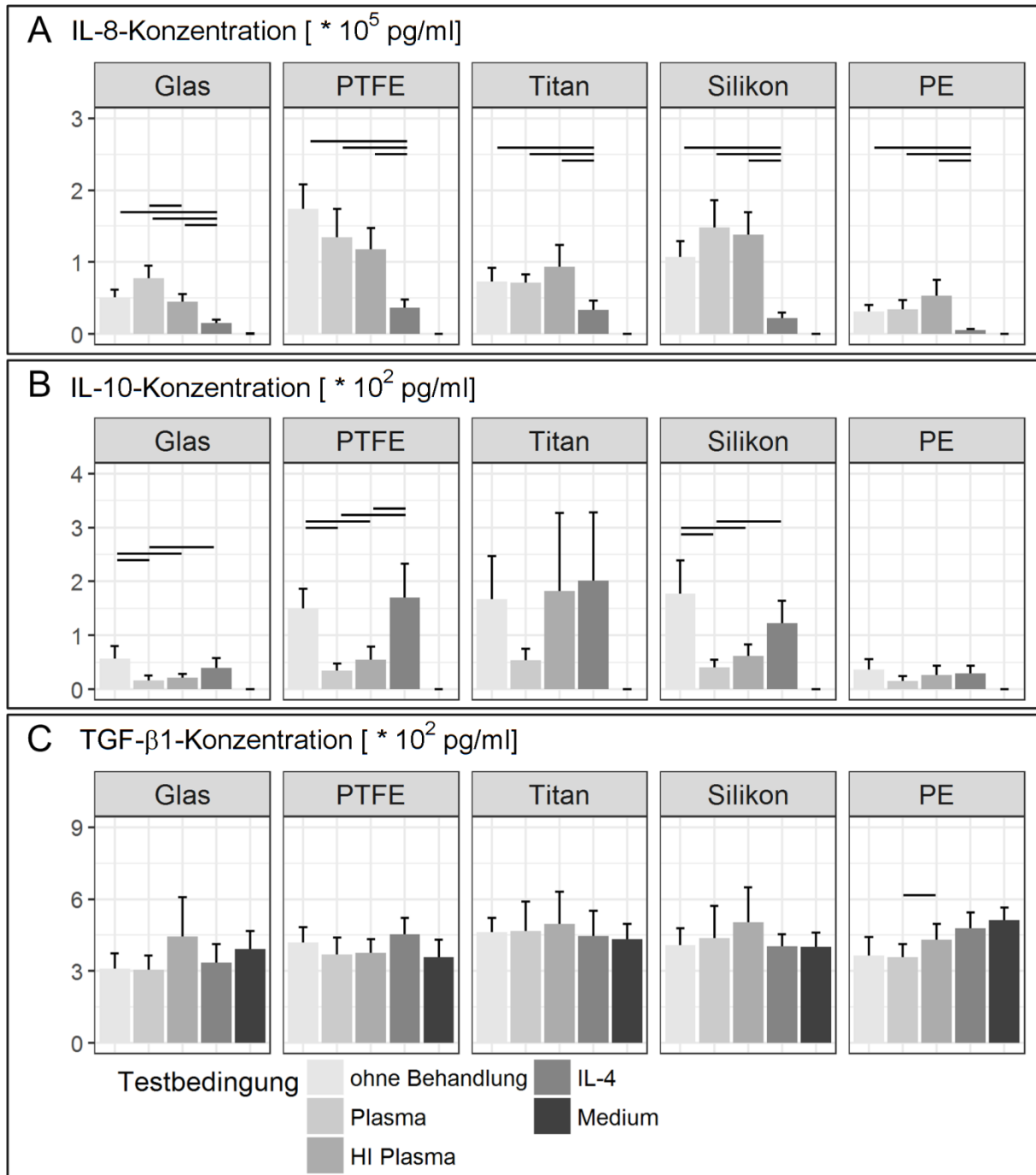


Abbildung 3-15 Aktive Sekretion von IL-8, IL-10 und TGF-β1.

IL-8 und IL-10 zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Testbedingungen auf, wohingegen kein Unterschied des TGF-β1-Spiegels im konditionierten Medium im Vergleich zum Referenzmedium vorlag. (A) Eine Abhängigkeit der IL-8-Sekretion bestand für Tests auf Glasoberflächen. (B) Zusätzlich wiesen die IL-10-Spiegel signifikante Unterschiede zwischen den Testbedingungen auf Glas-, PTFE- und Silikonoberflächen auf. (C) Die Sekretion von TGF-β1 durch die materialständigen Makrophagen überschritt den Schwellenwert im Referenzmedium nicht. Die Zytokine konnten im Kulturüberstand von zehn abhängigen Spendern (n = 10) bestimmt werden und sind als Mittelwerte und Standardfehler abgebildet. Ein p-Wert von ≤ 0,05 kennzeichnet das Signifikanzniveau. Die Daten unter LPS-Stimulation sind in Abbildung 3-13 zusammengefasst. Die folgenden Abkürzungen sind als HI für hitzeinaktiviert und IL für Interleukin festgelegt.

Die kontroverse Studienlage verweist auf eine mögliche konzentrationsabhängige Beteiligung von IL-10 an fibrotischen Prozessen. Während eine moderate IL-10-Konzentration das Bindegewebgleichgewicht stabilisiert, führt die Überexpression durch die Rekrutierung von Fibrozyten sowie die Aktivierung von M2-Makrophagen die Entwicklung einer Fibrose herbei (109, 110). Nichts desto trotz konnte eine Behandlungsabhängigkeit des IL-10-Spiegels auf den Materialoberflächen von Glas-, PTFE und Silikon beobachtet werden. Dahingegen trugen unbehandelte und IL-4-stimulierte Testbedingungen zu einer Erhöhung des IL-10-Spiegel bei. Eine direkte Beurteilung eines Materials hinsichtlich seiner Eigenschaft, eine Fibrose auszulösen, lieferte die Quantifizierung von profibrotischen Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 im Zellkulturmedium (112, 113, 116). Im Referenzmedium ließ sich eine hohe TGF- β 1-Konzentration als ein Bestandteil von fetalem Kälberserum messen (siehe Abbildung 3-15 C). Wie bereits für die Zytokine FGF und PDGF auf Glas- und Titanoberflächen gezeigt (siehe Kapitel 3.3.1), überstieg die TGF- β 1-Konzentration nach Kultivierung von Makrophagen auf den Referenzoberflächen nicht den Schwellenwert im Kulturmedium. Jedoch war die Supplementierung von Serum zum Kulturmedium für die biomimetische Nachahmung der Wechselwirkung zwischen Biomaterial und Proteinen von Bedeutung (179). Interessanterweise führte die Kultivierung von Makrophagen auf plasmabehandelten PE-Oberflächen (380 ± 70 pg pro ml) im Vergleich zu hitzeinaktivierten plasmabehandelten PE-Oberflächen (346 ± 60 pg pro ml) zu einer signifikanten Abnahme des TGF- β 1-Spiegels (p -Wert = 0,01). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der Einfluss von physiologischen Testbedingungen auf die Freisetzung von Zytokinen gezeigt werden. Die Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 wies in Antwort auf Glasoberflächen eine Abhängigkeit von den Testbedingungen auf. Wohingegen die Freisetzung von TNF- α in Antwort auf Titan-, PTFE- und Silikonoberflächen von den Testbedingungen abhing. Zusätzlich konnten Unterschiede in der IL-10-Konzentration zwischen den Testbedingungen nach Testung auf Glas-, PTFE- und Silikonoberflächen gezeigt werden. Die Zytokine IL-1 β und TGF- β 1 eigneten sich unter den gewählten Testbedingungen weniger als Bewertungskriterien zwischen den Testbedingungen. Trotz der beobachteten Effekte ließ sich jedoch kein allgemeingültiger, valider Zusammenhang zwischen allen Messparametern und den Testbedingungen feststellen.

Ein vergleichendes, statistisches Modellsystem ermöglichte die Überführung der komplexen multifaktoriellen Daten in ein Punktesystem, das einerseits die Unterscheidungskapazität zwischen den Referenzmaterialien aufzeigen sollte und zusätzlich für die Biomaterialbewertung eingesetzt werden konnte.

Zur Bestimmung der Unterscheidungskapazität erfolgte für jede Testbedingung die Überführung des Signifikanzprofils, das sich aus einem paarweisen Vergleich zwischen einem Material zu allen anderen Materialien ableitet, in ein Punktesystem (siehe Gleichung 4 in Kapitel 2.2.4). Hierbei erhielten Materialien, die im Vergleich zu allen anderen Materialien signifikant höhere Messparameter aufwiesen, einen positiven Signifikanzwert. Eine negative Bewertung ergab sich für Materialien, die im Vergleich zu den anderen Materialien zahlreiche signifikant niedrigere Messparameter aufwiesen. Dieses einfache Bewertungsmodell reduzierte die komplexe Datenmatrix aus den fünf Referenzmaterialien, den fünf Testbedingungen und den zehn getesteten Zellspendern auf ein Bewertungskriterium. Für jedes Material konnten die erfassten Signifikanzwerte für jeden einzelnen Messparameter in eine Heat Map (siehe Abbildung 3-16) überführt werden. Dies visualisierte graphisch die Unterschiede zwischen den Biomaterialien und den einzelnen Messparametern. Abschließend konnte für jede Testbedingung das parameterabhängige Signifikanzprofil durch die Summenbildung aus den einzelnen Signifikanzwerten in ein Materialbewertungsmodell übersetzt werden (Abbildung 3-17).

Die Behandlung einer Materialoberfläche mit Plasma erzielte eine valide Biomaterialcharakterisierung in vitro.

In präklinischen und klinischen Studien (siehe Tabelle 3-2) ist für die Referenzmaterialien eine steigende fibrotische Eigenschaft von PE über Titan und PTFE zu Silikon nachgewiesen. Diese literaturbasierte Materialbewertung bildete die Grundlage zur Prüfung der Validität und des prädiktiven Werts der gewählten Testbedingungen. In der Heat Map ist der Signifikanzwert für jedes einzelne Referenzmaterial und für jeden einzelnen Messparameter dargestellt (siehe Abbildung 3-16). Ein Messparameter mit einer steigenden Farbe von Blau zu Rot in der Reihenfolge von PE über Titan und PTFE zu Silikon eignete sich als aussagekräftiger Messparameter zur Bewertung der fibrotischen Eigenschaften eines Biomaterials. Beispielsweise konnte nach Oberflächenbehandlung mit nativem Plasma eine hohe Aussagekraft für den Messparameter IL-8 nachgewiesen werden.

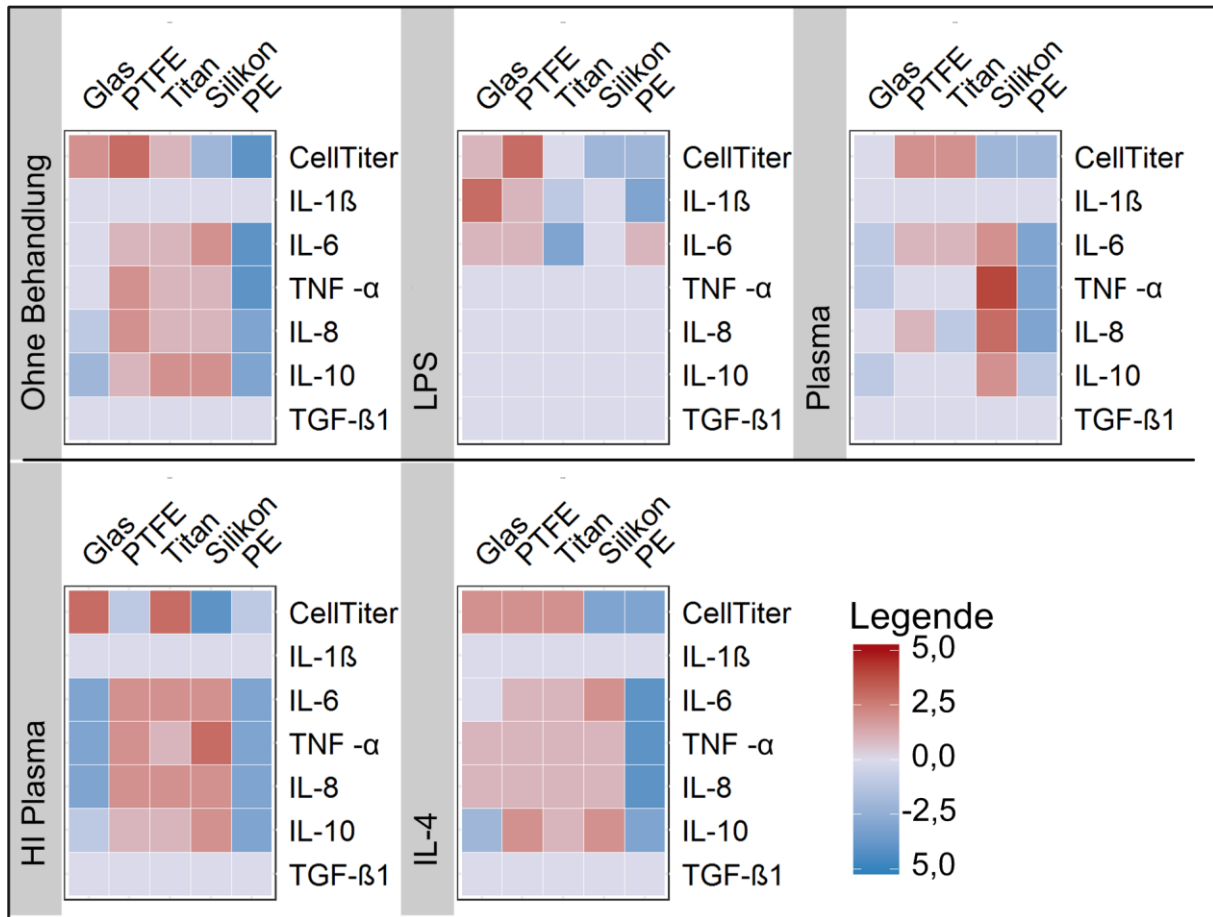


Abbildung 3-16 Das Signifikanzprofil von jedem Referenzmaterial im Vergleich zu allen anderen Referenzmaterialien konnte in ein Bewertungsmodell überführt werden.

Der erhaltene Signifikanzwert konnte in eine Farbskalierung von blau für negative Werte und rot für positiv Werte überführt werden. Hierdurch ermöglichte das Punktemodell die Visualisierung von Unterschieden zwischen den Testbedingungen und letztendlich die Bewertung von jedem spezifischen Messparameter hinsichtlich seiner Aussagekraft. Auf der Grundlage der literaturbasierten Bewertung der Referenzmaterialien besitzt ein Messparameter mit einer steigenden Farbe von Blau zu Rot von PE, über Titan und PTFE zu Silikon eine hohe Aussagekraft.

Dagegen kennzeichnete die Zytokine IL-6, TNF- α und IL-10 nach der Oberflächenbehandlung mit Plasma zwar eine hohe Korrelation zum Sollwert. Jedoch zeigten sich im Bewertungsrang bei den Referenzmaterialien Titan und PTFE keine Unterschiede was die Aussagekraft der Messparameter IL-6, TNF- α und IL-10 abschwächt. Im Gegensatz dazu besaßen die Messparameter IL-1 β und TGF- β 1 keine Unterscheidungskapazität zwischen den Biomaterialien, was sich durch keine Übereinstimmung der Farbskalierung zur literaturbasierten Bewertung der Referenzmaterialien zeigte. Im entwickelten Punktemodell verdeutlichte das Farbmuster der Heat Map das Signifikanzprofil unter den jeweiligen Testbedingungen und visualisierte Unterschiede zwischen diesen.

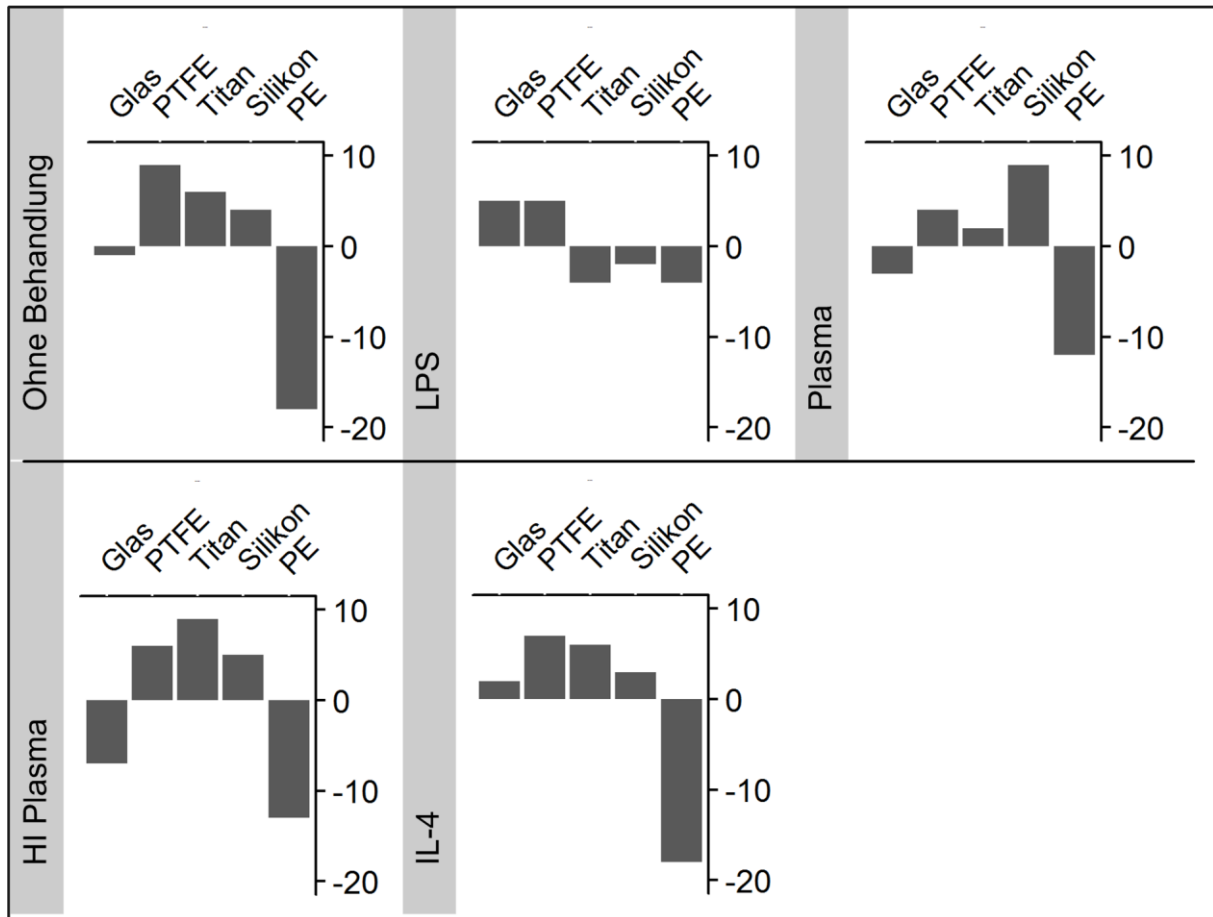


Abbildung 3-17 Die Summe der Signifikanzwerte aller einzelnen Messparameter konnte in ein Bewertungsmodell der Referenzmaterialien überführt werden.

Die Balkendiagramme stellen für jede Testbedingung die Ergebnisse des Bewertungsmodells dar. Der Vergleich mit der literaturbasierten Rangordnung der Biomaterialien ermöglichte eine Validierung der getesteten Bedingungen im Hinblick auf ihre Aussagekraft. Hinsichtlich der beschriebenen Biomaterialbewertung wies die Oberflächenbehandlung mit humanem Plasma eine hohe Validität auf.

Der Vergleich innerhalb der Heat Map bestärkte das gewählte Studiendesign, das den Einfluss von Testbedingungen auf die Bewertung von Biomaterialien zeigt. Unter jeder einzelnen Testbedingung wirkten sich Unterschiede im Farbmuster beziehungsweise im Signifikanzwert auf die finale Biomaterialbewertung aus. Anhand der aktuellen Studienlage ließen sich die Referenzmaterialien einstufen und ermöglichten eine Validierung der abgeleiteten Materialbewertung. Hierbei führte die Oberflächenbehandlung mit nativem Plasma zu einer Materialbewertung von PE ($\sum\text{Score} = -12$) über Titan ($\sum\text{Score} = 2$) und PTFE ($\sum\text{Score} = 4$) zu Silikon ($\sum\text{Score} = 9$). Diese Bewertung stimmte mit der Einschätzung aus präklinischen und klinischen Studien überein (siehe Tabelle 3-2). In Analogie zu den Ergebnissen unter der Oberflächenbehandlung mit Blutplasma erhielten interessanterweise die Referenzmaterialien

PE und Glas unter den Testbedingungen ohne Behandlung und mit hitzeinaktivierter Plasmabehandlung negative Rangwerte. Dagegen wurden unter diesen Testbedingungen die Referenzmaterialien PTFE, Titan und Silikon mit positiven Rängen belegt. Dabei wies die relative Rangposition der positiv bewerteten Referenzmaterialien zueinander nur unter Plasmabehandlung eine Übereinstimmung mit der Studienlage auf. Diese Beobachtungen verdeutlichten, dass insbesondere die Testungen auf Silikon-, PTFE- und Titanoberflächen von der Wahl geeigneter Testbedingungen abhängig waren. Interessanterweise war die Bewertung der Referenzmaterialien nach Stimulation mit LPS auf die Messparameter CellTiter, IL-1 β und IL-6 begrenzt, da alle anderen Messparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien ergaben. Hierbei war im Vergleich zu allen anderen Testbedingungen ausschließlich nach Stimulation mit LPS eine materialabhängige IL-1 β -Freisetzung zu beobachten. Dies begründet, dass die Materialbewertung unter LPS-Stimulation keine Analogie zu den anderen Testbedingungen aufwies. Titan (Σ Score = - 4), Silikon (Σ Score = - 2) und PE (Σ Score = - 4) erhielten eine negative Bewertung. Die Referenzmaterialien Glas (Σ score = 5) und PTFE (Σ Score = 5) wurden positiv bewertet. Die starke Abweichung der erzielten Biomaterialbewertung nach LPS-Stimulation verdeutlichte, wie sensitiv die Bewertung eines Biomaterials von dessen Oberflächenreinigung abhängig und wie wichtig eine ausreichende Oberflächenreinigung vor Durchführung einer Biomaterialtestung ist. Zusammenfassend veranschaulichte das vergleichende statistische Bewertungsmodell Unterschiede zwischen den Testmaterialien und den Messparametern. Die Heat Map visualisierte das Signifikanzprofil und ermöglichte die Identifizierung von Messparametern mit einer hohen prädiktiven Aussagekraft. Unterschiede zwischen den gewählten Testbedingungen wurden im Farbmuster der Heat Map deutlich und zeigten die Abhängigkeit der Materialtestung von den gewählten Testbedingungen auf. Diese Unterschiede beeinflussten wiederum die Bewertung eines Biomaterials. Die Materialbewertung unter autologer Blutplasmaoberflächenbehandlung wies im Vergleich zur präklinischen und klinischen Bewertung der getesteten Referenzmaterialien eine hohe prädiktive Aussagekraft auf und stärkte die Validität dieser Testbedingung. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Biomaterialstudien möglich ist, wenn passende Testbedingungen verifiziert werden.

3.5 Dreidimensionales Wundgewebe als Fremdkörpermodelle

Bisherige *in vitro* Fremdkörpermodelle bilden die Komplexität der Prozesse *in vivo* nur bedingt ab. Für die Entwicklung eines aussagekräftigen *in vitro* Modellsystems ließ sich im vorangegangenen Teil der Arbeit die Oberflächenbehandlung mit humanem Blutplasma als eine verlässliche Testbedingung bestimmen (3). Jedoch berücksichtigte dieses Testverfahren ausschließlich die Wechselwirkungen zwischen dem Biomaterial, den Bestandteilen im Blutplasma und den eingesetzten Makrophagen - die Reaktion von Fibroblasten auf das Fremdmaterial blieb außen vor. Das beschriebene indirekte Modellsystem charakterisierte bereits das Fremdkörpersignal über die Reaktion von Fibroblasten und zeigte für relevante Teilprozesse wie die Chemotaxis und die Umstrukturierung von Bindegewebe die Übersetzung des Signals in eine Fremdkörperreaktion (2). Ein Nachteil solcher indirekten Testverfahren bleibt insbesondere, dass der Effekt des Fremdmaterials ausschließlich zu einem bestimmten Zeitpunkt charakterisiert wird und keine Kommunikation zwischen den Zellen über rückkoppelnde Signale möglich ist. Dies begründete in der anschließenden Studie die Rekonstruktion eines direkten dreidimensionalen Gewebes aus Makrophagen, Fibroblasten und Matrixkomponenten. Dieses Modell bildete biomimetisch die Grenzflächen zwischen der Biomaterialoberfläche, der Wunde und dem nativen Gewebe ab (siehe Abbildung 3-18). *In vivo* bettet die Einblutung in das entstandene Defektareal den Fremdkörper in eine provisorische dreidimensionale Fibrinmatrix ein. Diese verschließt den Wunddefekt und bildet die Grenzfläche zur biophysikalischen Grundsubstanz der nativen Bindegewebsmatrix, den Kollagenfasern. Die verschiedenen dreidimensionalen Matrixstrukturen in einer Wunde lassen sich *in vitro* nachbauen. Im entwickelten Modellsystem bildeten Makrophagen in einer Fibrinmatrix das Defektareal zwischen Biomaterial und dem umliegenden Bindegewebe ab. In einem stehenden Zellkulturträgersystem ließen sich Bindegewebsmodelle aus Fibroblasten (I) in einer Fibrinmatrix und (II) in einer Kollagenmatrix apikal auf das Fibrinhydrogel mit Makrophagen aufsetzen. Diese bildeten einerseits (I) die Einwanderungszone von Fibroblasten in die Wundnische sowie alternativ (II) die Grenzflächen zum nativen Bindegewebe nach. Die direkte Kommunikation zwischen den Makrophagen und den Fibroblasten war über den Austausch löslicher Stoffe durch eine poröse Membran im Boden des Trägersystems zwischen beiden Kompartimenten gewährleistet. Studien auf PTFE- und Titanoberflächen dienten einer Bewertung der Modellsysteme hinsichtlich ihrer Unterscheidungskapazität.

3. Ergebnisse

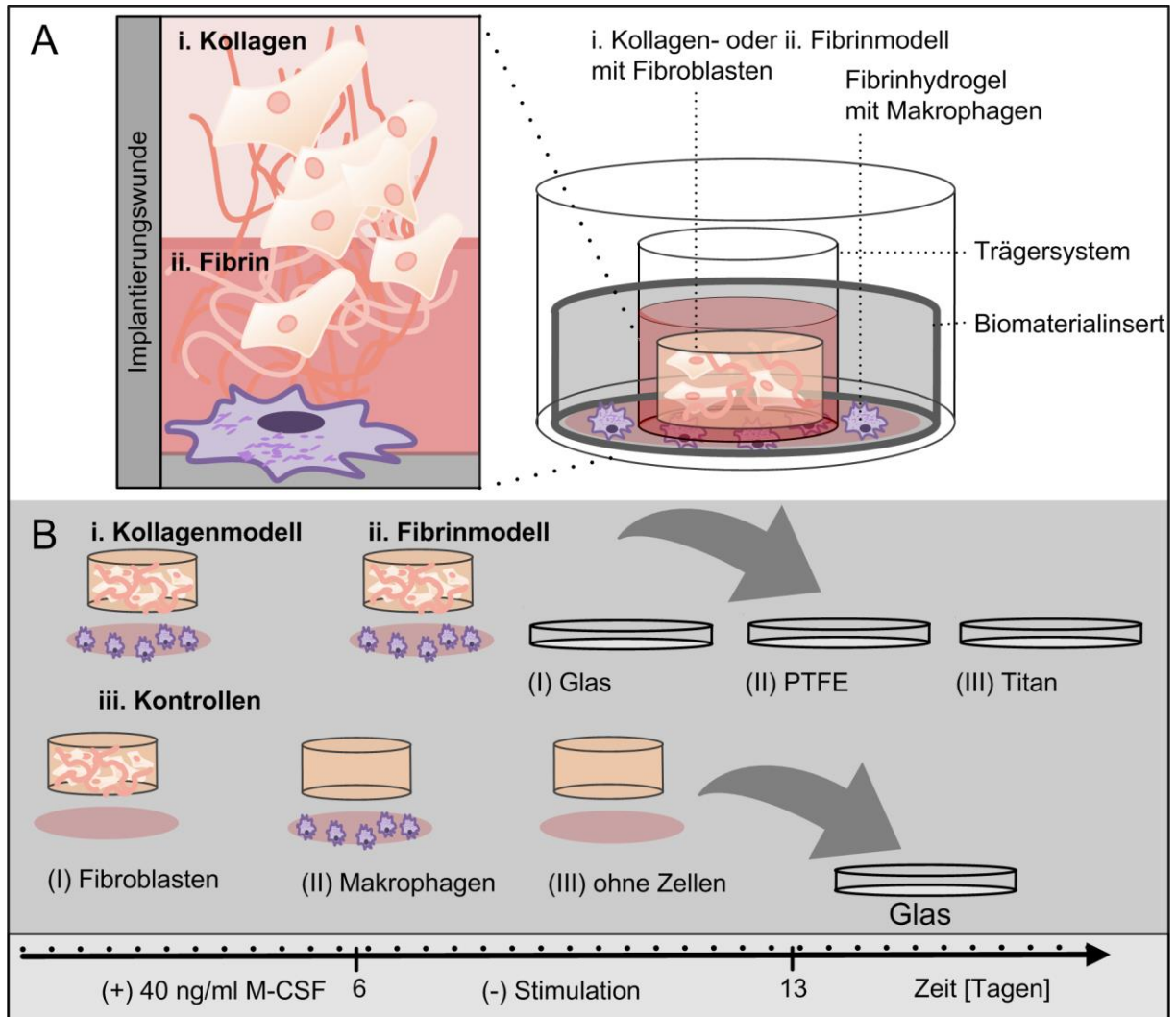


Abbildung 3-18 Das dreidimensionale Fremdkörpermodell bildete die Grenzflächen in der Wundumgebung ab.

(A) Das entwickelte Kokultursystem kombinierte Zell- und Matrixkomponenten, welche die Wundumgebung sowie das native Bindegewebe abbilden. In direktem Kontakt zu der Biomaterialoberfläche erfolgte die Bildung einer Fibrinmatrix mit Monozyten. Ein stehendes Zellkulturträgersystem unterstützte den Aufbau einer fibrösen Bindegewebskomponente aus Fibroblasten in einer Fibrinmatrix oder einer Kollagenmatrix. (B) Auf den Referenzmaterialien Glas, PTFE und Titan erfolgte der Aufbau von den beschriebenen i. kollagenbasierten und ii. fibrinbasierten Fremdkörpermodellen; iii. Monokulturmodelle mit Fibroblasten oder Makrophagen sowie Modellen ohne Zellen eigneten sich für Studien über den Einfluss der einzelnen Modellkomponenten. Dieses Modellsystem wurde für 6 Tage unter M-CSF-Stimulation kultiviert und anschließend bis Tag 13 ohne Stimulation weiter gezogen. Insgesamt konnte das Fremdkörpermodellsystem mit fünf unterschiedlichen Monozytenspendern (n = 5) jeweils im Triplikat (n = 3) aufgebaut werden.

Auf Glasoberflächen ermöglichten Modelle mit (I) Makrophagen und Fibroblasten, ausschließlich (II) Makrophagen oder (III) Fibroblasten sowie (IV) ohne Zellen einen Rückschluss auf den Einfluss der Komponenten auf das komplexe System. Zahlreiche quantitative Endpunkte charakterisierten einerseits das Entzündungsgeschehen als auch die Ablagerung von Bindegewebe im Modellsystem. Letztendlich reduzierte eine Hauptkomponentenanalyse die Dimensionen des generierten, komplexen Datensatzes und zeigte so die Unterscheidungskapazität des Modellsystems zwischen den Referenzmaterialien PTFE und Titan auf.

Aus humanem Blutplasma konnte eine Fibrinmatrix gewonnen werden, die für eine Langzeitkultivierung in den dreidimensionalen Fremdkörpermodellen stabilisiert werden musste.

In vivo leitet der Fremdkörperkontakt sowie die Gewebsverletzung eine Aktivierung der Koagulation des Blutplasmas ein und setzt über ein Enzym-Protein-Kaskadensystem Fibrinogen zu Fibrin um (180). Zur Anwendung *in vitro* ist die Herstellung von Fibrinhydrogelen aus Blutplasma bereits beschrieben (147, 181, 182). Mit dem Ziel eine standardisierte Matrix herzustellen, begründeten die natürlichen Schwankungen des physiologischen Fibrinogenspiegels (2 bis 4 mg pro ml) das Zusammenführen des Plasmas von mehreren Spendern (n = 10) (183).

Citrat und Phosphat stabilisierten über die Bindung des Kofaktors Calcium den flüssigen Zustand des Blutplasmas (180). Letztendlich ließ sich der stabilisierte Zustand mit 15 mM Calcium aufheben und die Koagulation des Plasmas optimal einleiten (Abbildung 3-19 A). Weiterhin unterstützte Thrombin (2 Einheiten pro ml) zusätzlich die natürliche enzymatische Katalyse von Fibrinogen zu Fibrin (Abbildung 3-19 B). Zusätzlich erforderte das natürlicherweise im Blutplasma vorkommende fibrinolytische Enzym Plasmin eine Stabilisierung der Fibrinmatrix für eine Langzeitkultivierung (183). Das hierfür eingesetzte Antifibrinolytikum Tranexamsäure (t-AMCA) hemmt über die Komplexbildung mit dem Propeptid Plasminogen dessen enzymatische Aktivierung (147).

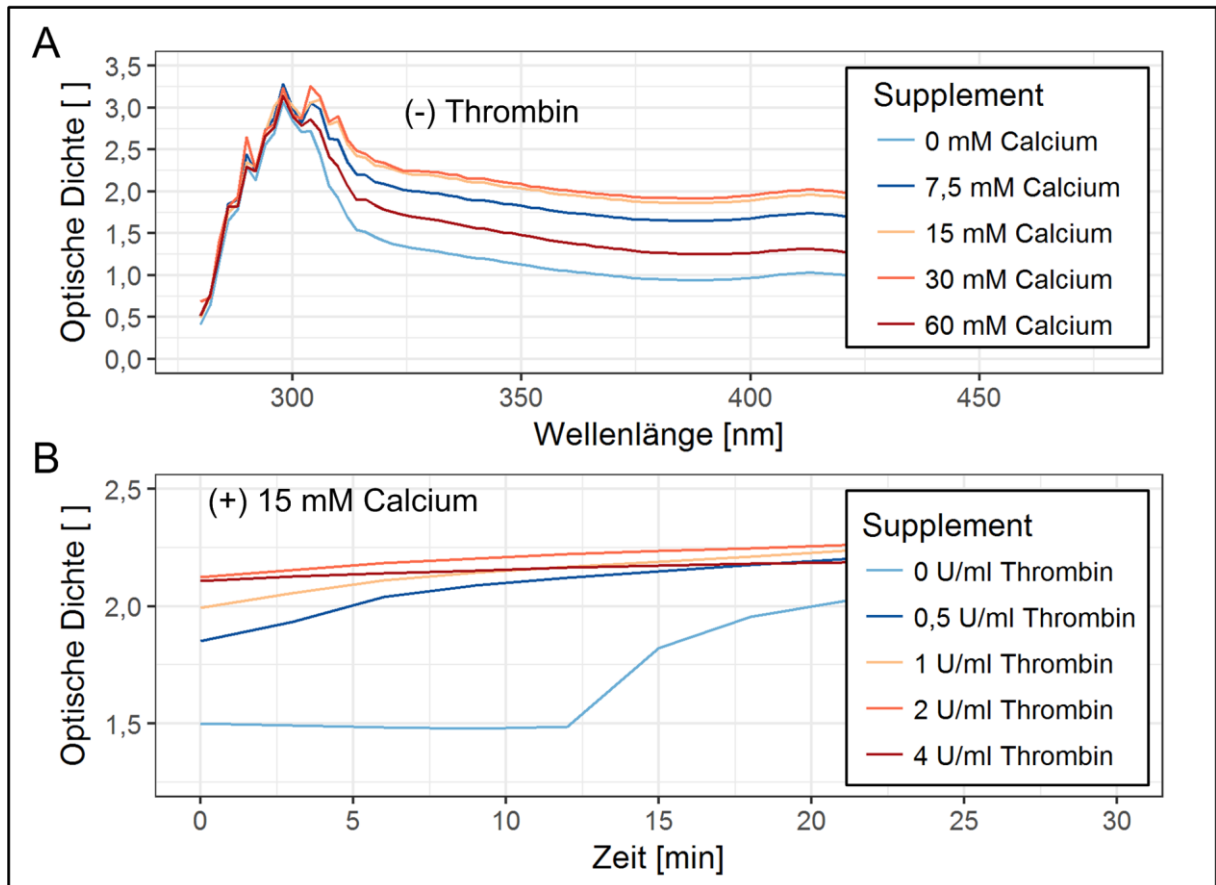


Abbildung 3-19 Koagulation von humanem Blutplasma.

(A) Citrat und Phosphat stabilisierten das eingesetzte gepoolte Blutplasma (n = 10 Spender). Die Zugabe von Calcium führte zur Koagulation. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C konnte über die Absorption von 280 nm bis 480 nm der Einfluss unterschiedlicher Calciumkonzentrationen auf die Koagulation bestimmt werden. (B) Die Absorptionsmessung bei 320 nm über einen Zeitraum von 30 Minuten verdeutlichte, dass zusätzliches Thrombin die Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin beschleunigt.

Studien mit primären dermalen Fibroblasten (n = 3) bestätigten die Stabilisierung von Fibrin durch t-AMCA im Kulturmedium (siehe Abbildung 3-20). Im Gegensatz hierzu führte die Kultur ohne Stabilisator zu einer hohen Varianz bis hin zur kompletten Fibrinolyse der Hydrogele. Die erzielte Standardisierung begründete den nachfolgenden Einsatz von t-AMCA im Kulturmedium.

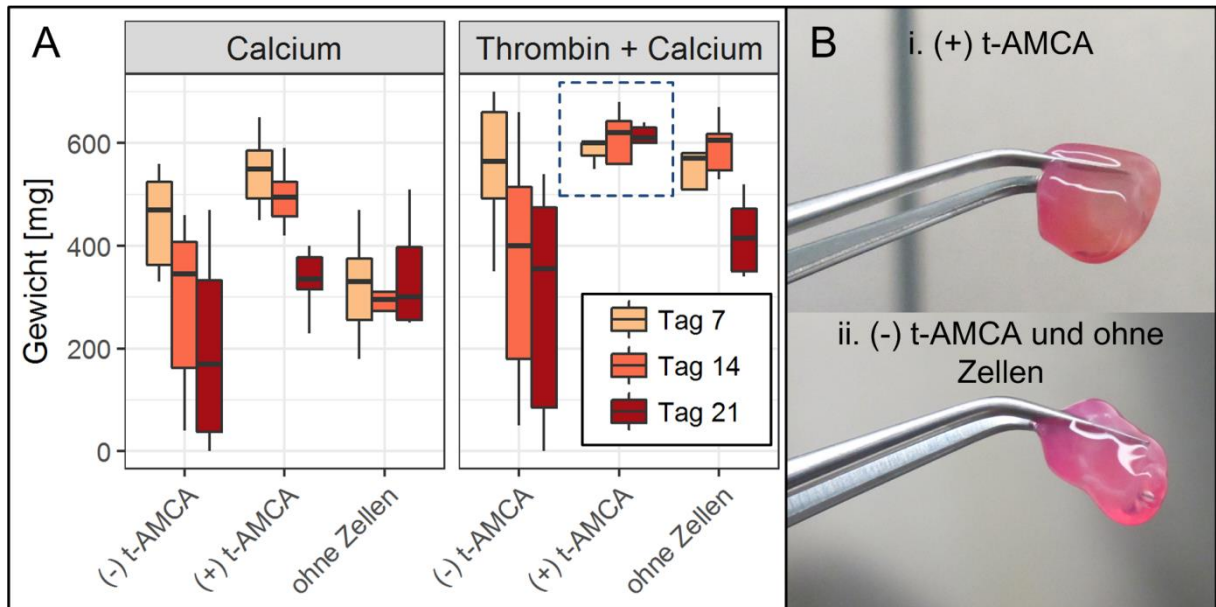


Abbildung 3-20 Aufbau von langzeitstabilen Fibrinhydrogelen.

(A) In einer Langzeitkultur mit humanen dermalen Fibroblasten (n = 3) konnte die Stabilität der Fibrinmatrix untersucht werden. Hierfür erfolgte die Herstellung von Fibrinhydrogelen unter Zusatz von (I) 15 mM Calcium oder (II) 15 mM Calcium und Thrombin (2 Einheiten pro ml). Die Kultivierung über einem Zeitraum von 7, 14 und 21 Tage zeigte, dass der Zusatz von t-AMCA zum Kulturmedium eine Langzeitstabilisierung der Fibrinmatrix ermöglichte. (B) Exemplarisch photographisch dargestellt ist ein Fibringewebe (Thrombin mit Calcium) an Tag 21 nach Kultivierung mit t-AMCA sowie zum Vergleich ein Fibringewebe (Thrombin mit Calcium) ohne Zellen nach Kultivierung ohne t-AMCA.

In einer dreidimensionalen Fibrinmatrix differenzierten die humanen Monozyten unter dem Zusatz von M-CSF zu Makrophagen.

Bereits etablierte dreidimensionale humanbasierte Fremdkörpermodelle setzen primäre Monozyten (184) oder die Monozytenzelllinie U937 (185) ein. Die meisten Differenzierungen von humanen Monozyten basieren auf einer sechstägigen Stimulation mit Wachstumsfaktoren unter zweidimensionalen Kulturbedingungen (148-150). Im weiterentwickelten Modellsystem fand die Integration von Monozyten in ein dreidimensionales Fibrinhydrogel und die anschließende Differenzierung durch exogene Stimulation mit M-CSF statt. Nach der 13-tägigen Kultivierungsphase ließen sich vitale Makrophagen auf der Materialoberfläche nachweisen (siehe Abbildung 3-21). Zum Beispiel exprimierten die Makrophagen auf Glasoberflächen den M2-phänotypischen Marker CD163 sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül CD54 (Abbildung 3-21 A). Auf den Materialoberflächen fand eine Anreicherung vitaler Makrophagen statt, die sich über ATP-Quantifizierung auf allen Referenzoberflächen bestätigen ließ.

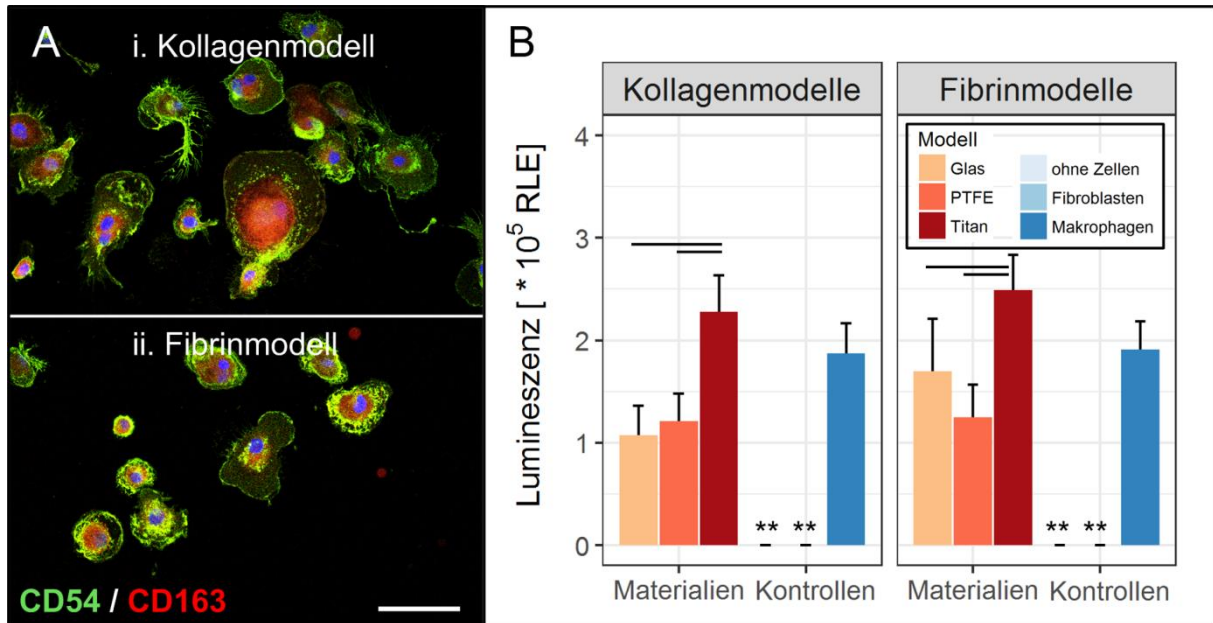


Abbildung 3-21 Vitalität der Makrophagen in direktem Kontakt mit dem Biomaterial.

(A) Im Anschluss an die 13-tägige Kultivierung konnten vitale Makrophagen auf der Materialoberfläche bestimmt werden. Die histologische Färbung des interzellulären Adhäsionsmoleküls (CD54; grün) sowie des M2-phänotypischen Markers CD163 (rot) bestätigte die Anwesenheit von Makrophagen (exemplarisch auf Glasoberflächen gezeigt). Der Maßstab Balken bildet 50 μm ab und gilt für beide Aufnahmen. (B) Der CellTiter-Glo-Nachweis zeigte für alle Referenzmaterialien sowie Versuchsgruppen die Vitalität der Makrophagen. Für die Bestimmung ließen sich je Spender ($n = 5$) zwei Modelle ($n = 2$) analysieren. Das festgelegte Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert von $\leq 0,05$. Hierbei kennzeichnet ein doppeltes Sternchen (**) eine Versuchsgruppe, die sich zu allen anderen Versuchsgruppen signifikant unterschied.

Hierbei lag der Messbereich von $10 \cdot 10^4$ bis $25 \cdot 10^4$ relative Lichteinheiten in einem vergleichbaren Messbereich wie nach 48-stündiger Kultivierung von Makrophagen auf den jeweiligen Referenzmaterialien (siehe Abbildung 3-12 in Kapitel 3.4). Im Vergleich zu Glas- und PTFE-Oberflächen wies die Vitalität der Makrophagen auf Titanoberflächen eine signifikante Erhöhung auf (kollagenbasiertes Modell: $23 \pm 4 \cdot 10^4$ relative Lichteinheiten; fibrinbasiertes Modell: $25 \pm 3 \cdot 10^4$ relative Lichteinheiten). Zusätzlich verdeutlichte die mikroskopische Untersuchung des auf materialaufgelagerten Fibringewebes die Anreicherung von Makrophagen an den Grenzflächen des Hydrogels (Abbildung 3-22 A und B). Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Blick auf das Fibringewebe. Hierbei saßen Makrophagen direkt auf dem lockeren Fibrinnetz. Die dargestellte Azanfärbung bildet einen Querschnitt durch das Fibringewebe (rot) ab und bestärkte die Annahme, dass eine Akkumulation der Makrophagen an den Grenzflächen stattfand. Während dem histologischen Aufarbeitungsprozess ging jedoch die Orientierung im Gewebe verloren. Es ist dennoch möglich, dass sich die Makrophagen an der Grenzfläche zum Biomaterial anreicherten.

Zusammenfassend konnte im entwickelten Modellsystem die Vitalität der Makrophagen nach der 13-tägigen Kultivierungsphase gezeigt werden. Hierbei zeigte sich auf Titanoberflächen im Vergleich zu den anderen Materialien eine signifikant erhöhte Zellvitalität.

Der Kontakt zu einem Fremdkörper aktivierte Gerinnungsfaktoren, die auf den Referenzmaterialien eine materialabhängige Fibrinsynthese einleiteten.

Im Vergleich zu den Materialien Glas und Titan führte die Koagulation des Plasmas auf PTFE-Oberflächen zu einer signifikant erhöhten Fibrinsynthese (Abbildung 3-22 C). Hier bildeten sich im kollagenbasierten Modell 392 ± 55 mg und im fibrinbasierten Modell 336 ± 49 mg auf der Oberfläche aus. Im Gegensatz dazu befand sich auf den Glasoberflächen im Vergleich zu allen anderen Testoberflächen signifikant weniger Fibrin. Das Nassgewicht des Fibringewebes auf den Glasoberflächen betrug im kollagenbasierten Modell 134 ± 16 mg und im fibrinbasierten Modell 127 ± 16 mg. Die nahezu äquivalente Fibrinmenge bei den Modellen aus Kollagen oder Fibrin demonstrierte die Unabhängigkeit der Fibrinsynthese von der apikalen fibrösen Modellkomponente. Zusätzlich bestärkten diese Ergebnisse die hohe Standardisierung des Modellsystems. Ergänzend verdeutlichten die Monokulturmodelle, dass die materialabhängige Fibrinsynthese unter dem Einfluss von Matrixkomponenten und den eingebrachten Zellen stand. Auf Glasoberflächen entsprach das Nassgewicht in den Kokulturmodellen circa einem Drittel des Fibrins in den Monokulturmodellen mit Makrophagen: im kollagenbasierten Monokulturmodell bildeten sich 376 ± 48 mg und in den fibrinbasierten Monokulturmodellen 368 ± 51 mg. Mit circa einem Viertel des Gewichts der Modelle mit ausschließlich Fibroblasten fiel die Fibrinsynthese in den Kokulturmodellen vergleichbar niedrig aus. In der Monokultur mit Fibroblasten betrug das Nassgewicht des aufgelagerten Fibringewebes in den Kollagenmodellen 552 ± 55 mg und in den Fibrinmodellen 543 ± 89 mg. Dies zeigt, dass die Wechselwirkung zwischen der Fibrinmatrix, den Makrophagen und den Fibroblasten zu einer geringeren Fibrinablagerung in den Kokulturmodellen führte. Wesentlich ist, dass die Fibrinsynthese auf den Materialoberflächen eine sehr hohe Unterscheidungskapazität aufwies - das Nassgewicht stieg jeweils signifikant von Glas über Titan zu PTFE an.

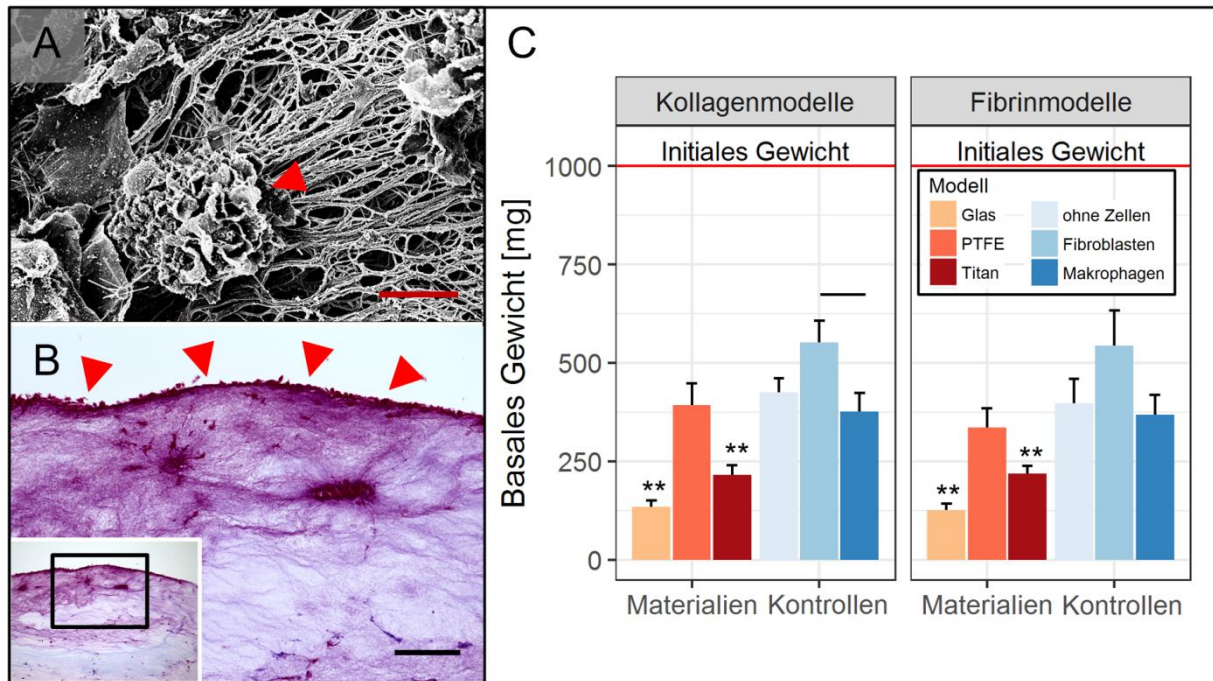


Abbildung 3-22 In direktem Kontakt zur Materialoberfläche bildete sich Fibringewebe mit vitalen Makrophagen.

(A) Dargestellt ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme sowie (B) eine lichtmikroskopische Aufnahme einer Azanfärbung des aufgelagerten Fibringewebes nach Kultivierung für 13 Tage. Die roten Pfeile kennzeichnen Makrophagen. Der Maßstab Balken stellt in (A) 5 μm und in (B) 100 μm dar. (C) Die Fibrinsynthese war abhängig von mehreren Einflussgrößen wie den Materialeigenschaften und der Wechselwirkung zwischen Zellen und Matrix. In die quantitative Bestimmung fließen je Spender ($n = 5$) zwei Modelle ($n = 2$) ein. Das festgelegte Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert von $\leq 0,05$; hierbei kennzeichnet ein doppeltes Sternchen (**) eine Versuchsgruppe, die sich zu allen anderen Versuchsgruppen signifikant unterschied.

In einer Kollagenmatrix bildeten sich dichte Bindegewebsstrukturen aus, wohingegen die Fibroblasten in einer Fibrinmatrix in lockeren Netzstrukturen vorlagen (Abbildung 3-23 A).

Wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben, ging die beobachtete Verdichtung des Kollagen-gewebes mit einer materialabhängigen Gewichtsabnahme einher (Abbildung 3-23 C). Im Vergleich zum Ausgangsgewicht von 500 mg nahm beispielsweise das Nassgewicht des apikalen Bindegewebes von Titan (326 ± 54 mg) mit der geringsten Gewichtsabnahme über PTFE (248 ± 57 mg) zu Glas (111 ± 40 mg) ab. Im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen führte die Kultivierung auf Glasoberflächen zu einer signifikanten Abnahme des apikalen Kollagenhydrogels. Jedoch war die Gewichtsabnahme zwischen den Materialien PTFE und Titan nicht signifikant (p-Wert = 0,23). Im Gegensatz dazu nahmen die fibrinbasierten apikalen Bindegewebeinheiten unabhängig von den Materialoberflächen um mehr als 50 % des Ausgangsgewichts ab.

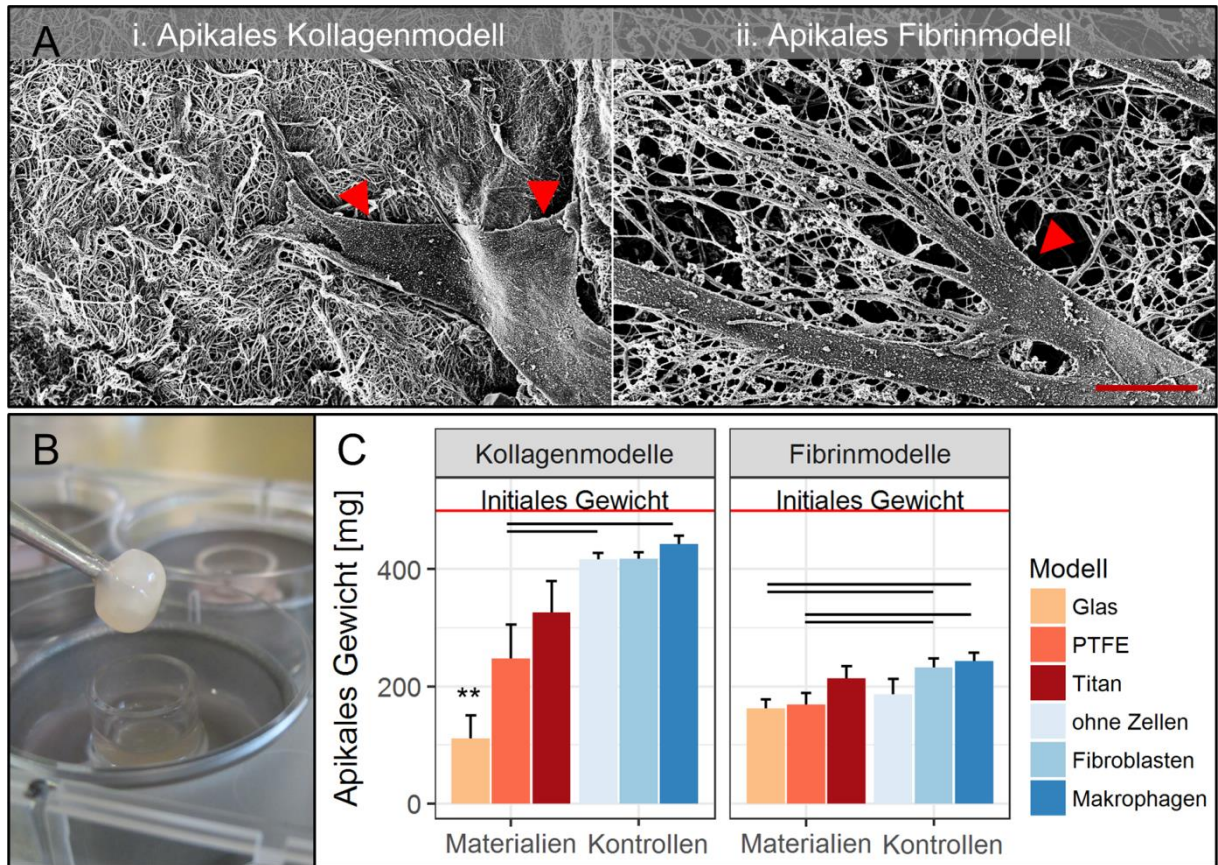


Abbildung 3-23 Apikales Bindegewebsmodell bestehend aus HFF-1-Fibroblasten in einem Kollagenhydrogel sowie in einem Fibrinhydrogel.

(A) In der Rasterelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass nach 13 Tagen Kultivierung die Mikrostruktur des kollagenbasierten Bindegewebsmodells deutlich dichter als die des fibrinbasierten Modells war. Die roten Pfeile markieren die Grenzfläche zwischen einem Fibroblasten und der extrazellulären Matrix. Der Maßstabalken bildet 5 μm ab und ist für beide Aufnahmen gültig. (B) Das apikale Bindegewebsmodell konnte aus dem Zellkulturträgersystem entnommen und das Gewicht erfasst werden. (C) Die Bestimmung des Nassgewichts verdeutlichte material- und modellabhängige Unterschiede. Je Spender ($n = 5$) konnten zwei Modelle ($n = 2$) einbezogen werden. Das Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert von $\leq 0,05$. Ein doppeltes Sternchen (**) kennzeichnet eine Versuchsgruppe, die sich von allen anderen Versuchsgruppen signifikant unterschied.

Dies verdeutlicht, dass die Fibrinbildung im apikalen Trägersystem im Vergleich zum basalen Fibringewebe unabhängig von den Materialeffekten war.

Im Vergleich zu den kollagenbasierten Modellen charakterisierte die fibrinbasierten Modelle ein höheres proentzündliche Milieu aus den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Abbildung 3-24).

Dementsprechend waren in den Fibrinmodellen im Vergleich zu den Kollagenmodellen die Spiegel des Zytokins IL-1 β um circa das Zweifache sowie des Zytokins IL-6 um circa das Dreifache und des Zytokins IL-8 um das Anderthalbfache erhöht. Interessanterweise verdeutlichten die Monokulturmodelle den Beitrag von Fibroblasten zu der Erhöhung des

3. Ergebnisse

IL-6-Spiegels und des IL-8-Spiegels. Hierbei setzten Fibroblasten in einer Kollagenmatrix 789 ± 171 pg pro ml des Zytokins IL-6 und 1574 ± 567 pg pro ml des Zytokins IL-8 frei. Im Vergleich zu den kollagenbasierten Modellen betrug die Freisetzung durch Fibroblasten in einer Fibrinmatrix für das Zytokin IL-6 mit $16 \pm 2 * 10^4$ pg pro ml das Zweihundertfache und für das Zytokin IL-8 mit $18 \pm 3 * 10^4$ pg pro ml das Hundertfache. In der Freisetzung von IL-1 β wiesen die Monokulturmodelle mit Fibroblasten dagegen keine Unterschiede zwischen den Modellen auf. Möglicherweise ergab sich aus der Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Fibroblasten mit der Fibrinmatrix die Erhöhung des Entzündungsprofils. Zusammenfassend bestärkten die Ergebnisse den biomimetischen Modellansatz, die Mikroumgebung in einer Wunde abzubilden, und zeigten, dass die Zellantwort von der extrazellulären Mikroumgebung abhing.

In Antwort auf die Referenzmaterialien Glas, Titan und PTFE zeigten die Zytokine IL-1 β und IL-8 sowohl in den Kollagenmodellen als auch in den Fibrinmodellen ein analoges Freisetzungsprofil auf.

Nach Kultivierung auf den Referenzoberflächen stieg der Zytokinspiegel von PTFE mit der geringsten Freisetzung der Zytokine IL-1 β und IL-8 über Glas mit einer moderaten Zytokinfreisetzung zu Titan an. Beispielsweise wies die Freisetzung von IL-1 β in den fibrinbasierten Kokulturmodellen signifikante Unterschiede auf: der IL-1 β -Spiegel verdoppelte sich hier jeweils von PTFE mit 13 ± 5 pg pro ml über Glas (26 ± 5 pg pro ml) zu Titan (47 ± 9 pg pro ml). Ähnlich stimmte in den Kollagenmodellen das Freisetzungsprofil von IL-6 mit dem für IL-1 β und IL-8 beschriebenen Profil überein. Hier nahm der IL-6-Spiegel von $3 \pm 0,7 * 10^4$ pg pro ml nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen über Glas ($5 \pm 0,6 * 10^4$ pg pro ml) und Titan ($6 \pm 0,8 * 10^4$ pg pro ml) zu. Interessanterweise war die materialinduzierte Zytokinsekretion in den fibrinbasierten Modellen zwar stärker, ähnelte jedoch den materialinduzierten relativen Effekten in den kollagenbasierten Modellen. Das übereinstimmende Sekretionsprofil zwischen den Kollagenmodellen und den Fibrinmodellen verdeutlichte die Stabilität der materialinduzierten Effekte sowie die Validität und die Aussagekraft beider Modellsysteme.

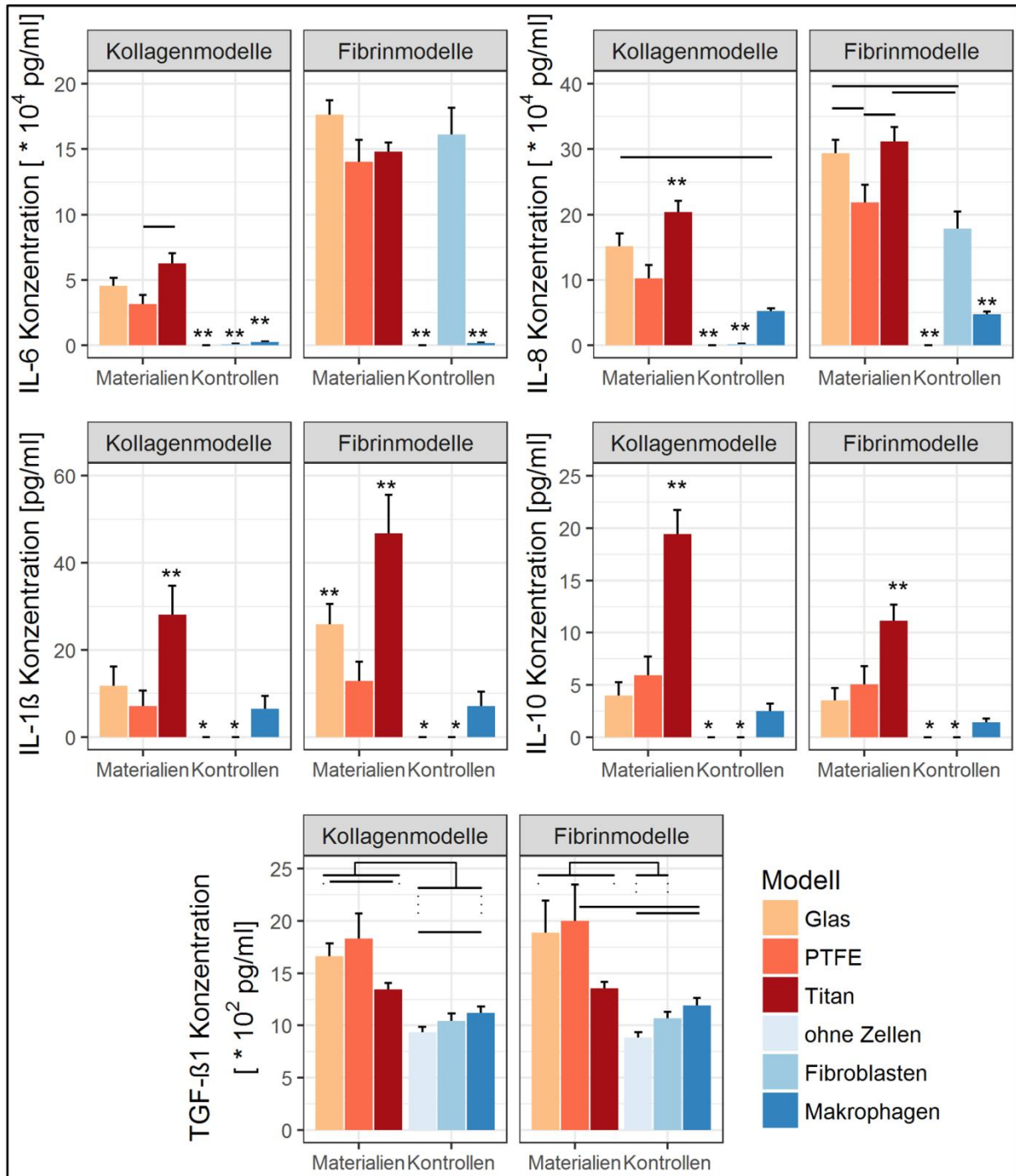


Abbildung 3-24 Die Zytokinausschüttung im Fremdkörpermodellssystem hing vom Material und dem Modell ab.

Die Zytokinbestimmung von IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10 und TGF- β 1 fand an Tag 13 im Zellkulturüberstand statt. Es erfolgte die Analyse von allen drei Modellen (n = 3) je fünf Spender (n = 5). In den Balkendiagrammen sind die Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau ist auf einen p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Die Kennzeichnung mit einem doppelten Sternchen (**) beschreibt eine zu allen anderen Versuchsgruppen signifikante Versuchsgruppe. Bei einer Kennzeichnung mit einem Sternchen (*) bestanden zwar keine signifikanten Unterschiede zum jeweiligen Monokulturmodell mit einem Sternchen, jedoch zu allen weiteren Versuchsgruppen.

Im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen führte die Kultivierung von Makrophagen auf Titanoberflächen eine signifikante Erhöhung des antientzündlichen Zytokins IL-10 im Kulturmedium herbei.

Zum Beispiel stieg im kollagenbasierten Fremdkörpermodell der IL-10-Spiegel um circa das Dreifache von 6 ± 2 pg pro ml nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen zu 19 ± 2 pg pro ml nach Kultivierung auf Titanoberflächen signifikant an. In Analogie war im Kulturmedium der fibrinbasierten Modelle ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration auf das Doppelte von PTFE mit 5 ± 7 pg pro ml zu Titan mit 11 ± 6 pg pro ml zu beobachten. Dies verdeutlicht, dass Titanoberflächen einerseits die Freisetzung von proentzündlichen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und IL-8 stimulierten, jedoch ebenfalls eine antientzündliche Immunantwort auslösten.

In den Kokulturmodellen überstieg die TGF- β 1-Freisetzung den Schwellenwert im Kulturmedium und lag höher als in den Monokulturmodellen mit Makrophagen oder mit Fibroblasten.

Rückblickend konnte in den vorangegangenen 48-stündigen Kurzzeitkultivierungsversuchen mit Makrophagen keine aktive Freisetzung von TGF- β 1 beobachtet werden. Jedoch führte die Kultivierung von Makrophagen über einen Zeitraum von 13 Tagen zu einer signifikanten Erhöhung des TGF- β 1-Spiegels in den Kollagenmodellen. Im Vergleich zum Basalspiegel von 934 ± 54 pg pro ml in den Kollagenmodellen ohne Zellen stieg die Konzentration im Monokulturmodell mit Makrophagen auf 1120 ± 60 pg pro ml signifikant an. Vergleichbare Effekte waren in den Fibrinmodellen zu beobachten: hier betrug die Basalkonzentration 884 ± 49 pg pro ml und die Konzentration in den Monokulturmodellen mit Makrophagen 1191 ± 70 pg pro ml. Zusätzlich beeinflussten die Fibroblasten in den jeweiligen Monokulturmodellen ebenfalls den TGF- β 1-Spiegel, jedoch waren die entsprechenden Messwerte im Vergleich zum Basalspiegel nicht signifikant erhöht. Im Wesentlichen zeigten die TGF- β 1-Spiegel in den Kokulturmodellen im Vergleich zum Basalspiegel eine signifikante Ausschüttung auf. Beispielsweise führte die Kultivierung auf PTFE-Oberflächen zu einer signifikanten Steigerung des TGF- β 1-Spiegels auf 2002 ± 348 pg pro ml in den Fibrinmodellen und 1833 ± 241 pg pro ml in den Kollagenmodellen. Im Vergleich zum Basalspiegel induzierten PTFE-Oberflächen mit einer etwa doppelt so hohen Konzentration die größte Änderung des TGF- β 1-Spiegels. Nichts desto trotz wiesen die TGF- β 1-Spiegel ausschließlich in den Kollagenmodellen signifikante Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien

Glas (1664 ± 122 pg pro ml) und Titan (1344 ± 65 pg pro ml) auf. Wie bereits beschrieben lag die TGF- β 1-Konzentration mit 1833 ± 241 pg pro ml nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen zwar höher als auf den beiden anderen Referenzmaterialien, schwankte jedoch zwischen den einzelnen Replikationszyklen und unterschied sich daher nicht signifikant. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Kokultur in allen Modellen eine signifikante Freisetzung von TGF- β 1 über den Basalspiegel hinaus induzierte. Des Weiteren leiteten PTFE-Oberflächen im Vergleich zu Titanoberflächen eine höhere TGF- β 1-Freisetzung ein. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und wiesen nur auf Tendenzen hin.

Das multifaktorielle Freisetzungsprofil löslicher Mediatoren konnte von Fibroblasten im apikalen Bindegewebsmodell erfasst und in eine (I) Akkumulation von extrazellulärer Matrix sowie (II) die Proliferation von Zellen übersetzt werden.

Hierbei stellen sowohl die Synthese von Matrix als auch die Anreicherung von Zellen zwei zentrale Mechanismen der fremdkörperassoziierten Fibrose dar. Die Neusynthese von (I) Kollagen I und (II) der β -Aktinanteil eigneten sich als Messparameter für diese Effekte (siehe Abbildung 3-25). Die Triplehelix des Kollagen Typ I besteht aus zwei Kollagen- α 1(I)-Ketten sowie einer Kollagen- α 1(II)-Kette. Der verwendete Antikörper eignete sich für den Nachweis von Prokollagen α 1(I) sowie die intermediären Spaltungsprodukte ohne C-Propeptid oder ohne N-Propeptid und das finale Endprodukt, das Kollagen- α 1(I)-Peptid (140 kDa, Abbildung 3-25). Die Kollagenhydrogele ohne Zellen verdeutlichten, dass das Rattenschwanzkollagen nicht mit dem gegen humanes Kollagen-I gerichteten Antikörper reagierte (Abbildung 3-25 A). Jedoch konnten nur 20 μ g Protein pro Spur aufgetragen werden, da ansonsten eine starke Zunahme des Hintergrundsignals zu beobachten war. Die relative Expressionsdichte der Banden ließ sich über die Normierung auf eine Referenzkontrolle aus einer HFF-1-Zellsuspension berechnen.

In Antwort auf die Referenzmaterialien PTFE und Titan entsprach die Kollagen-I-Neusynthese den Erwartungen. In den kollagenbasierten Fremdkörpermodellen lag die relative Dichte für Titan bei 59 ± 19 % und für PTFE bei 76 ± 19 %. Obwohl insgesamt das Zweieinhalbfache an Protein pro Spur aufgetragen wurde, fiel die Kollagenneusynthese in den Fibrinmodellen insgesamt geringer aus. Es ergaben sich dennoch Unterschiede von 8 ± 3 % bei Kultivierung auf Titanoberflächen und 14 ± 5 % bei Kultivierung auf PTFE-Oberflächen.

3. Ergebnisse

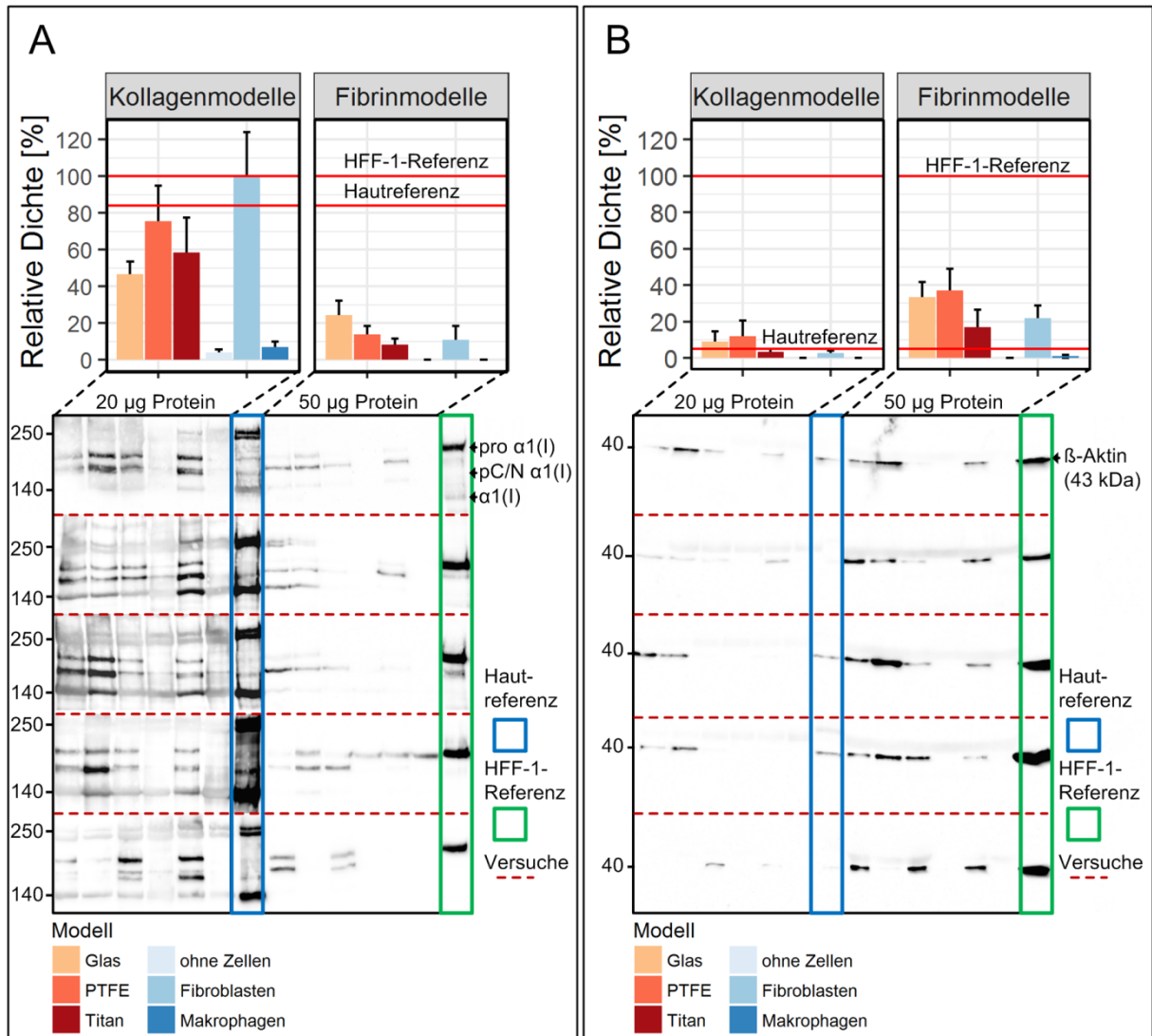


Abbildung 3-25 Semiquantitative Bestimmung des Kollagen-I- und β-Aktinanteils in den Fremdkörpermodellen.

(A) Kollagen-I- und (B) β-Aktin-Westernblots ermöglichten die Charakterisierung der Neusynthese von extrazellulärer Matrix sowie des zellulären Anteils im Modell. Je Modell konnten 20 µg Protein pro Kollagenmodell und 50 µg Protein pro Fibrinmodell aufgetragen werden. Die Fläche unter dem jeweiligen Histogramm ermöglichte eine Bewertung der Expressionsbande. Der Bandenvergleich mit HFF-1-Lysat ließ eine relative Bewertung der Expressionsdichte zu. Je primären Makrophagenspender folgte die Charakterisierung von einem Modell (n = 5). Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte und Standardfehler der ermittelten relativen Expressionsdichte dar.

Zusätzlich lieferte das Strukturprotein β-Aktin (43 kDa), das in allen eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert wird, ein semiquantitatives Maß für den Fibroblastenanteil im Modellsystem (Abbildung 3-25 B). Die Kultivierung auf PTFE-Oberflächen führte im Vergleich zur Kultivierung auf Titanoberflächen zu einem höheren Fibroblastenanteil im apikalen Bindegewebe. Im Detail stieg im Fibrinmodell der relative Zellanteil von $17 \pm 9 \%$ nach Kultivierung auf Titanoberflächen auf $37 \pm 12 \%$ nach Kultivierung auf PTFE-

Oberflächen. Wie zu erwarten war, fiel in den Kollagenmodellen beim Aufbringen von 20 µg Protein je Modell der zelluläre Anteil insgesamt niedriger aus. Dennoch stieg in den Kollagenmodellen der zelluläre Anteil von 3 ± 2 % in Antwort auf Titanoberflächen zu 12 ± 9 % in Antwort auf PTFE-Oberflächen an. Zusammenfassend lagen nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen im Vergleich zur Kultivierung auf Titanoberflächen eine höhere Kollagen-I-Neusynthese sowie ein höherer zellulärer Anteil in beiden Fremdkörpermodellsystemen vor. Ein Vergleich der erzielten Ergebnisse mit der literaturbasierten Bewertung der beiden Referenzmaterialien PTFE und Titan bestärkte die Aussagekraft der entwickelten Modellsysteme. Die beobachteten Tendenzen zwischen den Materialien zeigten einerseits die Machbarkeit eines prädiktiven Fremdkörpermodells, verdeutlichten jedoch auch den Optimierungsbedarf, um die Unterscheidungskapazität weiterhin zu erhöhen.

Histologische Analysen bestätigten die Akkumulation von extrazellulärer Matrix und die Proliferation von Fibroblasten in den Fremdkörpermodellen.

Exemplarisch für einen Modellansatz lieferten die histologischen Färbungen einen Einblick in die Struktur und die Zusammensetzung der Gewebemodelle. Im Vergleich zum Westernblot bilden histologische Nachweisverfahren einen Gewebeschnitt von einer definierten Dicke (5 µm) ab, wohingegen Gewebelysate näherungsweise den Mittelwert des gesamten Gewebemodells darstellen. Jedoch bestärken die histologischen Färbungen die Aussagekraft des Westernblots. Während der Wundheilung stabilisiert Kollagen III durch eine verstärkte Quervernetzung den Gewebsdefekt (129) und kann auf bis zu 40 % des gesamten Prokollagens in einer Wunde ansteigen (128). Im dargestellten Fremdkörpermodell (siehe hierfür Abbildung 3-26) zeigt die immunhistologische Färbung, dass die Kollagen-III-Bildung in den Kollagenmodellen relativ gering ausfiel und keine Materialabhängigkeit aufwies. Im Gegensatz dazu färbte der antikörpervermittelte Nachweis die Fibrinmatrix unspezifisch, dennoch induzierten die Fibroblasten im Modellsystem eine Zunahme der Braunfärbung. Hier zeigten die Gewebemodelle nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen eine starke Kollagen-III-Bildung. Im Verlauf der Wundheilung wird das dünne Kollagen-III-Netz durch dickere, organisierte Kollagen-I-Bündel ersetzt und gewinnt hierdurch erneut an Zugkraft (124, 133). Wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben, eignete sich die Azanfärbung zur Färbung von Kollagenstrukturen (blau), zusätzlich ließen sich Fibrinstrukturen rot anfärben (siehe Abbildung 3-27).

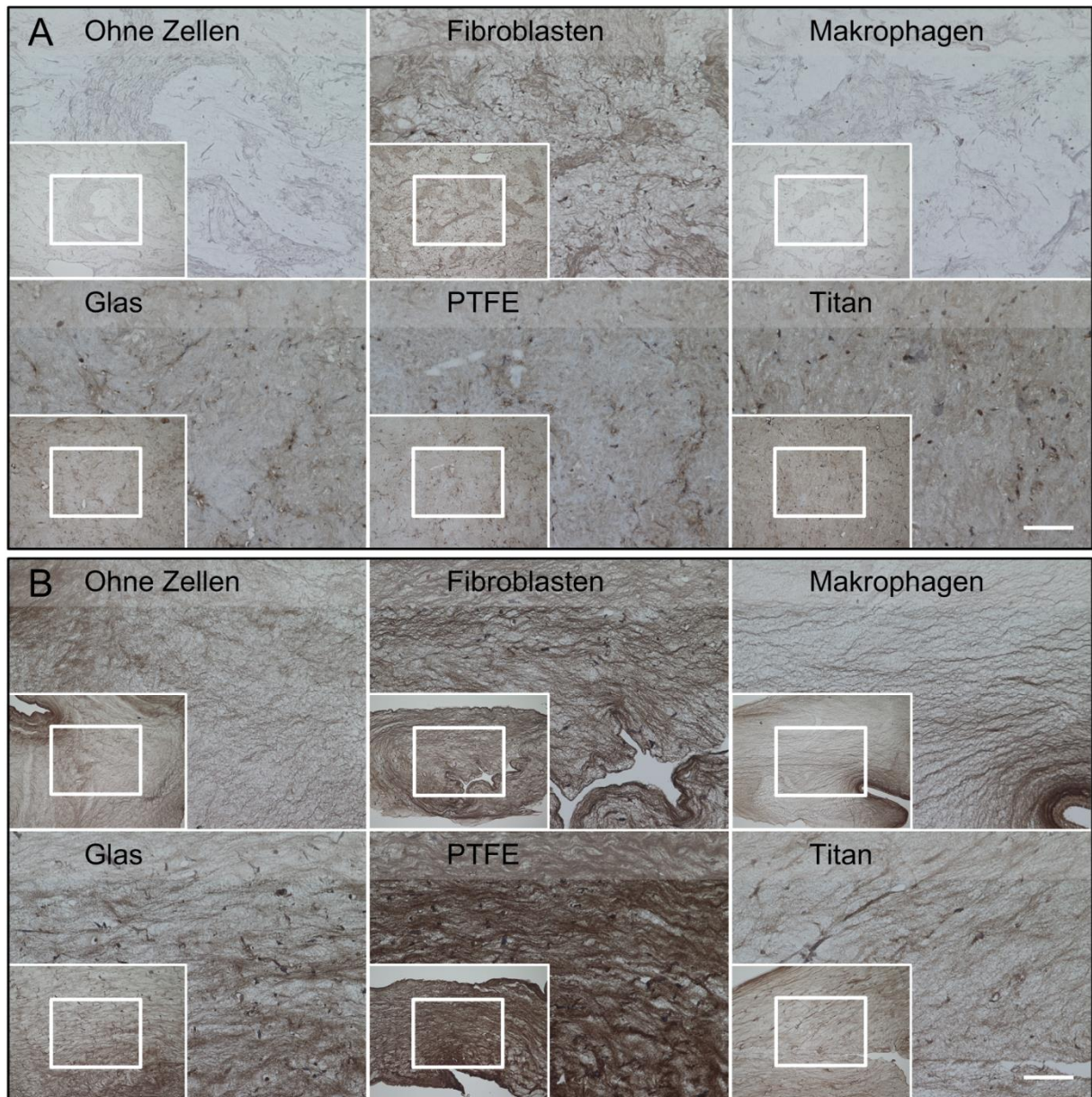


Abbildung 3-26 Fibroblasten im apikalen Bindegewebsmodell bildeten Kollagen III.

(A) In den kollagenbasierten Bindegewebsmodellen fand an Tag 13 der Kultivierung eine geringfügige Bildung von Kollagen III statt. (B) In den fibrinbasierten Bindegewebsmodellen führte jedoch die Kultivierung auf PTFE-Oberflächen zu einer hohen Kollagen-III-Bildung. In der Abbildung dargestellt ist die antikörpervermittelte, enzymkatalysierte DAB-Färbung. Kollagen III wird in dieser Färbung braun angefärbt. Der Maßstab bildet 100 µm ab und ist für alle Abbildungen gültig.

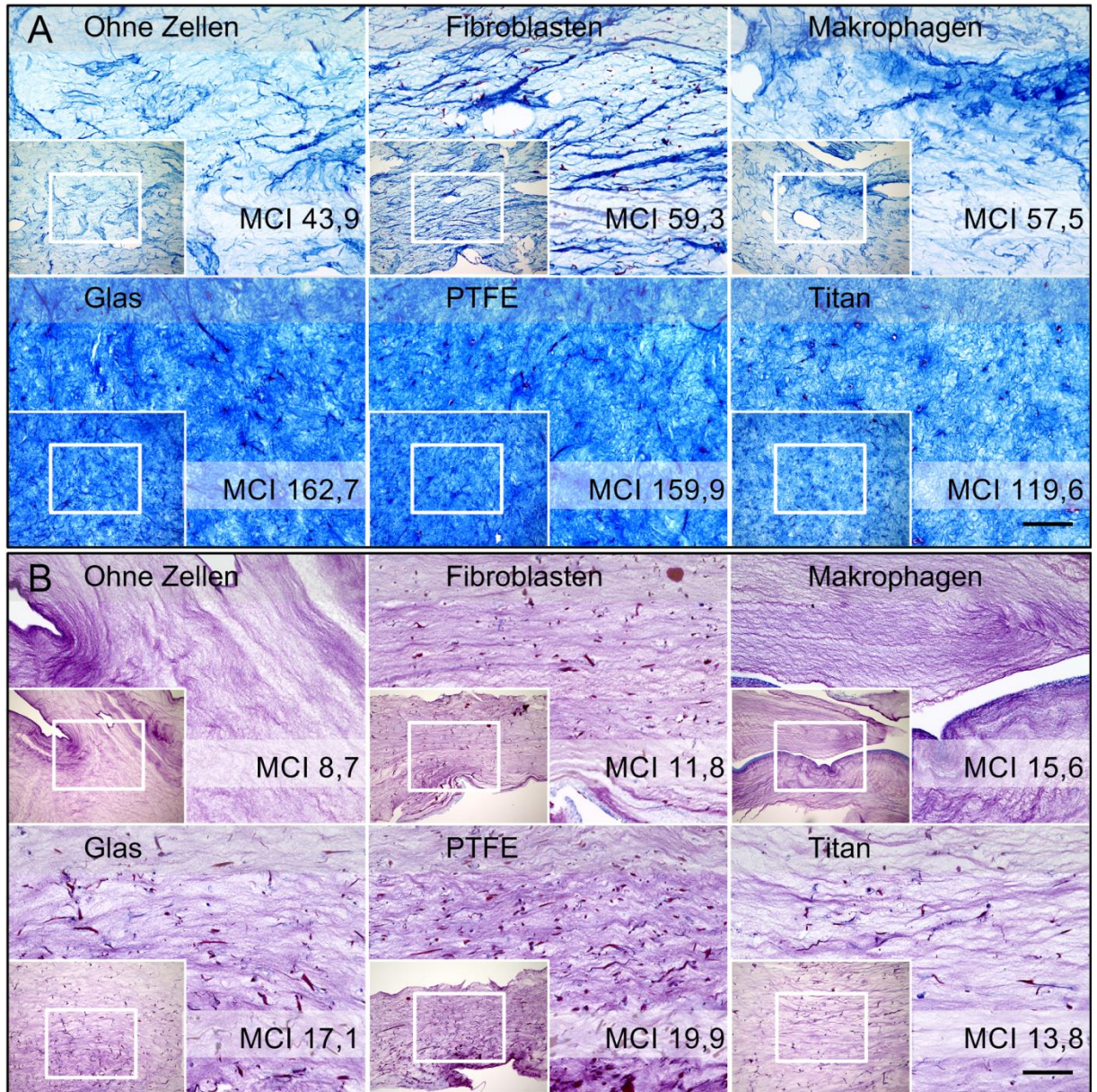


Abbildung 3-27 Azanfärbung des apikalen Bindegewebes.

(A) Im Vergleich zu den Monokulturmodellen führte im kollagenbasierten Bindegewebsmodell die Kokultivierung von Makrophagen und Fibroblasten zu einer Verdichtung der Kollagenstrukturen (blau). (B) In der Azanfärbung erschienen Fibrinfasern rot. Die fibrinbasierten Bindegewebsmodelle verdeutlichten Unterschiede im zellulären Anteil. Exemplarisch sind die Ergebnisse für einen Versuchsansatz dargestellt. Der gezeigte Maßstab bildet 100 µm ab und ist gültig für alle Bilder. Die mittlere Cyanintensität (MCI) konnte wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben für die Modelle ermittelt werden und ist rechts unten in jedem Bild dargestellt.

Hierdurch konnte in den Fremdkörpermodellssystemen die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix sowie die Bildung von Kollagen dargestellt werden. Beispielsweise bildeten Kollagenhydrogele ohne Zellen sowie ohne den Einfluss von Makrophagen lockere Bindegewebsstrukturen ab (exemplarisch für einen Versuchsansatz in Abbildung 3-27 A gezeigt). Im Gegensatz dazu bewirkten Makrophagen über Fibroblasten eine Verdichtung der extrazellulären Kollagenmatrix. Zusätzlich ließ sich der zelluläre Anteil im Gewebe bestimmen. Beispielsweise lag bei Kultivierung auf PTFE-Oberflächen ein hoher zellulärer Anteil im apikalen fibrinbasierten Fremdkörpermodell vor (Abbildung 3-27 B). Im Vergleich hierzu führte im Fibrinmodell die Kultivierung auf Titan- oder Glasoberflächen zu einer geringeren Proliferation der Fibroblasten.

Die Hauptkomponentenanalyse reduzierte die Dimensionen des multifaktoriellen Datensatzes und verdeutlichte, dass das entwickelte Fremdkörpermodellssystem eine hohe Unterscheidungskapazität zwischen den Referenzmaterialien PTFE und Titan aufwies.

Die in Kapitel 3.4 beschriebene, auf statistischen Vergleichen basierende Modellierung eignete sich einerseits zum Vergleich von Versuchsgruppen, setzte andererseits signifikante Unterschiede zwischen den Messpunkten voraus. Beim dreidimensionalen Fremdkörpermodell zeigten sich jedoch teilweise Effekte, die lediglich Tendenzen abzeichneten, die aber den Erwartungen entsprachen. Dies erschwerte die Interpretation des komplexen Datensatzes und erforderte die Anwendung alternativer Modellierungstechniken wie die Hauptkomponentenanalyse. Im Gegensatz dazu kennzeichnet die angewandte Hauptkomponentenanalyse die Reduzierung des mehrdimensionalen Datensatzes und ermöglicht so eine Gruppierung von Datenpunkten und Messparametern (141). Hierbei bildet die erste Hauptkomponentenachse eine lineare Kombination aus allen ursprünglichen Variablen ab und beschreibt eine Auftrennung des Datensatzes nach der größten Varianz. Dementsprechend liegt die zweite und jede darauf folgende Hauptkomponentenachse orthogonal zur ersten Hauptkomponentenachse und trennt den Datensatz nach allen weiteren nachfolgenden Varianzen auf (186). In der für die Kollagenmodelle durchgeführten Hauptkomponentenanalyse beschrieb die erste und zweite Hauptkomponentenachse 56 % der Varianz im Datensatz (siehe Abbildung 3-28 A). Hierbei verdeutlichte die erste Hauptkomponente mit einer Varianz von 30 % ein großes Rauschsignal im Modellsystem, das keine Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien auftrennte.

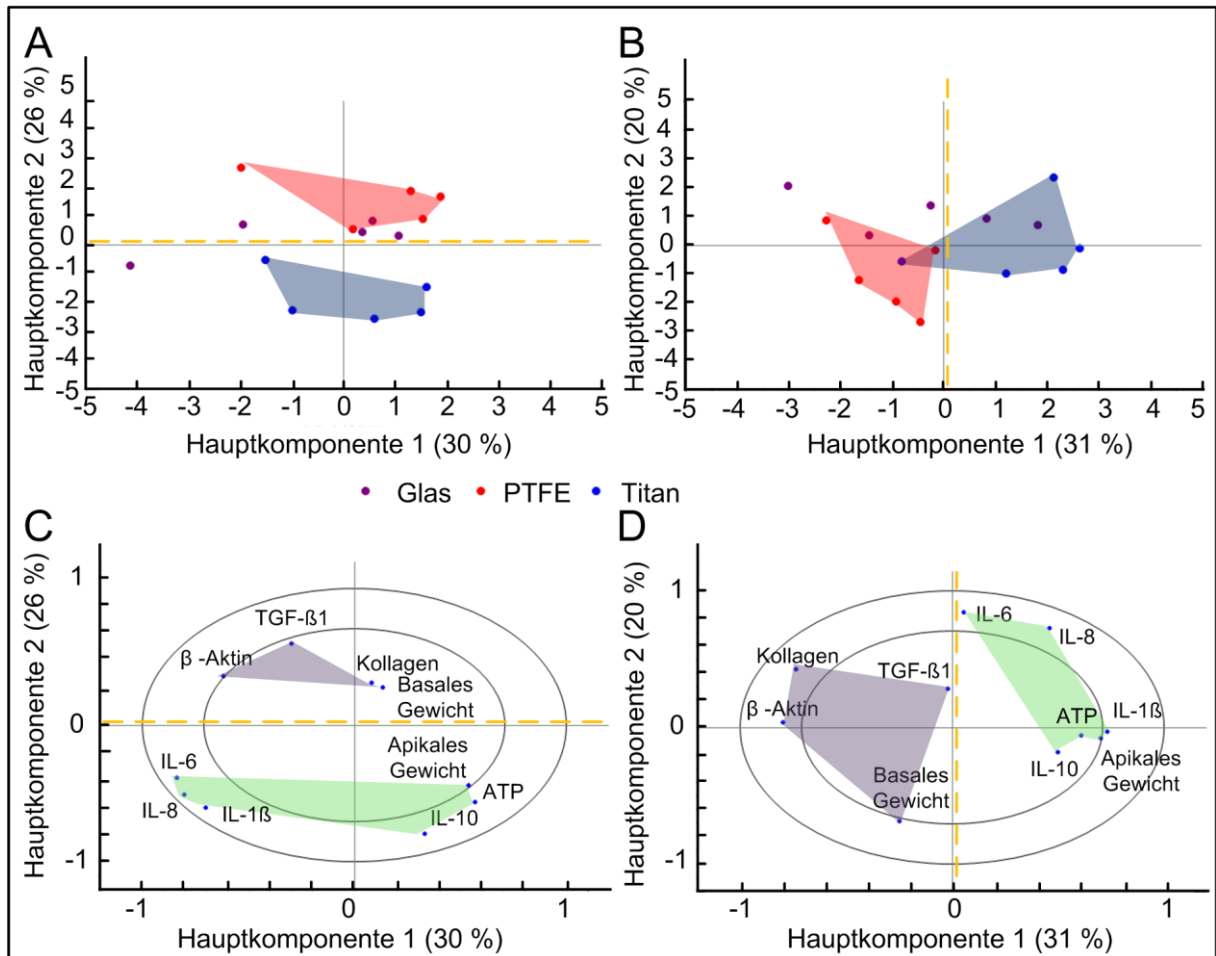


Abbildung 3-28 Hauptkomponentenanalyse der Fremdkörpermodelle für die Materialien Glas, PTFE und Titan.

Die Graphik umfasst alle quantitativen Daten, die eine Charakterisierung der Fremdkörpermodelle ermöglichen. Die Hauptkomponentenanalyse konnte mit jeweils einem charakterisierten Modell je Spender ($n = 5$) durchgeführt werden. Die Graphiken in (A) für die kollagenbasierten Modelle und in (B) für die fibrinbasierten Modelle zeigen für jede einzelne Beobachtung die entsprechende Projektion auf die Hauptkomponentenebene. (C und D) Die darunter dargestellte Beladung der einzelnen Messparameter in die Hauptkomponentenebene verdeutlichte den Beitrag der einzelnen Messparameter zu den beiden Hauptkomponenten.

Im Gegensatz dazu eignete sich die zweite Hauptkomponente mit einer Varianz von 26 % zur Unterscheidung der Referenzmaterialien PTFE und Titan. Während die Modelle nach Kultivierung auf PTFE-Oberflächen in den positiven Bereich der zweiten Hauptkomponentenachse projizierten, deckte die Modellprojektion bei Kultivierung auf Titanoberflächen den negativen Achsenabschnitt ab. Ähnlich ergab die Hauptkomponentenanalyse bei den Fibrinmodellen eine Varianz von 51 % für die erste und zweite Hauptkomponente (siehe Abbildung 3-28 B). Im Gegensatz dazu ermöglichte hier bereits die erste Hauptkomponente mit einer Varianz von 31 % eine Auftrennung der Referenzmaterialien PTFE und Titan. Dies verdeutlichte, dass die größte Varianz im fibrinbasierten Modellsystem durch die Material-

eigenschaften hervorgerufen wurde und eine hohe Standardisierung der Gewebemodelle vorlag. Invers zu den Kollagenmodellen projizierten die Fibrinmodelle nach Kultivierung auf dem Referenzmaterial PTFE in den negativen Achsenabschnitt der ersten Hauptkomponentenachse. Im Vergleich hierzu ließ sich den Fibrinmodellen bei Kultivierung auf Titanoberflächen positive Werte auf der ersten Hauptkomponentenachse zuordnen. Ergänzend verdeutlichte die Beladung der Hauptkomponentenebene mit den einzelnen Messparametern deren Beitrag zur Unterscheidungskapazität des Modellsystems (siehe Abbildung 3-28 C und D). Einflussfaktoren, die ein hohes fibrotisches Potential eines Materials kennzeichneten, wie die Fibrinsynthese basal auf der Materialoberfläche, die Neusynthese von Kollagen I und die Proliferation von Fibroblasten (β -Aktin) sowie die Freisetzung von TGF- β 1 in das Kulturmedium, sind in der Graphik als lila Fläche dargestellt. Alle diese fibrotischen Messparameter projizierten in den gleichen Achsenabschnitt der entsprechenden Hauptkomponentenachse wie die Modelle bei Kultivierung auf PTFE-Oberflächen. Rückblickend konnte sowohl in den Kollagenmodellen als auch in den Fibrinmodellen eine höhere Fibrinablagerung auf PTFE-Oberflächen als auf Titanoberflächen gezeigt werden. Die Kollagenneusynthese und die Proliferation der Fibroblasten sowie die Freisetzung von TGF- β 1 in das Kulturmedium waren bei Kultivierung auf PTFE-Oberflächen gegenüber Titanoberflächen erhöht. Zusammenfassend bestätigten die Beladung der Hauptkomponentenebene mit den fibrotischen Messparametern und die übereinstimmende Projektion der Modelle die fibrösen Eigenschaften des Biomaterials PTFE.

Im Gegensatz dazu sind Messparameter wie die Anreicherung von Makrophagen auf der Materialoberfläche (ATP), die Sekretion von Entzündungsfaktoren (IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) und eine geringe Gewichtsabnahme des Bindegewebes (apikal) in der Hauptkomponentenbeladung als grüne Fläche gezeigt. Die Ladung dieser Messparameter auf den entsprechenden Achsenabschnitt der Hauptkomponente stimmte mit der Modellprojektion bei Kultivierung auf Titanoberflächen überein und bestätigte die Bewertung der Titanmodelle durch diese Messparameter. Bei Kultivierung der Makrophagen auf den PTFE-Oberflächen fiel die materialassoziierte Zellvitalität im Vergleich zu der Kultivierung von Makrophagen auf Titanoberflächen geringer aus. Ebenso lag die Freisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 in das Kulturmedium als Antwort auf PTFE-Oberflächen niedriger als die Konzentration im konditionierten Kulturmedium nach Kultivierung auf Titanoberflächen. Interessanterweise konnte im entwickelten Modellsystem hierdurch erstmals eine Beziehung

zwischen den Eigenschaften von Titan mit einer chronischen Entzündung, einer höheren IL-10-Ausschüttung und einer höheren Zellvitalität auf der Materialoberfläche hergestellt werden. Im Hinblick auf die Freisetzung löslicher Mediatoren und die Übersetzung des Signals in eine Bindegewebsantwort blieb ungeklärt, wie das multifaktorielle Zusammenspiel verschiedener Faktoren und die Überlagerung von Wirkungsspektren das Bindegewebsgleichgewicht im Modellsystem beeinflussten. Es ist dennoch möglich, dass eine chronisch persistierende Entzündung, wie in dieser Studie in Antwort auf Titanoberflächen gezeigt werden konnte, zu einer geringeren Ablagerung von Bindegewebe führt.

Im Wesentlichen zeigte die Hauptkomponentenanalyse die Unterscheidungskapazität der Modellsysteme zwischen den Referenzmaterialien PTFE und Titan auf. Die Analyse von einem Modell je Makrophagenspender ($n = 5$) bestätigte die Machbarkeit eines aussagekräftigen Fremdkörpermodells. Zusätzlich verdeutlichte die Beladung der Hauptkomponentenebene mit den einzelnen Messparametern deren Einfluss auf die Unterscheidungskapazität des Systems. Ergänzend bestätigte die Übereinstimmung der Messparameterladungen und der Modellprojektionen zwischen den Kollagen- und den Fibrinmodellen die Standardisierung beider Modellsysteme sowie die Verlässlichkeit der durchgeführten Hauptkomponentenanalyse. Von großer Bedeutung ist, dass die Modellsysteme die fibrotischen Eigenschaften von PTFE im Vergleich zu Titan höher bewerteten und sich somit als aussagekräftiges Fremdkörpermodell bewiesen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten *in vitro* Fremdkörpermodellssysteme aufgebaut werden, welche sich an der physiologischen Mikroumgebung aus Zell- und Matrixkomponenten in einer Implantationswunde orientieren:

- (I) Ein zellbasiertes indirektes Modellsystem zur Untersuchung von Teilprozessen während einer Fremdkörperreaktion wie (a) die Chemotaxis von Fibroblasten und (b) der Bindegewebsumbau durch Fibroblasten.
- (II) Unter verschiedenen Testbedingungen die materialabhängige Freisetzung von Zytokinen, und durch eine vergleichende, statistische Modellierung eine anschließende Bewertung dieser Testvariablen hinsichtlich ihrer prädiktiven Aussagekraft.
- (III) Die Entwicklung von dreidimensionalen Fremdkörpermodellen, die sowohl die zentralen zellulären Komponenten als auch die Matrixkomponenten in einer Wunde abbilden.

Die nachfolgenden Kapitel sollen die Herausforderung, die Neuwertigkeit und die Relevanz der entwickelten *in vitro* Modellssysteme hervorheben und diskutieren.

Relevanz des Themas

Trotz der wissenschaftlichen Bemühungen, Biomaterialien zu entwickeln, die eine geringfügige Fremdkörperreaktion auslösen, weisen alle Medizinprodukte negative Gewebsreaktionen wie eine Entzündung, eine Fibrose oder eine Thrombose auf (37-39). Für die Entwicklung von neuartigen Biomaterialien ist eine systematische Risikoeinschätzung notwendig (5). Die in dieser Arbeit beschriebenen neuartigen Modellssysteme können zukünftig den Entwicklungsprozess von Biomaterialien unterstützen sowie beschleunigen.

Vorteile von in vitro Testungen im Vergleich zu in vivo Testungen

Der aktuelle Goldstandard zur Testung von Gewebsreaktionen auf einen Fremdkörper ist nach wie vor die Implantation in Modellorganismen (45). Andererseits bildet eine geringe Toxizität im Tiermodell keine verlässliche Evidenz für eine gute Verträglichkeit im Menschen (187). Zusätzlich sind *in vitro* Tests im Vergleich zeit- und kosteneffizienter und ermöglichen die

Quantifizierung einzelner Einflussgrößen wie die zelluläre oder molekulare Zusammensetzung (185). Bisherige standardisierte *in vitro* Modellsysteme bilden die Komplexität der Prozesse während einer Fremdkörperreaktion *in vivo* nicht ab (45), so eignen sich *in vitro* Tests beispielsweise nicht für eine Bewertung bei wiederholtem oder längerem Blutkontakt [ISO 10993-4:2002, Teil 4] (134). Dies bestärkt die Notwendigkeit, geeignete *in vitro* Modellsysteme zu entwickeln (188).

4.1 Entwicklung von humanbasierten *in vitro* Modellsystemen

Für die Etablierung eines *in vitro* Modellsystems war die Auswahl geeigneter Gewebe zur Isolierung und Differenzierung von Zellen notwendig.

Vorteile von humanbasierten Testsystemen

Die Isolierung von Zellen aus humanen Geweben erhöht die Vergleichbarkeit mit dem humanen Organismus, da Unterschiede zwischen den Spezies keine Rolle spielen. Zusätzlich betont eine geringe Vergleichbarkeit des Immunsystems zwischen Tier und Mensch die Wertigkeit von humanbasierten und immunkompetenten *in vitro* Modellsystemen (189). Je nachdem aus welcher Spezies die Zellisolierung erfolgt, weisen die Makrophagen funktionelle Unterschiede (zusammengefasst in Tabelle 4-1) in ihrer phagozytotischen Aktivität sowie in ihrer chemotaktischen und zytotoxischen Reaktivität auf (190). Des Weiteren zeigen Makrophagen aus unterschiedlichen Spezies morphologische Unterschiede. Beispielsweise kennzeichnen Makrophagen aus humanem Gewebe eine größere Heterogenität sowie eine höhere Zellgröße (191). Zusammenfassend sind Tiermodelle zwar der Goldstandard zur Untersuchung der Fremdkörperreaktion nach Implantation eines Biomaterials, jedoch ist die direkte Übertragbarkeit von immunologischen Daten aus Tiermodellen auf den menschlichen Organismus stark zu hinterfragen (192, 193). Im Hinblick auf die Translation bestärkt die höhere Übertragbarkeit auf den Menschen die Entwicklung von humanbasierten Modellsystemen und begründete den Aufbau der Modellsysteme mit Monozyten aus humanem Blut. *In vitro* ermöglichten Reifungsfaktoren eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Hierbei entschied die Wahl des entsprechenden Reifungsfaktors über den induzierten Zellphänotyp.

Tabelle 4-1 Funktionelle und morphologische Unterschiede zwischen Makrophagen aus unterschiedlichen Spezies.

| Autor, Jahr (Referenz) | Spezies | Ergebnis |
|-----------------------------------|---|---|
| Haley, 1991 (191) | Maus, Ratte, Mensch und Hund | Humane Makrophagen zeigten im Vergleich zu Makrophagen aus Mäusen, Ratten und Hunden eine große Heterogenität sowie eine größere Zellgröße. |
| Schimmelpfeng, 1991 (194) | Hund, Affen, Mensch, Ratte, Rind | Makrophagen aus Hunden, Affen und Menschen reagierten sensitiver auf zytotoxische Stimulation als Makrophagen von Ratten oder Rindern. |
| Schlesinger, 1992 (195) | Meerschweinchen, Ratte, Kaninchen, Mensch | Die Säuretoleranz von Makrophagen und deren phagozytotische Aktivität stieg von Meerschweinchen über Ratten und Kaninchen zum Mensch. |
| Warheit, 1993 (196) | Maus, Hamster, Meerschweinchen, Ratte | Alveolare Makrophagen aus Ratten wiesen im Vergleich zu anderen Spezies eine erhöhte Chemotaxis auf. |
| Krombach, 1997 (197) | Ratte, Hamster, Mensch | Humane Makrophagen hatten im Vergleich zu Hamster und Ratte ein vierfach erhöhtes Zellvolumen. |
| Dorger, 2000 (198) | Ratte, Hamster | Im Vergleich zum Hamster wiesen Makrophagen aus der Ratte eine höhere frustrierte Phagozytoserate und eine höhere Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies auf. |
| Takahashi, 2011 (199) | Kaninchen, Mensch, Maus | In Kaninchen und Menschen exprimierten Makrophagen in atherosklerotischen Plaques den VLDL-Rezeptor, wohingegen im Mausmodell keine Expression vorlag. Die Pathogenese von Atherosklerose unterliegt möglicherweise Speziesunterschieden. |

Phänotypisches Profil von M1- und M2-Makrophagen

In vivo wird die Wundheilung durch den Übergang von proentzündlichen M1-Makrophagen zu M2-Makrophagen begleitet (52, 65). Hierbei beeinflusst die M2-Polarisierung die metabolische und funktionelle Aktivität der Makrophagen. Die Verschiebung des Argininstoffwechsels sowie die Bereitstellung von Eisen stellen zwei zentrale Mechanismen der fibrösen Kapselbildung während einer Fremdkörperreaktion dar. Während M1-Makrophagen über die induzierbare Stickoxidsynthase Arginin zu Citrullin und Stickoxid umsetzen, bilden M2-Makrophagen das Enzym Arginase. Dieses Enzym katalysiert den Abbau von Arginin zu

Ornithin und Harnstoff. M1-Makrophagen vermitteln über das entstandene Stickoxid eine antimikrobielle Kapazität und hemmen gleichzeitig die für Wundheilungsprozesse notwendige zelluläre Proliferation und Vitalität. (200) Im Gegensatz hierzu fließt das durch M2-makrophagenkatalysierte gebildete Ornithin in nachgelagerte Synthesewege ein. Im Gewebsdefekt unterstützt Ornithin über die Polyaminsynthese die Zellproliferation sowie über die Synthese von Prolin die Kollagenbildung. (201, 202) Zusätzlich weisen M1-Makrophagen im Vergleich zu M2-Makrophagen über die Bildung des Eisenspeicherproteins Ferritin eine erhöhte Eisenspeicherkapazität auf und vermindern die für das Zellwachstum wichtige Verfügbarkeit von Eisen. Diese Absenkung des Eisenspiegels in der Mikroumgebung von M1-Makrophagen unterstützt die Abwehr einer bakteriellen Infektion. Im Vergleich hierzu exprimieren M2-Makrophagen das Exportprotein Ferroportin, welches über einen erhöhten Eisenexport das Wachstum und die Proliferation von Zellen in der Mikroumgebung unterstützt. (203) Für den Aufbau von Fremdkörpermodellen, welche die Bindegewebsbildung in Antwort auf ein Biomaterial charakterisieren, stellen die Kollagenbildung und die Anreicherung von Zellen zwei zentrale Mechanismen der Verkapselung dar. Die Funktion von M2-Makrophagen als Modulatoren der Fibroblastenaktivität begründete die Anwendung von M-CSF zur Differenzierung der Monozyten.

Anwendung primärer Zellen

In vitro Testungen erfolgen oft mit Zelllinien wie den humanen Zelllinien HL-60 und U937 oder mit primären Zellen (35). Im Vergleich zu Zelllinien erfordern primäre Zellen die Replikation der Testungen mit Zellen mehrerer Spender. Die Isolierung von primären Zellen aus dem Gewebe von mehreren Spendern und deren Anwendung zur Testung von Biomaterialien ging mit einer hohen Varianz der gemessenen Endpunkte einher. Zum Beispiel zeigte das Expressionsprofil der Differenzierungsmarker einerseits eine hohe Stabilität der Differenzierung, andererseits verdeutlichte die Zytokinfreisetzung die Heterogenität zwischen den Blutspendern. In der Testpraxis oft vernachlässigt, erfolgt die Anwendung von Zelllinien oder die Isolierung von primären Zellen aus Gewebe von relativ kleinen Patientengruppen. Dies begrenzt das Testspektrum und führt zur Einschränkung der Aussagekraft von *in vitro* Modellsystemen. (193) Zur Stärkung der Aussagekraft erfolgten daher die Isolierung von primären Zellen und die Replikation der Tests mit fünf bis zehn Spendern.

Verfügbarkeit der Zellquelle

Zusätzlich ermöglichte die Verfügbarkeit von humanem Blut die Isolierung von relativ großen Zellmengen. Hierdurch erfüllt der Versuchsaufbau die Voraussetzung für die Durchführung von umfangreichen Biomaterialtestungen. Zum Beispiel konnten im multiparametrischen vergleichenden Modellsystem (siehe Kapitel 3.4) fünf unterschiedliche Materialien unter fünf Testbedingungen getestet werden. Dies resultierte in 25 unterschiedlichen Testansätzen auf einer gesamten Testoberfläche von 225 cm². Die gewählte Zellquelle bildete somit eine Basis für eine umfangreiche, großangelegte Testung von Biomaterialien.

4.2 Validierung von Modellsystemen

Die in dieser Arbeit angewandten Referenzbiomaterialien ermöglichten eine literaturgestützte Validierung der entwickelten Modellsysteme hinsichtlich ihrer Verlässlichkeit, eine Fremdkörperreaktion hervorzusagen. Die Bewertung der Gewebeantwort nach Implantation diente als validierendes Kriterium für die neuartigen *in vitro* Modellsysteme. Die Ergebnisse der Studien ermöglichten die Einführung eines Biomaterialrangs für jedes einzelne Referenzmaterial im Vergleich zu allen anderen Referenzmaterialien: das fibröse Potential der Referenzbiomaterialien steigt von PE über Titan und PTFE zu Silikon. Die hierfür eingeschlossenen *in vivo* Studien basieren auf der histologischen Bewertung von entzündlichen Infiltraten und der Anreicherung von extrazellulärer Matrix (162, 163, 165, 166). In den entwickelten Modellsystemen konnten zusätzlich zu histologischen Bewertungskriterien biochemische und molekulare Analysen wie die Zytokinfreisetzung, der ATP-Spiegel oder die Kollagenneusynthese miteinbezogen werden.

Die entwickelten Modellsysteme zur (I) indirekten Charakterisierung von Teilprozessen, (II) zur Bewertung von Testbedingungen und (III) zur direkten Untersuchung von fibrösen Prozessen wiesen alle eine Unterscheidungskapazität zwischen den untersuchten Referenzbiomaterialien auf. Die erzielte Korrelation zum entwickelten literaturbasierten Biomaterialrang unterstreicht die Wertigkeit von humanen, zellbasierten und biomimetischen Modellsystemen. Beispielsweise konnte die Oberflächenbehandlung mit humanem Blutplasma als eine Testbedingung mit einer hohen Verlässlichkeit bestimmt werden. Andererseits verdeutlichten die auftretenden Abweichungen von der literaturbasierten Biomaterialbewertung die Komplexität der Vorgänge während einer biomaterialinduzierten Fremdkörperreaktion. Hierbei wiesen beispielsweise das chemotaktische Potential der Referenzmaterialien Glas,

PTFE und Titan keine Übereinstimmung mit dem literaturbasierten Rang der Referenzmaterialien auf. Jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass die Untersuchung mehrerer Teilprozesse und deren Eingliederung in mehrphasige Teststrategien die Unterscheidungskapazität zwischen Biomaterialien erhöht und in der Summe eine Korrelation zur Studienlage ergeben kann.

4.3 Materialabhängige Teilprozesse während einer Fremdkörperreaktion

Herausforderung und Neuwertigkeit der Entwicklung

Aktuelle indirekte präklinische Charakterisierungsverfahren zur Biokompatibilitätstestung verwenden Biomaterialextrakte und untersuchen deren Effekte auf lebende Zellen oder Organismen (35). Die Entwicklung eines Modellsystems, das die Wechselwirkung zwischen Biomaterial und Makrophagen erfasst und in einem indirekten Verfahren die Antwort von Fibroblasten charakterisiert, ist neuwertig. Im Gegensatz zu Tierstudien ermöglichen indirekte Modellsysteme die Unterteilung komplexer Prozesse in Teilprozesse und die Weiterentwicklung einer Teststrategie aus diesen Komponenten. Jedoch geht die Rückwirkung zwischen den Zellen durch die Entkopplung des Prozesses verloren. Die Entkopplung der Fremdkörperreaktion ermöglicht aber eine präzise und detaillierte Entschlüsselung komplexer Vorgänge [ISO 10993-4:2002, Teil 4] (134). Bisherige *in vitro* Modellsysteme konnten den Beitrag von einzelnen Prozessen zur Fremdkörperreaktion nicht quantitativ abbilden. Zwar zeigten Zhou und Kollegen (2015) direkt auf Materialoberflächen eine materialabhängige Migration von THP-1-Makrophagen in Richtung von Fibroblasten. Jedoch liefern solche direkten oberflächenexponierten Tests keinen Rückschluss auf vorhandene Chemokingradienten, sondern können ebenfalls durch die Oberflächenbeschaffenheit oder die chemische Zusammensetzung hervorgerufen werden. (204) Die Untergliederung des indirekten Modellsystems eignete sich zur getrennten Untersuchung von materialinduzierten Prozessen wie beispielsweise die Freisetzung von löslichen Mediatoren wie Chemokinen oder Wachstumsfaktoren.

Experimenteller Aufbau des indirekten zellbasierten Modellsystems

Zur Charakterisierung von Testobjekten ließen sich die entwickelten indirekten Modellsysteme in sensorische, mediatorische und aktorische Teilprozesse untergliedern. Im Modellsystem wurde die Biomaterialoberfläche sensorisch durch Makrophagen analysiert (sensorischer Teilprozess). Das erfasste Signal konnte durch die zelluläre Freisetzung löslicher Mediatoren in das Zellkulturmedium übersetzt werden (mediatorischer Teilprozess). Diese Information im Zellkulturmedium ließ durch das Einfrieren des Mediums zu einem bestimmten Zeitpunkt speichern, wodurch die Testdurchführung zeitlich entkoppelt stattfinden konnte. Anschließend erfolgte die Charakterisierung des Zellkulturmediums im zellbasierten Modul des Modellsystems (aktorischer Teilprozess). Fibroblasten erfassten sensorisch das multifaktorielle Milieu aus löslichen Mediatoren im konditionierten Medium und übersetzten das Signal in eine Zellantwort. In dieser Arbeit konnten zwei Endpunkte zur indirekten Charakterisierung von Biomaterialien identifiziert werden: (I) die Chemotaxis von Fibroblasten in Richtung von konditioniertem Medium sowie (II) die Gewebsumstrukturierung eines Kollagenhydrogels durch Fibroblasten. Die gewählten Endpunkte stellen beide über (I) die Anreicherung von Fibroblasten am Implantationsort sowie (II) die Aktivierung von Fibroblasten Einflussgrößen einer biomaterialinduzierten Fremdkörperreaktion dar und entschlüsselten den Beitrag der einzelnen Prozesse zum Gesamtprozess der Fremdkörperverkapselung.

4.3.1 Materialabhängige Chemotaxis von Fibroblasten

Die Migrationsantwort von Fibroblasten auf definierte und langzeitstabile chemische Gradienten konnte mit einem μ -Chemotaxiskammersystem in einer biomimetischen, dreidimensionalen Kollagenmikroumgebung untersucht werden.

Experimenteller Aufbau des Chemotaxismodells

Der experimentelle Aufbau des Modellsystems orientierte sich an der physiologischen Mikroumgebung am Implantationsort. Die Proteinadsorption an die Materialoberfläche ließ sich durch die Supplementierung von Serum zum Kulturmedium im Modellsystem abbilden. Das Zusammenspiel aus Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Materialoberfläche sowie zwischen den verschiedenen Proteinen und den einzelnen Komponenten mit dem wässrigen Milieu ist komplex (205, 206). Daher lassen sich Vorhersagen über die Proteinad-

sorption aus biologischen Flüssigkeiten wie beispielsweise Serum nicht ableiten. Für die Wachstumsfaktoren PDGF, FGF und TGF- β 1 konnte eine starke Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Materialoberfläche gezeigt werden. Die Integration eines Referenzmediums, das ebenfalls für 48 Stunden auf den Referenzmaterialien inkubiert wurde, schloss als Negativkontrolle materialabhängige Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Materialoberfläche aus und ermöglichte eine fokussierte Untersuchung von makrophagen-induzierten Effekten. Im Zweikammersystem verdeutlichte der direkte Vergleich mit dem jeweiligen Referenzmedium die Zellmigration in Richtung des konditionierten Mediums und ließ den Rückschluss auf eine höhere zelluläre Nettosekretion, welche passive Adsorptionseffekte überlagerte, zu.

Relevanz von zellbasierten Modellsystemen

Im Vergleich zum jeweiligen Referenzmedium konnte ausschließlich auf PTFE-Oberflächen eine aktive Freisetzung der Chemokine FGF, PDGF und TGF- β 1 beobachtet werden. Dies unterstützt die Annahme, dass die Messung einzelner Chemokine kein Bewertungsmaß für das chemotaktische Potential eines Biomaterials liefern kann. Zusätzlich bestärkte es die Anwendung von Zellen wie Fibroblasten als Sensoren zur Erfassung des komplexen, multielementaren Sekretionsprofils im konditionierten Medium. Hierbei ermöglichte die Übersetzung des Fremdkörpersignals in eine zelluläre Antwort eine Bewertung der Referenzmaterialien.

Statistische Parameter zur Charakterisierung der Chemotaxis

Einfache statistische Parameter wie die Ausrichtung der Bewegungstrajektorien im X-Y-Koordinatensystem sowie die Wanderungstrecke zwischen Start- und Endpunkt zeigten keine Unterschiede zwischen den Referenzbiomaterialien Glas, PTFE und Titan auf. Lineare Parameter wie die Direktheit der Zellmigration sowie der Vorwärtsmigrationsindex in Richtung des chemischen Gradienten wiesen auf eine Materialabhängigkeit der chemotaktischen Prozesse hin. Jedoch zeigte der Migrationswinkel als zirkulärer statistischer Parameter die stärkste Unterscheidungskapazität auf und ließ eine Bewertung der Biomaterialien hinsichtlich ihres chemotaktischen Potentials zu. Die indirekte Charakterisierung verdeutlichte für Titanoberflächen die Eigenschaft, eine direkte vorwärtsorientierte Chemotaxis von Fibroblasten auszulösen. Die Kultivierung von Makrophagen auf PTFE-Oberflächen führte zur Freisetzung löslicher Mediatoren, die ebenfalls eine direkte und vorwärtsorientierte

Chemotaxis von Fibroblasten stimulierten, jedoch war die Winkelausrichtung am Gradienten im Vergleich zu den titanvermittelten Effekten signifikant niedriger.

Validität der statistischen Chemotaxisparameter

Im Vergleich zur literaturbasierten Bewertung der Referenzmaterialien stimmt das ermittelte chemotaktische Potential nicht mit der beschriebenen fibrösen Reaktion auf Titan und PTFE überein. Weitere Einblicke in die Vorgänge der Fremdkörperreaktion sind notwendig, um zu bewerten, ob eine stärkere Chemotaxis von Fibroblasten in Antwort auf ein Biomaterial möglicherweise für eine physiologische Heilungsreaktion vorteilhaft ist und die fibröse Kapselbildung positiv beeinflusst.

4.3.2 Materialinduzierter Bindegewebsumbau in dreidimensionalen Modellen

Experimenteller Aufbau des Bindegewebsmodells

In unmittelbarer Wundumgebung eines Biomaterials erfassen Fibroblasten das Entzündungsmilieu aus löslichen Mediatoren und setzen dieses Signal in eine Bindegewebsreaktion um. Gewebsständige Fibroblasten können zu Myofibroblasten differenzieren und unterstützen durch Kontraktion des Bindegewebes den Wundverschluss (125, 173). Des Weiteren weisen Myofibroblasten im Vergleich zu undifferenzierten Fibroblasten eine erhöhte Matrixsynthese auf (67). Damanik und Kollegen (2014) konnten in ihrem Fremdkörpermodell bereits die Effekte von zellkonditioniertem Medium auf die zweidimensionale Monokultur von Fibroblasten zeigen (207). In diesem Modellsystem verhinderte jedoch der kombinierte Einsatz von Makrophagen- und Fibroblastenmedium einen Rückschluss auf Effekte der einzelnen Zellpopulationen. Im hier entwickelten kollagenbasierten Bindegewebsmodell konnte durch Transfer von konditioniertem Makrophagenmedium die Langzeitantwort von Fibroblasten auf die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Biomaterial untersucht werden. Der Vergleich mit Bindegewebsmodellen, die unter materialinkubiertem Referenzmedium kultiviert wurden, ermöglichte die Identifizierung von Effekten zwischen Makrophagen und Biomaterial. Im Gewebemodell verdeutlichten die erfassten Endpunkte wie die Kontraktion des Gewebes und die herbeigeführte Gewichtsabnahme sowie die Anreicherung von extrazellulärer Matrix eine starke biomaterialinduzierte Gewebsumstrukturierung.

Materialabhängigkeit der induzierten Effekte

Die höchste Gewichts­differenz zwischen dem konditionierten Medium und dem Referenzmedium konnte für Titanoberflächen beobachtet werden. Im Verhältnis zum Ausgangsgewicht blieb das absolute Gewicht des Bindegewebsmodells jedoch hoch und war durch eine geringfügige Kollagenablagerung gekennzeichnet. Die PTFE-induzierten Effekte führten im Vergleich zum Referenzmedium eine moderate Gewichts­differenz herbei. Im Vergleich zum Ausgangsgewicht trat jedoch eine starke Gewichts­abnahme ein. Die Ablagerung von Kollagenfasern verdeutlichte die PTFE-induzierte Kontraktion des Bindegewebes.

Bindegewebsmodelle als valide Modellsysteme

Im Vergleich zur literaturbasierten Biomaterialbewertung korrelierten die beobachteten Effekte im Gewebsmodell mit dem beschriebenen fibrösen Potential, das von Titan zu PTFE ansteigt. Zusammenfassend konnte ein indirektes, multimodulares Modellsystem zur Untersuchung von Teilprozessen während einer Fremdkörperreaktion sowohl für (I) die materialinduzierte Chemotaxis sowie (II) den Gewebeumbau durch Fibroblasten entwickelt werden. Bisherige Modellsysteme bildeten die materialabhängige Beteiligung der einzelnen Teilprozesse wie die Chemotaxis und der Gewebeumbau an den komplexen Vorgängen einer fremdkörperinduzierten Kapselbildung nicht ab. Das entwickelte indirekte Modellsystem erfasst beide Teilvorgänge sowohl quantitativ als auch qualitativ. Hierbei verdeutlichten beide Testverfahren signifikante Unterschiede zwischen den Referenzmaterialien, jedoch war die Materialabhängigkeit der beobachteten Teilprozesse divergent.

4.4 Vergleichende statistische Modellierung zur Bewertung von Testbedingungen

Herausforderung und Neuwertigkeit der Entwicklung

Der Goldstandard zur Bewertung von Biomaterialien, das Tiermodell, kann durch *in vitro* Modellsysteme ergänzt werden. Jedoch setzt die Anerkennung von *in vitro* Modellen als valide Testsysteme eine Korrelation von *in vitro* Studien zu *in vivo* Studien voraus. Oftmals schwächt die geringe Korrelation der Datenlage die Akzeptanz von *in vitro* Biomaterialstudien (175). Die Identifikation geeigneter prädiktiver Testbedingungen stellt daher eine Herausforderung der Modellsystementwicklung dar. In dieser Arbeit konnte durch den statistischen Vergleich mehrerer analytischer Endpunkte ein experimenteller Aufbau für eine

Biomaterialstudie mit primären humanen Makrophagen bestimmt werden, welcher eine hohe Validität besitzt.

Experimenteller Aufbau des vergleichenden Modellsystems

Die Wahl der Testbedingungen, die auf ihre Validität geprüft werden sollten, orientierte sich an den Gegebenheiten bei Implantation eines Biomaterials: eine mögliche Oberflächenkontamination mit immunreaktiven Bakterienwandbestandteilen wie LPS, der herbeigeführte Kontakt zwischen dem Blutplasma und der Materialoberfläche sowie die Anreicherung von IL-4 in Gegenwart von Granulozyten und T_{H2}-Lymphozyten in der Wundnische. Die Testung der vier Referenzmaterialien - PTFE, Titan, Silikon und PE - verdeutlichte einerseits den Einfluss von Testbedingungen auf die Bewertung der unterschiedlichen Biomaterialien, setzte andererseits eine hohe qualitative Anforderung für die Validierung des Modellsystems. Zur Charakterisierung von Biomaterialien ist eine Verschiebung von zellulären Nachweisen zu molekularen Nachweisen zu beobachten (140, 141). Nach Implantation eines Biomaterials in ein Tiermodell konnten bereits Zytokine in der Entzündungsflüssigkeit als Bewertungskriterium herangezogen werden (208). Dennoch ist die Biomaterialbewertung über die Zytokinfreisetzung nach wie vor relativ neu (79). Einzelne Zytokine wirken jedoch nicht alleine, sondern in Netzwerken aus akkumulierenden, synergistischen und antagonistischen Effekten. Hierdurch sind die physiologischen Effekte abhängig von der relativen Konzentration zahlreicher Zytokine. Daher ist es umso wichtiger, die Konzentration sowie das Profil mehrerer Zytokine zu bestimmen und nicht einzelne Zytokine zu betrachten. Dies begründete die Durchführung von multiparametrischen Analysen zur Charakterisierung der Testverfahren. (77) Die Überführung der multiparametrischen Analysen in ein vergleichendes statistisches Modell ermöglichte eine kompakte Zusammenfassung der Daten und ließ eine Bewertung der gewählten Testbedingungen zu.

Die Oberflächenbehandlung mit Blutplasma als eine prädiktive Testbedingung

Nach der entwickelten Vorgehensweise konnte die Oberflächenbehandlung mit humanem Blutplasma als eine Testbedingung mit einer hohen Vorhersagekapazität bestimmt werden. Dies verdeutlichte den Einfluss von Blutplasma auf die Bewertung von Biomaterialien. Der Kontakt von Blutplasma zur Biomaterialoberfläche aktiviert die intrinsische Blutgerinnungskaskade und führt zur Ausbildung einer ersten dreidimensionalen Fibrinmatrix auf der Oberfläche (39, 209). Zusammen mit Adhäsionsproteinen wie Fibrinogen, Fibronectin und

Vitronektin unterstützt die dreidimensionale Fibrinnetzstruktur zelluläre Migrations- und Adhäsionsprozesse. Des Weiteren ermöglicht die Proteinadsorption von beispielsweise IgG oder Komplementfragment C3 die Zelladhäsion an die Biomaterialoberfläche. (35) Nach Adhäsion der Zellen können die Makrophagen anschließend die Oberfläche sensorisch erfassen, das erfasste Signal in eine Reaktion auf den Fremdkörper übersetzen und eine Sekretionsantwort auslösen. (53, 179) Zusammenfassend unterstützte die Orientierung der Testbedingungen an der biomimetischen Mikroumgebung aus löslichen und strukturbildenden Blutplasma-Proteinen die Verlässlichkeit einer *in vitro* Methode zur Testung von Biomaterialien.

Eingliederung eines Screenings zur Bestimmung geeigneter Testbedingungen in die allgemeingültige Testpraxis

Die Suche nach einem Testverfahren mit einer hohen Verlässlichkeit und Genauigkeit ist aufwendig. Hierbei entscheiden die Wahl geeigneter Testbedingungen, die Charakterisierung dieser durch umfangreiche analytische Endpunkte und die anschließende Interpretation und die Modellierung der generierten Daten über den Erfolg einer Biomaterialbewertung *in vitro*. Das durchgeführte Verfahren unterstützt die Entwicklung einer Testmethode, welche die Bedingungen im menschlichen Organismus nachstellt. Die Anwendung humaner Zell- und Matrixkomponenten - hier gezeigt für Makrophagen in einer Fibrinmatrix - ist keine immunologische Translationsforschung, trotzdem bildet sie einen wichtigen, oft vernachlässigten Schritt in Richtung klinischer Translation ab (193). Die Eingliederung von *in vitro* Modellsystemen, die aus humanen Zell- und Gewebekomponenten aufgebaut sind und biomimetisch die Bedingungen *in vivo* abbilden, in standardisierte Testverfahren ist daher von hohem Wert (193). Jedoch ist die Übertragbarkeit *in-vitro*-generierter Daten auf klinische Studienergebnisse nicht notwendigerweise gegeben (175). Daher ist es erforderlich, die *in vitro* generierten Daten mit klinischen Studien zu vergleichen. Das durchgeführte Testverfahren konnte jedoch verdeutlichen, dass unter geeigneten Testbedingungen eine Übereinstimmung zwischen der Biomaterialbewertung *in vitro* und der beschriebenen Studienlage *in vivo* möglich ist - hier gezeigt für die Oberflächenbehandlung mit Blutplasma. Nach der Identifizierung einer verlässlichen Testbedingung kann diese angewandt werden, um in einem breitangelegten Biomaterialscreening nach potentiellen Biomaterialkandidaten zu suchen. Diese Teststrategie zielt auf die Reduzierung von Tierversuchen in der Wissenschaft und

ermöglicht über einen reduzierten Testumfang ausschließlich vielversprechende Biomaterialkandidaten in einer Tierstudie unter systemischen Bedingungen zu testen.

Weiterentwicklung des Testverfahrens

Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des Testverfahrens ermöglicht die hohe Verfügbarkeit von Zelllinien eine Erhöhung des Testumfangs. Hierbei kann die Anwendung standardisierter Zelllinien die Reproduzierbarkeit der Daten verbessern und damit einhergehend die Anzahl notwendiger Replikationszyklen begrenzen. Zum Beispiel werden zur Untersuchung der Fremdkörperreaktion die humanen Zelllinien HL-60 oder U937 eingesetzt (35). In Bezug auf Veränderungen ihres Phänotyps sowie ihrer Funktionalität sind diese aus Tumorgewebe gewonnen immortalisierten Zelllinien jedoch oft unzureichend beschrieben. In anschließenden Studien könnte der generierte multiparametrische Datensatz aus Entzündungsprofilen zur Identifizierung einer korrespondierenden Zelllinie angewandt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die vergleichende statistische Modellierung die Identifizierung von Messparametern mit einer hohen Aussagekraft erleichtert. Beispielsweise stimmte nach Oberflächenbehandlung mit Blutplasma die statistische Bewertung des Messparameters IL-8 mit der literaturbasierten Bewertung der Referenzmaterialien überein. Prinzipiell erhöht der Umfang der analysierten Endpunkte die Sensitivität und Genauigkeit des Modellsystems. In der anschließenden Entwicklungsphase können die Zusammensetzung der analysierten Messparameter weiterhin optimiert und weniger aussagekräftige Zytokine durch prognostische Messfaktoren ausgetauscht werden. Die in diesem Testverfahren angewandte mathematische Modellierung beruht auf dem statistischen Vergleich der Versuchsgruppen und zielt auf die Arbeitshypothese, ob eine Unterscheidung der Biomaterialien unter den gewählten Testbedingungen möglich ist. Weitere mathematische Modellierungen können je nach Fragestellung ein besseres Verständnis der Wechselwirkung zwischen dem Biomaterial und den Zellen liefern. Beispielsweise ermöglicht die Hauptkomponentenanalyse eine Klassifizierung von multifaktoriellen Datensätzen und kann somit je nach Unterscheidungskriterium (Messparameter, Biomaterialien oder Testbedingungen) eine Gruppierung von Datensätzen nachweisen. (141)

In dieser Arbeit erfolgte die Bewertung der Verlässlichkeit basierend auf einer retrospektiven Zusammenfassung bisher durchgeführter präklinischer und klinischer Studien. Anhand der literaturbasierten Bewertung der Referenzmaterialien konnte die Vorhersagegenauigkeit der

entwickelten *in vitro* Testmethode bestätigt werden. Zusätzlich könnte die Reaktion der verwendeten Referenzmaterialien in einer prospektiven *in vivo* Studie auf Übereinstimmung mit der retrospektiven Bewertung geprüft werden. Für die Zulassung als anerkannte Testpraxis ist im Anschluss an die Entwicklung einer Testmethode eine multimodulare Validierungsstudie notwendig. Die Validierung einer alternativen Testmethode erfordert die Durchführung eines Bewertungsprozesses, in dem die Verlässlichkeit und die Relevanz für einen bestimmten Zweck zu beweisen sind (210, 211). Hierbei untergliedert sich das Prüfverfahren in fünf Phasen: die Entwicklung der Testmethode, die Prävalidierung zur Optimierung bereits bestehender Protokolle, die Validierung hinsichtlich der Übertragbarkeit, der Reproduzierbarkeit und der Relevanz der Methode, die prozessexterne unabhängige Begutachtung der generierten Daten und letztendlich die regulatorische Zulassung. In dieser Arbeit konnte eine Testmethode identifiziert werden, die die erforderlichen Voraussetzungen für ein anschließendes Validierungsverfahren erfüllt:

- (I) Der wissenschaftliche Zweck der Testmethode ist dargestellt.
- (II) Die Mechanismen der Testmethode sind auf wissenschaftlicher Basis beschrieben.
- (III) Mit definierten Referenztestobjekten ist die Testdurchführung und die Analyse definierter Endpunkte in Protokollen festgehalten.
- (IV) Die anschließende Generierung und Darstellung der Daten sowie die Interpretation der Ergebnisse ist nachvollziehbar und die prädiktive Aussagekraft der Daten konnte bestätigt werden.

Im Anschluss an diese Entwicklungsphase ist in der Validierungsphase die Verlässlichkeit der etablierten Testmethode zu demonstrieren. Die Variabilität innerhalb eines Labors kann nach Durchführung des gleichen Protokolls zu unterschiedlichen Zeitpunkten und durch unterschiedliche Operatoren geprüft werden. Die Robustheit der Testmethode muss durch den Transfer und die Etablierung in einem zweiten Labor auf die Praktikabilität, den Aufwand und die Identifizierung möglicher Variabilitätsursachen untersucht werden. Anschließend ist in einer umfangreichen Studie mit zahlreichen Testsubstanzen, die das gesamte Effektspektrum abbilden, die Variabilität zwischen drei bis vier geschulten Laboratorien zu zeigen. Ergänzend zur Prüfung auf Verlässlichkeit erfolgt der Relevanznachweis der Testmethode. Hierfür ist die prädiktive Kapazität der Testmethode mit einer definierten Anzahl an neuen

bisher nicht angewendeten Testmaterialien zu prüfen und hierdurch die Prädiktivität der Methode zu evaluieren. Abschließend müssen der geeignete Anwendungsbereich festgelegt, Grenzen aufgezeigt und Referenzstandards bestimmt werden. Die abschließende unabhängige Begutachtung der generierten Informationen ist Voraussetzung für die Zulassung einer alternativen Testmethode. (212, 213)

Zusammenfassend begründete die bisherige geringe Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien die klare Notwendigkeit von prädiktiven Testbedingungen für die Bewertung von Biomaterialien *in vitro*. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie sensitiv *in vitro* Biomaterialtestungen von den gewählten Testbedingungen abhängen und die Bewertung eines Biomaterials im Vergleich zu anderen Biomaterialien beeinflussen. Wesentlich konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen *in vitro* Modellsystemen basierend auf humanem Blutplasma zur Bewertung der Biomaterialien *in vivo* möglich ist.

4.5 Biomimetische Rekonstruktion eines dreidimensionalen Wundgewebes

Herausforderung und Neuartigkeit der Entwicklung

Während einer Fremdkörperreaktion durchläuft das Freisetzungsprofil löslicher Mediatoren eine zeitliche Dynamik und beeinflusst den Ausgang einer Wundheilungsreaktion (77, 214). Indirekte Modellsysteme charakterisieren jedoch ausschließlich zu einem bestimmten Zeitpunkt die Konditionierung des Mediums. Im Gegensatz hierzu ermöglichen direkte Modellsysteme, die eine kontinuierliche Wechselwirkung, eine rückwirkende Kommunikation und einen direkten Stoffaustausch zwischen Modellkomponenten zulassen, die Untersuchung von langfristigem oder wiederholtem Kontakt zwischen dem Biomaterial, den Zellen und den extrazellulären Matrixkomponenten. Im letzten Teil dieser Arbeit konnte ein dreidimensionales Fremdkörpermodellsystem entwickelt werden, das in einer dreidimensionalen Matrixumgebung den Echtzeitaustausch löslicher Mediatoren zwischen den Makrophagen und den Fibroblasten zulässt. Das verwendete Trägersystem untergliederte das dreidimensionale Modellsystem in eine basale, sensorische Modellkomponente aus Makrophagen in einer Fibrinmatrix und eine apikale, aktorische Modellkomponente aus Fibroblasten in einer Kollagen- oder Fibrinmatrix. Im Boden des Trägersystems verband eine poröse Membran beide Modellkompartimente und ermöglichte den Austausch löslicher Stoffe zwischen diesen.

Hierdurch war eine direkte Kommunikation zwischen den Makrophagen und den Fibroblasten im Modellsystem gewährleistet. Zusätzlich unterstützte die Untergliederung des entwickelten Modellsystems eine getrennte Untersuchung von Teilprozessen. Bereits vorangegangene Studien konnten zeigen, dass eine kombinierte Kultivierung von Makrophagen mit Fibroblasten die anschließende Charakterisierung von einzelnen Zellpopulationen erschwert. Zum Beispiel zeigten Zeng und Kollegen (2010) die Proliferation, die Migration und die Verteilung der Gesamtzellen in ihrem kombinierten dreidimensionalen Fremdkörpermodellsystem, konnten jedoch nicht zwischen Makrophagen und Fibroblasten unterscheiden (215). Diese Herausforderung wurde ebenfalls bei Parks (2014) und Zhou (2015) sichtbar, sie zeigten in ihrem entwickelten Modellsystem nicht die Vitalität der eingebrachten Makrophagen (185, 204). Als Qualitätskriterium zeichnete das in dieser Arbeit entwickelte untergliederte Modellsystem einen hohen Anteil vitaler Makrophagen aus.

Biomimetische Nachbildung der extrazellulären Matrix in einer Wundnische

Die Matrixzusammensetzung in einer Wundnische ist komplex - Fibrin bildet eine erste provisorische Matrix, die das Defektareal stabilisiert und die Grenzfläche zum nativen Bindegewebe aus Kollagen bildet. Bereits etablierte *in vitro* Fremdkörpermodelle wenden einzelne Matrixkomponente wie Agarose (216) oder Kollagen (184, 185), Gelatine und Alginat (215) als Trägerstrukturen zum Aufbau von dreidimensionalen Geweben an. Einzelne Matrixkomponente können jedoch die komplexe Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in einer Wunde sowie die Grenzfläche zum nativen Bindegewebe nicht biomimetisch abbilden (siehe Tabelle 4-2). Aus der gezeigten Oberflächenbehandlung mit Blutplasma als eine Testbedingung mit einer hohen Vorhersagekapazität (3) leitete sich die Weiterentwicklung des biomimetischen Fremdkörpermodells zu einem kombinierten System mit Makrophagen in einer Fibrinmatrix ab. Des Weiteren bildete das Blutplasma ein reiches Milieu aus Differenzierungsfaktoren wie M-CSF und GM-CSF, die eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen im Modellsystem stärkten (217-219). Das in dieser Arbeit weiterentwickelte Modellsystem ermöglichte durch den kombinierten Einsatz von Fibrin als Wundmatrix und von Kollagen als native biophysikalische Bindegewebsmatrix die biomimetische Modellierung der Grenzflächen und bildete die Reaktion des umliegenden nativen Bindegewebes ab.

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der bereits etablierten Fremdkörpermodellsysteme.

| Autor, Jahr (Referenz) | Modelldesign [Spezies] |
|-----------------------------------|---|
| Zhu, 2001 (184) | Kombinierte Kultur von primären Monozyten aus dem Blut und einer fetalen Fibroblastenzelllinie HFL-1 aus der Lunge in einer Kollagen-I-Matrix [Mensch]. |
| Zeng, 2010 (215) | Kombinierte Kultur von peritonealen Makrophagen und dermalen Fibroblasten in einer Matrix aus mariner Gelatine und Alginat [Maus]. |
| Sanchez, 2011 (216) | Monokultur von Makrophagen aus dem Knochenmark nach M-CSF-vermittelter Vordifferenzierung in einem Hydrogel aus Agarose [Maus]. |
| Parks, 2014 (185) | Kombinierte Kultur von LPS-aktivierten Monozyten der Zelllinie U937 mit dermalen Fibroblasten in einem Kollagenhydrogel [Mensch]. |

Zusätzlich konnte die Einwanderungszone von Fibroblasten aus dem nativen Bindegewebe in die Wundnische durch ein Fremdkörpermodell aus Fibroblasten in einer Fibrinmatrix nachgebildet werden.

Unterscheidungskapazität der Modelle zwischen den Referenzmaterialien PTFE und Titan

Das entwickelte Fremdkörpermodell konnte durch zahlreiche quantitative Endpunkte charakterisiert werden. Erfreulicherweise zeigten alle Messparameter zwischen den Referenzmaterialien PTFE und Titan Unterschiede auf und trugen zur Unterscheidungskapazität des Modellsystems bei. Zwar fiel beispielsweise im kollagenbasierten Modellsystem die Anreicherung von Kollagen I und im fibrinbasierten Modellsystem die Ausschüttung proentzündlicher Zytokine insgesamt höher aus, jedoch stimmten interessanterweise die relativen Tendenzen zwischen beiden Modellsystemen überein und bestärkten deren Validität. Teilweise beschrieben die beobachteten Effekte ausschließlich Tendenzen, bildeten keine signifikanten Unterschiede ab und erschwerten daher die Interpretation des komplexen Datensatzes. Durch die Reduzierungstechnik der Hauptkomponentenanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass die Referenzmaterialien PTFE und Titan im entwickelten Modellsystem Effekte auslösten, die sich fibrotischen Mechanismen zuordnen ließen. Am Wichtigsten, die in der Literatur beschriebenen stärkeren profibrotischen Eigenschaften von PTFE im Vergleich zu Titan konnten im Modellsystem bestätigt werden.

Anwendungsbereich der entwickelten Fremdkörpermodelle

Vorteil der entwickelten direkten Fremdkörpermodelle ist, komplexe, dynamische Prozesse unter Echtzeitbedingungen zu erfassen. Möglicherweise können anschließende Studien das dynamische Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie die Wechselwirkung zwischen Zell- oder Matrixkomponenten sowie löslichen Mediatoren während den unterschiedlichen Wundheilungsphasen im Modellsystem entschlüsseln und somit zu einem besseren Verständnis der Fremdkörperreaktion beitragen. Insbesondere im Hinblick auf die Integration komplexer Funktionen gewinnt ebenfalls die funktionelle Charakterisierung von Medizinprodukten unter Echtzeitbedingungen an Bedeutung. In den entwickelten direkten Modellsystemen können beispielsweise dynamische Prozesse wie die Haltbarkeit, die Stabilität und der Abbau von Medizinprodukten sowie die Freisetzungskinetik von Medikamenten oder löslichen Materialbestandteilen untersucht werden.

Weiterentwicklung der dreidimensionalen Fremdkörpermodelle

Zusätzlich können die technischen Testbedingungen wie das Verhältnis zwischen der Testoberfläche zum Volumen des aufgebauten Gewebes, die eingesetzte Zellzahl, das aufgebrauchte Volumen des Kulturmediums oder die Kultivierungszeit optimiert werden und so eine Verstärkung der beobachteten Effekte bewirken sowie die Unterscheidungskapazität des Modellsystems erhöhen. Ergänzend sollte das dreidimensionale Fremdkörpermodell system funktionell erweitert werden. Unabhängig vom Gewebe, in welches das Implantat eingesetzt wird, führen alle chirurgischen Verfahren eine Blutung herbei und setzen die Biomaterialoberfläche dem direkten Kontakt mit der Blutflüssigkeit aus. Dies bestärkte die Anwendung von Blutkomponenten in den Testverfahren, jedoch können diese keine gewebspezifische Reaktion oder systemischen Effekte abbilden. Die Abhängigkeit der Fremdkörperreaktion vom Implantationsort verdeutlicht die Notwendigkeit, gewebspezifische Komponenten in zukünftige Testsysteme einzugliedern. Insbesondere die Durchblutung des Gewebes beeinflusst den Endpunkt einer Fremdkörperreaktion. Zum Beispiel führt die Implantation einer Kollagenmatrix in den stark durchbluteten Herzmuskel zu einem starken Abbau der ursprünglichen Matrixstruktur und zur Infiltrierung weiterer Zellen. Dagegen trägt der Einsatz der Kollagenmatrix unter die Haut zum Erhalt der ursprünglichen Matrixstruktur bei. (140) Im Gegensatz hierzu führt die Implantation eines Medizinprodukts in ein Gewebe ohne Gefäßversorgung wie dem Knorpel oder dem Knochen

oftmals zu einer besseren Integration des Fremdkörpers (220, 221). *In vitro* ist die Machbarkeit von dreidimensionalen Gewebemodellen mit Gefäßstrukturen bereits beschrieben (222, 223). Demnach könnte das entwickelte Fremdkörpermodell in nachfolgenden Studien durch ein Gefäßsystem ergänzt werden. Des Weiteren bildet das entwickelte Modellsystem statische Testbedingungen ab und simuliert keine systemischen Zirkulationseffekte. *Ex vivo* Flusskammern, die das Blut direkt von einem Organismus in eine Testkammer außerhalb des Körpers abzweigen, sind bereits zur Untersuchung der Mikrozirkulation etabliert (224). Außerdem konnten *in vitro* Flussreaktoren zur optimalen Besiedelung von Trägerstrukturen genutzt werden (225). In Zukunft könnten solche Flussreaktorsysteme angewandt werden, um nach Implantation eines Biomaterials in ein Testgewebe die Mikrozirkulation von Blutplasma sowie von Immunzellen nachzustellen. Zusätzlich ist die funktionelle Zusammensetzung des Gewebes und die Proliferationsfähigkeit der gewebständigen Zellen für den Ausgang einer Fremdkörperreaktion entscheidend (35). Zum Beispiel durchlaufen Epithelien wie die Haut oder der Darm kontinuierliche Regenerationszyklen. Andere Gewebe wie die Leber oder der Pankreas können durch eine Verletzung erneut zur Regeneration angeregt werden. Im Gegensatz zu diesen Geweben besitzen jedoch Nerven- oder Herzmuskelgewebe eine geringe regenerative Kapazität und neigen nach einer Verletzung zur Ausbildung von Bindegewebe. (57) Zusätzlich zur regenerativen Kapazität eines Organs wird die Regeneration eines Gewebes durch das Gleichgewicht zwischen den funktionellen Zellen eines Gewebes (Parenchym) und den Bindegewebszellen (Mesenchym) bestimmt. In anderen Arbeiten konnten bereits dreidimensionale *in vitro* Gewebemodelle für die Haut (1), den Darm (226), die Leber (227) und den Pankreas (228, 229) sowie das Nervengewebe (230, 231) und das Herzgewebe (232) beschrieben werden. Dies verdeutlicht, dass eine funktionelle Ausstattung des Fremdkörpermodells durch das Zusammenführen der unterschiedlichen Modellsysteme prinzipiell möglich ist. Des Weiteren beeinflusst der Verletzungsgrad und der damit einhergehende Erhalt der nativen Matrixstruktur die Regeneration des verletzten Gewebe mit funktionellem Gewebe (35). Zum Beispiel könnten native biologische Trägerstrukturen wie eine azelluläre Dünndarmmatrix nachfolgend verwendet werden, um die Regenerationskapazität des Modellsystems zu unterstützen (233). Darüber hinaus führen neben lokalen Faktoren des jeweiligen Gewebes systemische Veränderungen wie Stoffwechselerkrankungen, der individuelle Lebensstil sowie die medikamentöse Behandlung von Erkrankungen zur unterschiedlichen Reaktion von Patienten auf Biomaterialien (58-60).

Beispielsweise verdeutlichten Zeng *et al.* (2010) den Einfluss von Diabetes auf die kombinierte Kultivierung von Makrophagen mit Fibroblasten. In dem beschriebenen Modellsystem führte die Anwendung von Zellen, die aus diabetischen Tieren isoliert wurden im Vergleich zu Zellen aus gesunden Tieren zu einer Erhöhung des Entzündungsprofils. (215) Die in dieser Arbeit verwendeten Blutspenden lagen lediglich anonymisiert vor. Informationen über individuelle Einflussfaktoren ließen jedoch einen besseren Einblick in die oft sehr hohe Varianz zwischen den Spendern zu und würden eine Modellierung der Fremdkörperreaktion erleichtern.

Dies verdeutlicht, dass sich der biomimetische Modellansatz durch zahlreiche Weiterentwicklungen weiterhin optimieren lässt. Zusammenfassend konnte jedoch ein Modellsystem entwickelt werden, das durch die Kombination unterschiedlicher Matrixkomponenten die Mikroumgebung in einer Wunde biomimetisch nachbildet. Hierbei erleichterte die Untergliederung des Modellsystems eine Charakterisierung der einzelnen Zell- und Gewebekomponenten. Zusätzlich konnten auf molekularer Ebene Entzündungs- und Bindegewebsprozesse im Modellsystem analysiert werden. Die durchgeführte Hauptkomponentenanalyse verdeutlichte die Eignung der entwickelten Fremdkörpermodellsysteme zur Bewertung von Biomaterialien.

5. Schlussfolgerung

Alle *in vitro* Testsysteme stellen Modelle dar, die ein spezifisches Spektrum an Funktionen abdecken. Daher müssen die Testbedingungen eines Modellsystems mit Bedacht gewählt und an der spezifischen wissenschaftlichen Fragestellung orientiert werden. Die bisherige geringe Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Biomaterialstudien verdeutlichte die klare Notwendigkeit von verlässlichen *in vitro* Fremdkörpermodellensystemen sowie die Herausforderung, solche zu entwickeln (175). In dieser Arbeit konnten erfolgreich *in vitro* Modellsysteme etabliert werden, die sich zur Charakterisierung einer biomaterialinduzierten Immunreaktion eignen. Ergänzend zu bereits existierenden *in vivo* Modellen können diese prognostischen Modellansätze verwendet werden, um nach Russell und Burchs 3R-Aspekten die Belastung von Tieren zu reduzieren und vielversprechende Biomaterialkandidaten zu untersuchen (135, 176).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden wie sensitiv Teilprozesse, die den Endpunkt einer Fremdkörperreaktion beeinflussen, von den Biomaterialeigenschaften abhängig sind. Solche teilprozessorientierten *in vitro* Modellsysteme ermöglichen einerseits ein besseres Verständnis, verdeutlichen jedoch ebenfalls die Komplexität der Vorgänge während einer Fremdkörperreaktion. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Bewertung eines Biomaterials im Vergleich zu anderen Biomaterialien von den gewählten Testbedingungen abhängig ist. Am Wichtigsten, eine Korrelation zwischen *in vitro* Modellsystemen zur literaturbasierten Bewertung von Referenzmaterialien ist prinzipiell möglich, wenn die Testbedingungen geeignet gewählt werden und eine geeignete Modellierung der *in vitro* generierten Daten erfolgt. Die Auswahl entsprechender Testbedingungen ist für die erfolgreiche Eingliederung von *in vitro* Modellsystemen in mehrstufige Testverfahren notwendig und Voraussetzung für die Akzeptanz von *in vitro* Modellen als valide Testsysteme. Aus den gewonnenen Erkenntnissen konnte ein dreidimensionales Fremdkörpermodell abgeleitet werden, das den eintretenden Kontakt zu Blutplasmakomponenten sowie die biomimetische Mikroumgebung des umliegenden Bindegewebes nachstellt. Das entwickelte dreidimensionale Modellsystem wies eine hohe Unterscheidungskapazität zwischen Referenzbiomaterialien auf und eignet sich zur Charakterisierung der Entzündungsantwort sowie der Bindegewebsantwort auf einen Fremdkörper.

6. Literatur

1. Jannasch M, *et al.* (2015) Development and application of three dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Experimental parasitology* 150:22-30.
2. Jannasch M, *et al.* (2017) In vitro chemotaxis and tissue remodeling assays quantitatively characterize foreign body reaction. *ALTEX* 34(2):253-266.
3. Jannasch M, *et al.* (2017) A comparative multi-parametric in vitro model identifies the power of test conditions to predict the fibrotic tendency of a biomaterial. *Sci Rep* 7(1):1689.
4. Majeed A, He J, Jiao L, Zhong X, & Sheng Z (2015) Surface properties and biocompatibility of nanostructured TiO₂ film deposited by RF magnetron sputtering. *Nanoscale Research Letters* 10(1):56.
5. Myers D, *et al.* (2017) From in vitro to in vivo: the medical device testing paradigm shift. *ALTEX* 34(4):479-500.
6. Anonymous (2016) Top markets report medical devices. (International trade administration, US), pp 1-9.
7. Anonymous (2017) Global medical device industry snapshot -new era of healthcare transformation set to disrupt medical device industry. (Frost & Sullivan).
8. Homsy CA (1970) Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *Journal of biomedical materials research* 4(3):341-356.
9. Williams D (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29(20):2941-2953.
10. Altankov G & Groth T (1994) Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(9):732-737.
11. Wang Q, Xian W, Li S, Liu C, & Padua GW (2008) Topography and biocompatibility of patterned hydrophobic/hydrophilic zein layers. *Acta biomaterialia* 4(4):844-851.
12. Hezi-Yamit A, *et al.* (2009) Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: implication for DES polymer design. *Journal of biomedical materials research. Part A* 90(1):133-141.
13. Brodbeck WG, *et al.* (2002) Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(16):10287-10292.
14. Brodbeck WG, *et al.* (2002) Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine* 18(6):311-319.
15. Veisheh O, *et al.* (2015) Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat Mater* 14(6):643-651.
16. Madden LR, *et al.* (2010) Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34):15211-15216.
17. Bota PC, *et al.* (2010) Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro. *Journal of biomedical materials research. Part A* 95(2):649-657.

18. Refai AK, Textor M, Brunette DM, & Waterfield JD (2004) Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of biomedical materials research. Part A* 70(2):194-205.
19. Paul NE, *et al.* (2008) Topographical control of human macrophages by a regularly microstructured polyvinylidene fluoride surface. *Biomaterials* 29(30):4056-4064.
20. Wójciak-Stothard B, Curtis A, Monaghan W, Macdonald K, & Wilkinson C (1996) Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Experimental Cell Research* 223(2):426-435.
21. Ghanavati Z, Neisi N, Bayati V, & Makvandi M (2015) The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing. *Anat Cell Biol* 48(4):251-257.
22. Cao H, McHugh K, Chew SY, & Anderson JM (2010) The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *Journal of biomedical materials research. Part A* 93(3):1151-1159.
23. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, & Anseth KS (2014) Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater* 13(6):645-652.
24. Sohal HS, Clowry GJ, Jackson A, O'Neill A, & Baker SN (2016) Mechanical flexibility reduces the foreign body response to long-term implanted microelectrodes in rabbit cortex. *PLOS ONE* 11(10):e0165606.
25. Kloxin AM, Benton JA, & Anseth KS (2010) In situ elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype. *Biomaterials* 31(1):1-8.
26. Blakney AK, Swartzlander MD, & Bryant SJ (2012) The effects of substrate stiffness on the in vitro activation of macrophages and in vivo host response to poly(ethylene glycol)-based hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A* 100(6):1375-1386.
27. Chen Y, *et al.* (2017) Mechanical properties and biocompatibility of porous titanium scaffolds for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 75:169-174.
28. Dall'Oca C, *et al.* (2014) The biocompatibility of porous vs non-porous bone cements: a new methodological approach. *Eur J Histochem* 58(2):2255.
29. Zhao G, *et al.* (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of biomedical materials research. Part A* 74(1):49-58.
30. Klueh U, Frailey JT, Qiao Y, Antar O, & Kreutzer DL (2014) Cell based metabolic barriers to glucose diffusion: macrophages and continuous glucose monitoring. *Biomaterials* 35(10):3145-3153.
31. Klonoff DC (2007) The artificial pancreas: how sweet engineering will solve bitter problems. *J Diabetes Sci Technol* 1(1):72-81.
32. Rennert RC, *et al.* (2014) A histological and mechanical analysis of the cardiac lead-tissue interface: implications for lead extraction. *Acta biomaterialia* 10(5):2200-2208.
33. Newbold C, *et al.* (2010) Changes in biphasic electrode impedance with protein adsorption and cell growth. *J Neural Eng* 7(5):056011.
34. Siggelkow W, *et al.* (2003) Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. *Biomaterials* 24(6):1101-1109.
35. Anderson JM (2011) Biocompatibility and the relationship to standards: Meaning and scope of biomaterials testing. *Comprehensive biomaterials*, (Elsevier), Vol 4.
36. Ratner BD (2011) The biocompatibility manifesto: biocompatibility for the twenty-first century. *J Cardiovasc Transl Res* 4(5):523-527.
37. Thevenot P, Hu W, & Tang L (2008) Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem* 8(4):270-280.

38. Montanaro L, Campoccia D, & Arciola CR (2007) Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* 28(34):5155-5168.
39. Gorbet MB & Sefton MV (2004) Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 25(26):5681-5703.
40. Vroman L & Adams AL (1969) Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surface Science* 16:438-446.
41. Davenport A (2011) What are the anticoagulation options for intermittent hemodialysis? *Nature reviews. Nephrology* 7(9):499-508.
42. Palacio ML, Schricker SR, & Bhushan B (2011) Bioadhesion of various proteins on random, diblock and triblock copolymer surfaces and the effect of pH conditions. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 8(58):630-640.
43. Bryers JD, Giachelli CM, & Ratner BD (2012) Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. *Biotechnology and bioengineering* 109(8):1898-1911.
44. Witte MB & Barbul A (1997) General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 77(3):509-528.
45. Gasik M (2017) Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. *Sci Technol Adv Mater* 18(1):550-562.
46. Grainger DW (2013) All charged up about implanted biomaterials. *Nature biotechnology* 31(6):507-509.
47. Anderson JM, Rodriguez A, & Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20(2):86-100.
48. Vicente-Manzanares M & Sanchez-Madrid F (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4(2):110-122.
49. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2):199-210.
50. Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11(3):201-212.
51. Albini A, Adelmann-Grill BC, & Müller PK (1985) Fibroblast chemotaxis. *Collagen and Related Research* 5(3):283-296.
52. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, & Simon JC (2011) Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 32(28):6692-6709.
53. Henson PM (1971) The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. *The Journal of Immunology* 107(6):1547.
54. Kou PM & Babensee JE (2011) Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of biomedical materials research. Part A* 96(1):239-260.
55. Wolfram D, *et al.* (2008) Altered systemic serologic parameters in patients with silicone mammary implants. *Immunol Lett* 118(1):96-100.
56. Caldas IR, *et al.* (2008) Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 108(2-3):109-117.
57. Kotton DN & Morrissey EE (2014) Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 20(8):822-832.

58. Wood MR & Vermilyea SG (2004) A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* 92(5):447-462.
59. Porter JA & von Fraunhofer JA (2005) Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. *Gen Dent* 53(6):423-432.
60. Abullais S, AlQahtani N, Kudyar N, & Priyanka N (2016) Success of dental implants: Must-know prognostic factors. *Journal of Dental Implants* 6(1):44-48.
61. Kloc M (2017) *Macrophages origin, functions and biointervention* (Springer International Publishing).
62. Italiani P & Boraschi D (2014) From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology* 5:514.
63. Murray LA, et al. (2011) TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by serum amyloid P. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43(1):154-162.
64. Goren I, et al. (2009) A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol* 175(1):132-147.
65. van Loon SLM, Smits AIPM, Driessen-Mol A, Baaijens FPT, & Bouten CVC (2013) The immune response in in situ tissue engineering of aortic heart valves. *Calcific aortic valve disease*, ed Aikawa E (InTech), pp 207-245.
66. Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:13.
67. Kendall RT & Feghali-Bostwick CA (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in Pharmacology* 5:123.
68. Mosser DM & Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-969.
69. Gorbet MB & Sefton MV (2005) Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials* 26(34):6811-6817.
70. Kao WJ, McNally AK, Hiltner A, & Anderson JM (1995) Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo. *Journal of biomedical materials research* 29(10):1267-1275.
71. McNally AK & Anderson JM (2003) Foreign body-type multinucleated giant cell formation is potently induced by alpha-tocopherol and prevented by the diacylglycerol kinase inhibitor R59022. *Am J Pathol* 163(3):1147-1156.
72. Brodbeck WG & Anderson JM (2009) Giant cell formation and function. *Curr Opin Hematol* 16(1):53-57.
73. Barron L & Wynn TA (2011) Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(5):G723-728.
74. Gilbane AJ, Denton CP, & Holmes AM (2013) Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther* 15(3):215.
75. McKleroy W, Lee TH, & Atabai K (2013) Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304(11):L709-721.
76. Feghali CA & Wright TM (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2:12-26.

77. Sides CR & Stenken JA (2014) Microdialysis sampling techniques applied to studies of the foreign body reaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 57:74-86.
78. Scotton CJ & Chambers RC (2007) Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest* 132(4):1311-1321.
79. Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, & Hartung T (2009) Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX* 26(4):265-277.
80. Inoue H, *et al.* (2002) Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* 136(2):287-295.
81. Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, & Dinarello CA (1995) Cytokines in human renal interstitial fibrosis. Intrinsic interleukin-1 synthesis and IL-1-dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* 47(3):845-854.
82. Witowski J, *et al.* (2001) Synthesis of C-X-C and C-C Chemokines by human peritoneal fibroblasts. *The American Journal of Pathology* 158(4):1441-1450.
83. Chen B, Tsui S, & Smith TJ (2005) IL-1 β induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: Identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy. *The Journal of Immunology* 175(2):1310.
84. Postlethwaite AE, *et al.* (1988) Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* 106(2):311-318.
85. Kähäri V-M, Heino J, & Vuorio E (1987) Interleukin-1 increases collagen production and mRNA levels in cultured skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 929(2):142-147.
86. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, & Gauldie J (2001) Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107(12):1529-1536.
87. Gasse P, *et al.* (2007) IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117(12):3786-3799.
88. Piccioli P & Rubartelli A (2013) The secretion of IL-1beta and options for release. *Semin Immunol* 25(6):425-429.
89. Borthwick LA (2016) The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Semin Immunopathol* 38(4):517-534.
90. Fries KM, Felch ME, & Phipps RP (1994) Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subsets. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11(5):552-560.
91. Melendez GC, *et al.* (2010) Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 56(2):225-231.
92. Fielding CA, *et al.* (2014) Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity* 40(1):40-50.
93. Khan K, *et al.* (2012) Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 71(7):1235-1242.
94. Sripa B, *et al.* (2012) Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1654.

95. Mauviel A, *et al.* (1991) Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96(2):243-249.
96. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, & Reynolds JJ (1989) Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res* 24(3):207-213.
97. Kouba DJ, *et al.* (1999) Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 162(7):4226-4234.
98. Verrecchia F, Wagner EF, & Mauviel A (2002) Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF-kappaB pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF-alpha. *EMBO Rep* 3(11):1069-1074.
99. Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, & Mauviel A (2000) Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 275(39):30226-30231.
100. Piguet PF, Grau GE, & Vassalli P (1990) Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am J Pathol* 136(1):103-110.
101. Distler JH, Schett G, Gay S, & Distler O (2008) The controversial role of tumor necrosis factor alpha in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum* 58(8):2228-2235.
102. Denton CP, *et al.* (2009) An open-label pilot study of infliximab therapy in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 68(9):1433-1439.
103. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, & Strieter RM (1991) Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* 17(1):17-23.
104. Brennan S, Cooper D, & Sly PD (2001) Directed neutrophil migration to IL-8 is increased in cystic fibrosis: a study of the effect of erythromycin. *Thorax* 56(1):62-64.
105. Dunlevy JR & Couchman JR (1995) Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci* 108 (Pt 1):311-321.
106. Zimmermann HW, *et al.* (2011) Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* 6(6):e21381.
107. Sun L, *et al.* (2011) New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300(3):L341-353.
108. Sziksz E, *et al.* (2015) Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm* 2015:764641.
109. Verma SK, *et al.* (2012) Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kB. *Circulation* 126(4):418.
110. Jin Y, *et al.* (2013) Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 93(7):801-811.
111. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, & Shimizu RW (1992) Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(12):3292-3301.

112. Coker RK, *et al.* (1997) Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 150(3):981-991.
113. Lee CG, *et al.* (2004) Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 200(3):377-389.
114. Bonniaud P, *et al.* (2005) Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 171(8):889-898.
115. Fu R, *et al.* (2011) Targeting transforming growth factor betaRII expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 236(3):291-297.
116. Park S, *et al.* (2015) Acute suppression of TGF-ss with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 200:125-137.
117. Pohlers D, *et al.* (2009) TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et biophysica acta* 1792(8):746-756.
118. Shreiber DI, Enever PAJ, & Tranquillo RT (2001) Effects of PDGF-BB on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Experimental Cell Research* 266(1):155-166.
119. Heldin CH & Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79(4):1283-1316.
120. Chen SY, *et al.* (2015) Dependence of fibroblast infiltration in tumor stroma on type IV collagen-initiated integrin signal through induction of platelet-derived growth factor. *Biochimica et biophysica acta* 1853(5):929-939.
121. Seppa H, Grotendorst G, Seppa S, Schiffmann E, & Martin GR (1982) Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92(2):584-588.
122. Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, & Le Bourhis X (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 11(4):295-302.
123. Inoue Y, King TE, Jr., Tinkle SS, Dockstader K, & Newman LS (1996) Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. *Am J Pathol* 149(6):2037-2054.
124. Broughton G, Janis JE, & Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7):12-34.
125. Midwood KS, Williams LV, & Schwarzbauer JE (2004) Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(6):1031-1037.
126. Klinge U, *et al.* (2000) Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* 32(1):43-48.
127. Cheung DT, Benya PD, Perelman N, DiCesare PE, & Nimni ME (1990) A highly specific and quantitative method for determining type III/I collagen ratios in tissues. *Matrix* 10(3):164-171.
128. Haukipuro K, Melkko J, Risteli L, Kairaluoma M, & Risteli J (1991) Synthesis of type I collagen in healing wounds in humans. *Ann Surg* 213(1):75-80.
129. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, & Lane JM (1995) Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* (318):265-278.

130. Stuart K & Panitch A (2009) Characterization of gels composed of blends of collagen I, collagen III, and chondroitin sulfate. *Biomacromolecules* 10(1):25-31.
131. van Zuijlen PPM, *et al.* (2003) Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. *Burns* 29(5):423-431.
132. Volk SW, Wang Y, Mauldin EA, Liechty KW, & Adams SL (2011) Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs* 194(1):25-37.
133. Akilbekova D & Bratlie KM (2015) Quantitative characterization of collagen in the fibrotic capsule surrounding implanted polymeric microparticles through second harmonic generation imaging. *PLOS ONE* 10(6):e0130386.
134. ISO (2002) ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices - 4. Selection of tests for interactions with blood / 6. Tests for local effects after implantation.
135. Russell WB, R (1959) The principles of humane experimental technique. *Methuen & Co. Ltd.*
136. Deininger S, *et al.* (2008) Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity. *Immunobiology* 213(6):519-529.
137. Mazzotti F, *et al.* (2007) In vitro pyrogen test- A new test method for solid medical devices. *Journal of biomedical materials research. Part A* 80(2):276-282.
138. Werner L, Tetz M, Mentak K, Aldred M, & Zwisler W (2009) Detection of pyrogens adsorbed to intraocular lenses: evaluation of limulus amoebocyte lysate and in vitro pyrogen tests. *J Cataract Refract Surg* 35(7):1273-1280.
139. Soskolne WA, Cohen S, Sennerby L, Wennerberg A, & Shapira L (2002) The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2. *Clin Oral Implants Res* 13(1):86-93.
140. Luttikhuisen DT, *et al.* (2006) The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression. *Biomaterials* 27(34):5763-5770.
141. Caplan MR & Shah MM (2009) Translating biomaterial properties to intracellular signaling. *Cell Biochem Biophys* 54(1-3):1-10.
142. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, & Ottenhoff THM (2006) Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 79(2):285-293.
143. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, & Lecreur V (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology* 281(1):51-61.
144. Zengel P, *et al.* (2011) mu-slide chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol* 12:21.
145. Hill NA & Hader DP (1997) A biased random walk model for the trajectories of swimming micro-organisms. *J Theor Biol* 186(4):503-526.
146. Mardia KV (1972) *Statistics of Directional Data* (Academic Press).
147. Cholewinski E, Dietrich M, Flanagan TC, Schmitz-Rode T, & Jockenhoevel S (2009) Tranexamic acid- an alternative to aprotinin in fibrin-based cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15(11):3645-3653.
148. Vogel DY, *et al.* (2014) Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219(9)::695-703.

149. Ambarus CA, *et al.* (2012) Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of immunological methods* 375(1-2):196-206.
150. Spiller KL, *et al.* (2014) The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 35(15):4477-4488.
151. Ahad IU, *et al.* (2015) Extreme ultraviolet (EUV) surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) for control of biocompatibility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 364:98-107.
152. Cheesborough JE, Liu J, Hsu D, & Dumanian GA (2016) Prospective repair of ventral hernia working group type 3 and 4 abdominal wall defects with condensed polytetrafluoroethylene (MotifMESH) mesh. *The American Journal of Surgery* 211(1):1-10.
153. Möller B, *et al.* (2012) A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 41(5):638-645.
154. Souza JCM, *et al.* (2015) How do titanium and Ti6Al4V corrode in fluoridated medium as found in the oral cavity? An in vitro study. *Materials Science and Engineering: C* 47:384-393.
155. Mohammed MT, Khan ZA, & Siddiquee AN (2014) Surface modifications of titanium materials for developing corrosion behavior in human body environment: A review. *Procedia Materials Science* 6:1610-1618.
156. Ovari A, *et al.* (2014) Polydimethylsiloxane for injection laryngoplasty: two cases necessitating tracheotomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271(4):839-844.
157. Backovic A & Wolfram D (2007) Silicone mammary implants- can we turn back the time? *Exp Gerontol* 42(8):713-718.
158. Smith RA, Maghsoodpour A, & Hallab NJ (2010) In vivo response to cross-linked polyethylene and polycarbonate-urethane particles. *Journal of biomedical materials research. Part A* 93(1):227-234.
159. Kindsfater KA, *et al.* (2015) In vivo performance of moderately crosslinked, thermally treated polyethylene in a prospective randomized controlled primary total knee arthroplasty trial. *The Journal of Arthroplasty* 30(8):1333-1338.
160. Wellisz T (1993) Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesthetic Plast Surg* 17(4):339-344.
161. Deshpande S & Munoli A (2010) Long-term results of high-density porous polyethylene implants in facial skeletal augmentation: An Indian perspective. *Indian J Plast Surg* 43(1):34-39.
162. Suska F, Emanuelsson L, Johansson A, Tengvall P, & Thomsen P (2008) Fibrous capsule formation around titanium and copper. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 85A(4):888-896.
163. Ungersböck A, Perren SM, & Pohler O (1994) Comparison of the tissue reaction to implants made of a beta titanium alloy and pure titanium. Experimental study on rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(11):788-792.
164. Shannon C, Thull R, & von Recum A (1997) Types I and III collagen in the tissue capsules of titanium and stainless-steel implants. *Journal of biomedical materials research* 34(3):401-408.
165. Thomsen P, Bjursten LM, & Ericson LE (1986) Implants in the abdominal wall of the rat. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* 20(2):173-182.

166. von Recum AF, *et al.* (1978) Biocompatibility tests of components of an implantable cardiac assist device. *Journal of biomedical materials research* 12(5):743-765.
167. Batniji RK, *et al.* (2002) Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. *Archives of Facial Plastic Surgery* 4(2):111-113.
168. Ustundag E, Boyaci Z, Keskin G, Kaur A, & Ozkarakas H (2005) Soft tissue response of the larynx to silicone, Gore-Tex, and irradiated cartilage implants. *The Laryngoscope* 115(6):1009-1014.
169. Trumpy LG RB, Lyberg Z (1996) Soft tissue response to proplast-teflon and silicone in humans: Morphological and immunohistochemical observations. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 24:117.
170. Vasey FB, Zarabadi SA, Seleznick M, & Ricca L (2003) Where there's smoke there's fire: the silicone breast implant controversy continues to flicker: a new disease that needs to be defined. *J Rheumatol* 30(10):2092-2094.
171. Boyden S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115:453-466.
172. Grinnell F, Rocha LB, Iucu C, Rhee S, & Jiang H (2006) Nested collagen matrices: a new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. *Exp Cell Res* 312(1):86-94.
173. Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200(4):500-503.
174. Montesano R & Orci L (1988) Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(13):4894-4897.
175. Hulsart-Billstrom G, *et al.* (2016) A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur Cell Mater* 31:312-322.
176. McNally AK, Jones JA, Macewan SR, Colton E, & Anderson JM (2008) Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *Journal of biomedical materials research. Part A* 86(2):535-543.
177. El Kasmi KC & Stenmark KR (2015) Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Semin Immunol* 27(4):267-275.
178. Klopffleisch R (2016) Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – phenotypes, functions and markers. *Acta biomaterialia* 43:3-13.
179. Tang L, Wu Y, & Timmons RB (1998) Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *Journal of biomedical materials research* 42(1):156-163.
180. Jockenhoevel S & Flanagan TC (2011) Cardiovascular tissue engineering based on fibrin-gel-scaffolds. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*, ed Eberli D (InTech, Rijeka), pp 35-48.
181. Wirz S, *et al.* (2011) Influence of platelet-derived growth factor-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels. *Tissue Eng Part A* 17(13-14):1891-1899.
182. Dietrich M, *et al.* (2013) Fibrin-based tissue engineering: comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. *Tissue Eng Part C Methods* 19(3):216-226.
183. Ogston CM & Ogston D (1966) Plasma fibrinogen and plasminogen levels in health and in ischaemic heart disease. *J Clin Pathol* 19(4):352-356.

184. Zhu Y, *et al.* (2001) Fibroblasts and monocyte macrophages contract and degrade three-dimensional collagen gels in extended co-culture. *Respir Res* 2(5):295-299.
185. Parks AC, Sung K, & Wu BM (2014) A three-dimensional in vitro model to quantify inflammatory response to biomaterials. *Acta biomaterialia* 10(11):4742-4749.
186. Helmy A, Antoniadou CA, Guilfoyle MR, Carpenter KLH, & Hutchinson PJ (2012) Principal component analysis of the cytokine and chemokine response to human traumatic brain injury. *PLOS ONE* 7(6):e39677.
187. Bailey J, Thew M, & Balls M (2014) An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim* 42(3):181-199.
188. Patronek GJ & Rauch A (2007) Systematic review of comparative studies examining alternatives to the harmful use of animals in biomedical education. *J Am Vet Med Assoc* 230(1):37-43.
189. Seok J, *et al.* (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(9):3507-3512.
190. Haley PJ (2003) Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 188(1):49-71.
191. Haley PJ, Muggenburg BA, Weissman DN, & Bice DE (1991) Comparative morphology and morphometry of alveolar macrophages from six species. *Am J Anat* 191(4):401-407.
192. Davis MM (2008) A prescription for human immunology. *Immunity* 29(6):835-838.
193. Hayday AC & Peakman M (2008) The habitual, diverse and surmountable obstacles to human immunology research. *Nat Immunol* 9(6):575-580.
194. Schimmelpfeng J & Seidel A (1991) Cytotoxic effects of quartz and chrysotile asbestos: In vitro interspecies comparison with alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33(2):131-140.
195. Schlesinger RB, Fine JM, & Chen LC (1992) Interspecies differences in the phagocytic activity of pulmonary macrophages subjected to acidic challenge. *Fundam Appl Toxicol* 19(4):584-589.
196. Warheit DB & Hartsky MA (1993) Role of alveolar macrophage chemotaxis and phagocytosis in pulmonary clearance responses to inhaled particles: comparisons among rodent species. *Microsc Res Tech* 26(5):412-422.
197. Krombach F, *et al.* (1997) Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5:1261-1263.
198. Dorger M, Munzing S, Allmeling AM, & Krombach F (2000) Comparison of the phagocytic response of rat and hamster alveolar macrophages to man-made vitreous fibers in vitro. *Hum Exp Toxicol* 19(11):635-640.
199. Takahashi S, *et al.* (2011) Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407(4):656-662.
200. Albina JE, Caldwell MD, Henry WL, Jr., & Mills CD (1989) Regulation of macrophage functions by L-arginine. *J Exp Med* 169(3):1021-1029.
201. Mills CD (2001) Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 21(5):399-425.
202. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, & Munder M (2014) Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 5:532.

203. Recalcati S, Locati M, Gammella E, Invernizzi P, & Cairo G (2012) Iron levels in polarized macrophages: Regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 11(12):883-889.
204. Zhou G, Loppnow H, & Groth T (2015) A macrophage/fibroblast co-culture system using a cell migration chamber to study inflammatory effects of biomaterials. *Acta biomaterialia* 26:54-63.
205. Vogler EA (2012) Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* 33(5):1201-1237.
206. Tejero R, Anitua E, & Orive G (2014) Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. *Progress in Polymer Science* 39(7):1406-1447.
207. Damanik FF, Rothuizen TC, van Blitterswijk C, Rotmans JI, & Moroni L (2014) Towards an in vitro model mimicking the foreign body response: tailoring the surface properties of biomaterials to modulate extracellular matrix. *Sci Rep* 4:6325.
208. Schutte RJ, Xie L, Klitzman B, & Reichert WM (2009) In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. *Biomaterials* 30(2):160-168.
209. Zhuo R, Siedlecki CA, & Vogler EA (2006) Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* 27(24):4325-4332.
210. Balls M, *et al.* (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures in *The report and recommendations of ECVAM workshops*.
211. ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: A report of the ad hoc interagency coordinating committee on the validation of alternative methods. (National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, North Carolina).
212. Hartung T, *et al.* (2004) A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern Lab Anim* 32(5):467-472.
213. OECD (2005) Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. in *Environment, Health, Safety Publication Series on Testing and Assessment*, ed Amcoff P (Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris), p 96.
214. Wolf MT, Vodovotz Y, Tottey S, Brown BN, & Badylak SF (2015) Predicting in vivo responses to biomaterials via combined in vitro and in silico analysis. *Tissue Eng Part C Methods* 21(2):148-159.
215. Zeng Q & Chen W (2010) The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin-oxidized alginate hydrogel. *Biomaterials* 31(22):5772-5781.
216. Sanchez VC, Weston P, Yan A, Hurt RH, & Kane AB (2011) A 3-dimensional in vitro model of epithelioid granulomas induced by high aspect ratio nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 8:17.
217. Oshima K, Yoshihara K, Kojima T, Komatsu M, & Yamamoto N (2008) Concentration of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in bovine peripheral blood during pregnancy. *J Vet Med Sci* 70(8):799-805.
218. Shadle PJ, Allen JI, Geier MD, & Koths K (1989) Detection of endogenous macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in human blood. *Exp Hematol* 17(2):154-159.
219. Kofoed K, Schneider UV, Scheel T, Andersen O, & Eugen-Olsen J (2006) Development and validation of a multiplex add-on assay for sepsis biomarkers using xMAP technology. *Clin Chem* 52(7):1284-1293.

220. Trattnig S, *et al.* (2007) Three-dimensional delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) for in vivo evaluation of reparative cartilage after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation at 3.0T: Preliminary results. *J Magn Reson Imaging* 26(4):974-982.
221. Rigo ECS, *et al.* (2004) Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering: C* 24(5):647-651.
222. Kim JJ, Hou L, & Huang NF (2016) Vascularization of three-dimensional engineered tissues for regenerative medicine applications. *Acta biomaterialia* 41:17-26.
223. Mertsching H, *et al.* (2009) Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation* 88(2):203-210.
224. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, & Cornelissen C (2004) A novel mouse-driven ex vivo flow chamber for the study of leukocyte and platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4):C876-892.
225. Kleinhans C, *et al.* (2015) A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects. *Biotechnol J* 10(11):1727-1738.
226. Schweinlin M, *et al.* (2016) Development of an advanced primary human in vitro model of the small intestine. *Tissue Eng Part C Methods* 22(9):873-883.
227. Ramachandran SD, *et al.* (2015) In vitro generation of functional liver organoid-like structures using adult human cells. *PLoS One* 10(10):e0139345.
228. Greggio C, *et al.* (2013) Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development in vitro. *Development* 140(21):4452-4462.
229. Greggio C, De Franceschi F, & Grapin-Botton A (2015) Concise reviews: In vitro-produced pancreas organogenesis models in three dimensions: self-organization from few stem cells or progenitors. *Stem Cells* 33(1):8-14.
230. Aday S, Cecchelli R, Hallier-Vanuxeem D, Dehouck MP, & Ferreira L (2016) Stem cell-based human blood brain barrier models for drug discovery and delivery. *Trends in Biotechnology* 34(5):382-393.
231. Appelt-Menzel A, *et al.* (2017) Establishment of a human blood-brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells. *Stem Cell Reports* 8(4):894-906.
232. Schürlein S, *et al.* (2017) Generation of a human cardiac patch based on a reendothelialized biological scaffold (BioVaSc). *Advanced Biosystems* 1(3):1-7.
233. Pusch J, *et al.* (2011) The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine. *Biomaterials* 32(30):7469-7478.

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Maren Annika Jannasch
wohnhaft am Kardinal-Döpfner-Platz 1 in Würzburg
geboren am 17. September 1988 in Filderstadt
deutsch

Akademischer Bildungsweg

- | | |
|-------------|---|
| ab 11 /2013 | Doktorarbeit am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg |
| 2012 - 2013 | Masterarbeit in der Abteilung Zellsysteme am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart |
| 2011 - 2013 | Aufbaustudium (M.Sc.) in Molekularer Ernährungswissenschaft an der Universität Stuttgart Hohenheim |
| 2008 - 2011 | Grundstudium (B.Sc.) in Ernährungswissenschaften an der Universität Stuttgart Hohenheim |
| 1999 - 2008 | Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium in Neckartenzlingen |

Berufserfahrung

- | | |
|------------|---|
| 2014 /2016 | Mitarbeit bei der Vorlesung „Mikrosysteme für biologische und medizinische Anwendungen“ im Studiengang „Technologie der Funktionswerkstoffe“ an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg |
|------------|---|

- 10 /2015 Vorstellung eines Posters zum Thema “Development of an *in vitro* encapsulation model to evaluate immune reactions to biomaterials” auf der ESF-Konferenz in Pultusk (Polen)
- 06 /2015 Wissenschaftlicher Vortrag zum Thema “Three-dimensional skin equivalents to investigate helminth invasion” auf der WITE-Konferenz in Würzburg
- 03 /2015 Postervorstellung zum Thema “Three-dimensional skin equivalents for investigations on percutaneous helminth invasion” auf dem Forum Life Science in München
- 01 /2015 Wissenschaftliche Kooperation mit dem Blutzentrum New York zum Transfer von Technologien zur Entwicklung von Hautgewebe
- 04 /2011 - Tutor im Fachbereich Immunologie an der Universität Stuttgart
08 /2012 Hohenheim

Weitere Kompetenzen

Sprachen Englisch fließend in Wort und Schrift, Französisch Grundkenntnisse

Würzburg, 22.01.2018

7.2 Verwendung veröffentlichter wissenschaftlicher Inhalte

Teile dieser Dissertation liegen in den folgenden Fachartikeln veröffentlicht vor:

Jannasch M, et al. (2017) *In vitro* chemotaxis and tissue remodeling assays quantitatively characterize foreign body reaction. ALTEX. (2)

Jannasch M, et al. (2017) A comparative multi-parametric *in vitro* model identifies the power of test conditions to predict the fibrotic tendency of a biomaterial. Scientific Reports. (3)

Die Lizenzvereinbarung „Creative Commons Attribution 4.0 International“ (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) ermöglicht die Verwendung, die Adaption, die Verteilung und die Reproduktion der veröffentlichten Arbeit in jeglicher Form und in jeglichem Format. Die Inhalte dieser Publikationen sind in der vorliegenden Dissertation in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 3.1, 3.2, 3.3 und 3.4 eingliedert. Zur Nachvollziehbarkeit vorgenommener Veränderungen sind die Originalarbeiten in diesem Kapitel beigefügt.



Research Article

In Vitro Chemotaxis and Tissue Remodeling Assays Quantitatively Characterize Foreign Body Reaction

Maren Jannasch^{#1}, Tobias Weigel^{#1}, Lisa Engelhardt¹, Judith Wiezoreck¹, Sabine Gaetzner¹, Heike Walles^{1,2}, Tobias Schmitz¹ and Jan Hansmann^{1,2}

¹University Hospital Wuerzburg, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERM), Wuerzburg, Germany;

²Translational Center Wuerzburg "Regenerative Therapies in Oncology and Musculoskeletal Disease" Wuerzburg branch of the Fraunhofer Institut Interfacial Engineering and Biotechnology, Wuerzburg, Germany

Summary

Surgical implantation of a biomaterial triggers foreign-body-induced fibrous encapsulation. Two major mechanisms of this complex physiological process are (I) chemotaxis of fibroblasts from surrounding tissue to the implant region, followed by (II) tissue remodeling. As an alternative to animal studies, we here propose a process-aligned *in vitro* test platform to investigate the material dependency of fibroblast chemotaxis and tissue remodeling mediated by material-resident macrophages.

Embedded in a biomimetic three-dimensional collagen hydrogel, chemotaxis of fibroblasts in the direction of macrophage-material-conditioned cell culture supernatant was analyzed by live cell imaging. A combination of statistical analysis with a complementary parameterized random walk model allowed quantitative and qualitative characterization of the cellular walk process. We thereby identified an increasing macrophage-mediated chemotactic potential ranking of biomaterials from glass over polytetrafluorethylene to titanium. To address long-term effects of bio-material-resident macrophages on fibroblasts in a three-dimensional microenvironment, we further studied tissue remodeling by applying macrophage-material-conditioned medium on fibrous *in vitro* tissue models. A high correlation of the *in vitro* tissue model to state of the art *in vivo* study data was found. Titanium exhibited a significantly lower tissue remodeling capacity compared to polytetrafluorethylene. With this approach, we identified a material dependency of both chemotaxis and tissue remodeling processes, strengthening knowledge on their specific contribution to the foreign body reaction.

Keywords: foreign body reaction, fibroblast chemotaxis, tissue remodeling, *in vitro*, quantitative characterization

1 Introduction

Tissue injury caused by the surgical implantation of a medical device triggers the release of alarm signals into the extracellular space. These signals stimulate migration of immune cells from the vasculature to the implant region. In a first line of defense, secretory cells like granulocytes and pro-inflammatory M1 macrophages structurally attack the implant surface in an acute

inflammatory response by secretion of enzymes and reactive oxygen species. Due to the implant's size and its non-degradable nature, M1 macrophages fail to clear the foreign body by phagocytosis. A transition of short-lived inflammatory cells to a long-vitae M2 macrophage phenotype, which mediates the chronic inflammatory response to biomaterials, is observed (van Loon et al., 2013; Murray et al., 2010). M2 macrophages fuse to form a first cellular layer and isolate the foreign body

authors contributed equally

Abbreviations

3D, three-dimensional; CM, cyan mean intensity; FBR, foreign body reaction; FCS, fetal calf serum; FGF, fibroblast growth factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; PDGF, platelet-derived growth factor; PTFE, polytetrafluorethylene; g₀, standard gravity; TGF-β1, transforming growth factor β1

Received July 21, 2016;
Accepted October 7, 2016;
Epub October 11, 2016
<https://doi.org/10.14573/altex.1610071>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is appropriately cited.



from the host tissue. These long-term biomaterial-resident M2 macrophages chronically stimulate the surrounding tissue to form a dense collagenous fibrous capsule, which further isolates the foreign body (Grainger, 2013). The chronic deposition of fibrous tissue in the proximity of the foreign body is determined by (I) fibroblast accumulation either by proliferation or chemotaxis from surrounding tissue as well as (II) fibroblast-mediated increased soft tissue synthesis.

Chemotaxis of fibroblasts to the implant region is mediated by inflammation induced by surgical injury and the foreign body itself. The injury-guided chemotaxis mostly originates

from intracellular metabolites and proteins liberated into the intercellular space, or cleavage products of extracellular matrix proteins such as collagen, fibronectin or elastin (Albini et al., 1985; Franz et al., 2011). In contrast to these randomly released proteins, foreign-body-induced cytokine release by macrophages exhibits a material-dependent character (Rodriguez et al., 2009). Platelet-derived growth factor (PDGF) (Shreiber et al., 2001; Heldin and Westermark, 1999; Chen et al., 2015; Seppa et al., 1982), fibroblast growth factor (FGF) (Boilly et al., 2000; Grant et al., 1992) as well as transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (Grant et al., 1992) are prominent

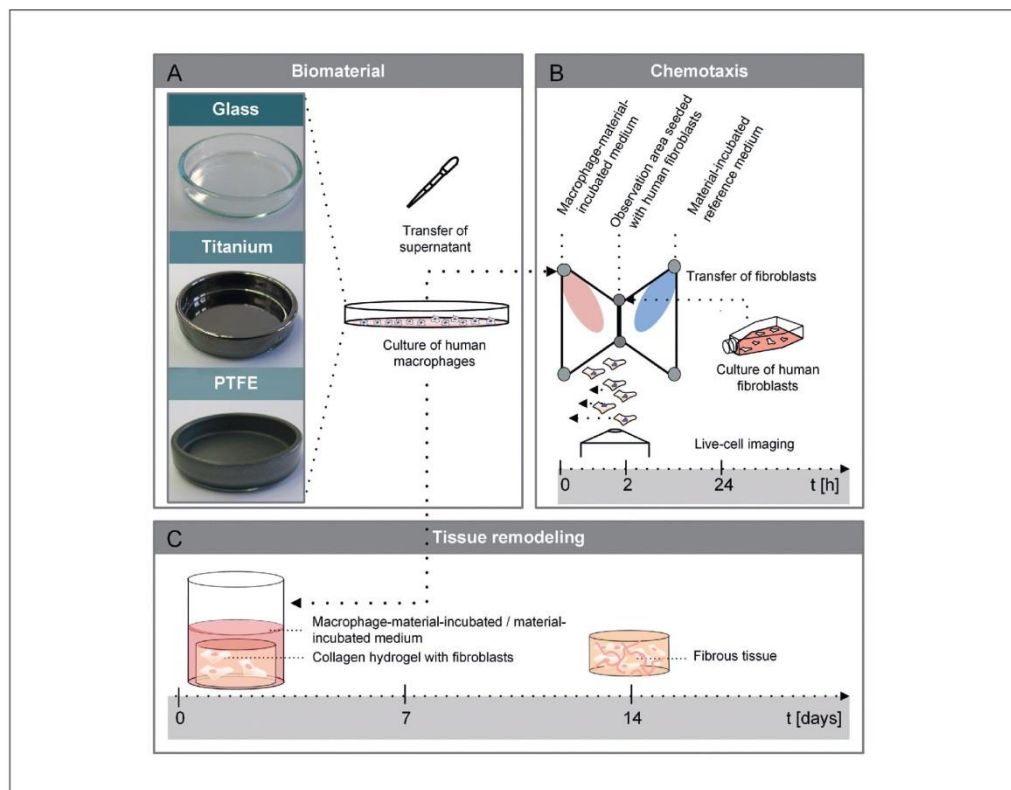


Fig. 1: *In vitro* test platform for evaluating biomaterial-induced fibroblast chemotaxis and tissue remodeling

(A) Human primary M2 macrophages are cultured for 48 h on soda-lime glass, titanium- and PTFE-coated dishes. In response to the biomaterial surface, macrophages are activated to release cytokines into the medium. (B) Two-chamber-based chemotaxis μ -Slides (Ibidi, Martinsried, Germany) allow determination of fibroblast chemotaxis in the direction of macrophage-material-conditioned medium in comparison to material-conditioned control medium. To observe migration along chemokine gradients, fibroblasts in a collagen hydrogel are introduced into the central observation channel. Time-lapse recordings are taken over a period of 48 h in a confocal live cell imaging microscope. Alongside chemotactic effects, macrophage-liberated cytokines elicit long-range chronic activity changes in cells. (C) Fibroblasts' tendencies to tissue remodeling are evaluated over a 14-day period. Here, human dermal fibroblasts in a three-dimensional (3D) collagen hydrogel are cultured under macrophage-material-conditioned medium. Biomaterial-conditioned medium serves as control medium.



chemokines secreted by macrophages, inducing chemotactic migration of fibroblasts. Ongoing over weeks, fibroblasts in the proximity of the implant encapsulate the foreign body in a chronic matrix remodeling process. Connective tissue remodeling is a balanced process in between fibroblasts' extracellular matrix synthesis and matrix-metalloproteinase-catalyzed matrix degradation (Barron and Wynn, 2011). A key mediator function of TGF- β that shifts this balance towards a higher collagen deposition (Coker et al., 1997) is demonstrated in foreign-body-induced fibrosis (Park et al., 2015) as well as other chronic inflammatory processes like rheumatoid arthritis, intestinal inflammation, diabetic nephropathy or liver fibrosis (Pohlers et al., 2009).

Currently, *in vivo* animal studies represent the gold standard for the assessment of material-induced fibrosis (ISO 10993-6:2007, Part 6; www.iso.org). In contrast to long-term *in vivo* studies, *in vitro* tests facilitate short-term screening for acute effects of blood-material interaction such as coagulation, complement activation or blood cell adhesion (ISO 10993-4:2002, Part 4; www.iso.org). While these models are undoubtedly useful, the specific contribution of chemotaxis and tissue remodeling to the end point of material-induced fibrosis has still not been fully resolved. The identification of sub-processes with a strong material-dependency might facilitate the evaluation and discrimination of biomaterials. Conversely, alignment on sub-processes enables a target mechanism orientated development of materials.

Our experimental approach addresses the processes of (A) acute fibroblast chemotaxis and (B) chronic tissue remodeling to predict macrophage-mediated effects of biomaterials (Fig. 1). To prove the material-dependency of these processes, a standard cell culture glass and two biomaterials, polytetrafluorethylene (PTFE) and titanium, were used. These two biomaterials have a broad range of applications in regenerative medicine: PTFE polymers are used for vascular prosthesis, nerve conduits, or subcutaneous augmentation material (Ahad et al., 2015; Cheesborough et al., 2016), whereas titanium is preferably used in dental and bone replacement (Möller et al., 2012; Souza et al., 2015; Mohammed et al., 2014). In addition to the clinical relevance, the chosen materials exhibit different chemical properties, e.g., distinct water surface interaction from hydrophobic to hydrophilic material characteristics, demonstrated by decreasing water contact angles from $127.1^\circ \pm 2.8^\circ$ for PTFE, to $55.0^\circ \pm 3.3^\circ$ for titanium, down to $28.8^\circ \pm 2.7^\circ$ for glass. Due to the importance of M2 macrophages in the long-term chronic response, a M2-like macrophage phenotype was induced prior to culturing on biomaterial surfaces. To gain a mechanistic understanding of the material-dependency of chemotaxis and tissue remodeling, we examined adsorption and release of the growth factors PDGF, FGF and TGF- β 1 into the cell culture supernatant. Material-dependency of chemotaxis was investigated *in vitro* on a micro device consisting of two fluidic reservoirs separated by a central collagen hydrogel channel, which serves as a physiological three-dimensional (3D) scaffold for fibroblasts. The two-chamber design allowed a controlled experimental comparison of (I) macrophage-material-conditioned medium to (II) a standard control medium conditioned with the

respective material. By this balanced experimental approach, a prediction of the influence of macrophage-substrate interaction was enabled, and the protein-material adsorption effect was compensated. Statistical analysis in combination with a complementary parameterized random walk model allowed a detailed characterization of fibroblast chemotaxis. To correlate material dependency obtained in chemotaxis, a long-term *in vitro* tissue model consisting of collagen hydrogels with fibroblasts cultured under macrophage-material-conditioned medium, was complemented in our evaluation. These *in vitro* assays render an alternative to animal testing, which bears potential to advance the 3Rs principle by reduction of animal testing in biomaterial research.

2 Methods

Ethical clearance statement

Primary cells were isolated from foreskin biopsies and peripheral blood under informed consent according to ethical approval granted by the institutional ethics committee of the Julius-Maximilians-University Wuerzburg (vote 182/10). Furthermore, procedures were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

Isolation of human dermal fibroblasts

Primary human dermal fibroblasts were isolated from human foreskin biopsies (male healthy donor, 4 years old) according to previously published protocols (Pudlas et al., 2011). DMEM (Gibco, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco) was used to culture fibroblasts. Medium was exchanged every 2 to 3 days. Before setup of a hydrogel or a chemotaxis experiment, fibroblasts were expanded to third passage. To extract the impact of the macrophages, all experiments were performed with one fibroblast donor and the experimental range was expanded by the use of five different macrophage donors.

Isolation and differentiation of human monocytes to macrophages

Mononuclear cells from peripheral blood (anonymized donors, University Hospital Wuerzburg, Germany) were isolated by Ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare, Freiburg, Germany). To separate the monocytes from the generated cell fraction, a negative magnetic cell separation was performed by indirectly labeling T cells, NK cells, B cells, dendritic cells, and basophils (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Obtained monocytes (purity of $90 \pm 4\%$) were cultured in RPMI GlutaMax (Gibco) plus 10% FCS at a concentration of 1×10^6 cells per ml and a density of 1.5×10^5 cells/cm² on standard polystyrol cell culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland). Cells were differentiated using 40 ng/ml recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, Preprotech, New Jersey, United States) for six days (Verreck et al., 2006; Jaguin et al., 2013). Medium was refreshed on the third day. On day six, cells were harvested by PBS plus EDTA incubation on ice for 10 min and followed by mechanical cell



scrapping. Before seeding macrophages on test materials, expression of clusters of differentiation was characterized by flow cytometry. The expression profile was evaluated by antibody staining of 2×10^5 macrophages per antigen. CD14 (555-397, BD Bioscience, Heidelberg, Germany), CD68 (11-0689-42, eBioscience, Frankfurt am Main, Germany), CD163 (12-1639-42, eBioscience), and CD206 (12-2069-42, eBioscience) were used as positive markers for macrophages. Negative markers CD80 (12-1639-42, eBioscience) and CD197 (130-093-621, Miltenyi Biotec), typically expressed by M1 macrophages, were used to guarantee differentiation towards the M2 phenotype. Antibodies were incubated for 30 min at 4°C under light-protection. Isotype controls were used in corresponding concentrations as recommended by the manufacturer. Samples were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and data was further processed in FlowJo software (Tree Star, Ashland, USA).

Preparation of test materials

Titanium films were deposited on glass bowls (30 mm diameter, Brandt, Wertheim, Germany) by radio frequency magnetron sputtering using a titanium target (120 mm diameter, 10 mm height) with a target-to-substrate distance of 100 mm. Glass bowls were cleaned subsequently in ultrasonic baths comprising acetone, isopropanol and ultrapure water, each step taking 10 min, and finally dried by means of nitrogen gas. After evacuation of the process chamber to a base pressure below 1×10^{-6} mbar, the sputtering power during deposition was set to 300 W using argon as process gas at a pressure of 3.4×10^{-3} mbar with a deposition time of 80 min. PTFE layers (Rhenolase MK I-grau) were prepared by Rhenotherm Kunststoffbeschichtungs GmbH (Kempen, Germany). Prior to a cell test, glass bowls as well as titanium- and PTFE-coated bowls were incubated in an ultrasonic bath with deionized water for 30 min. After a subsequent incubation in 70% ethanol for 15 min, the samples were autoclaved.

Macrophage incubation on material surface and generation of conditioned supernatant

Macrophages were seeded on titanium, glass and PTFE surfaces at a cell density of 3×10^4 cells per cm^2 at a total medium volume to surface ratio of 0.22 ml per cm^2 in RPMI GlutaMax (Gibco) supplemented with 10% FCS. For comparison of macrophage-biomaterial and medium-biomaterial mediated effects, cell-free RPMI GlutaMax medium supplemented with 10% FCS also was incubated on the material surfaces. All samples were incubated for 48 h at 37°C and 5% CO_2 . Medium was harvested after 48 h and centrifuged at $1 \times 10^4 \times g_0$ for 5 min to remove any cell fragments. Until use for experiments, supernatants were stored at -20°C. Morphology of macrophages on biomaterial surfaces was demonstrated by immunohistological staining with anti-ICAM-1 antibody (AH55411, Invitrogen, Carlsbad, USA) and mounted in Fluoromount plus Dapi (eBioscience).

Cytokine measurement

The secretion of human TGF- β 1 (BMS249, eBioscience), FGF (900-K08 Peprotech), and PDGF (900-K04, Peprotech) by mac-

rophages was analyzed according to the manufacturer's protocol by ELISA assays. Each sample was measured in duplicate employing a microplate reader (Tecan Reader infinite® M200, Tecan, Crailsheim, Germany).

Preparation of migration experiment and live cell imaging

Migration experiments were performed according to a previously published protocol (Zengel et al., 2011). In brief, 3 mg/ml rat tail collagen type I (manufactured in-house) in 0.1% acetic acid was equally mixed with neutralization solution, consisting of 20% 10x MEM (Gibco), 150 mM Hepes buffer in water, and adjusted with 1 M NaOH to a final pH of 8.3. Following this, 6×10^6 fibroblasts per ml DMEM high glucose supplemented with 30% FCS were resuspended in neutralized collagen gel solution in a ratio of one part cell solution to two parts collagen gel. All steps were performed on ice to prevent gelation. The final collagen gel, containing 2×10^6 fibroblasts in 1x MEM/DMEM medium supplemented with 10% FCS, was filled into the observation channel of a 3D chemotaxis μ -Slide (Ibidi GmbH, Martinsried, Germany). Following gelation for 30 min at 37°C, reservoirs were filled with MEM and DMEM in a 2:1 ratio, comparable to the collagen gel. Each medium was supplemented with 10% FCS. To study chemotaxis, 50% of the medium reservoir was replaced either with (I) chemoattractant TGF- β 1 at a final concentration of 12.5 pg/ml as positive control, or (II) macrophage-substrate-conditioned medium. To test for material-medium interactions, the second reservoir was filled with medium conditioned with material in the absence of macrophages. Fibroblast migration was monitored by live cell imaging at 37°C and 5% CO_2 using a confocal laser scanning microscope (TCS SP8, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). Images were taken in intervals of 15 min over 48 h.

Trajectory tracking and trajectory discretization

The motion of a cell in a complex microenvironment between initial and final position can be described as a random walk (Kahlig et al., 2013). Hereby, a distinct migration trajectory is specified by a set of n vectors $\{\vec{x}_i\}_{i=1}^n$ from the origin to a certain cell position \vec{x}_i . Segments defined as straight connections between two consecutive coordinates represent incremental displacements. From each microscopically recorded experiment, trajectories ($n = 20$) were derived employing the manual tracking plugin of ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, US). Trajectories were stored in text files. The Chemotaxis and Migration Tool (Ibidi) allowed plotting of trajectories.

Calculation of migration velocity and directness, forward migration index and circular statistics

To calculate the migration parameters, trajectory data was imported into MATLAB (The MathWorks GmbH, Ismaning, Germany) and cell positions were transferred to a matrix composed of columns, each representing a trajectory. From this matrix, the dimensionless directness DI can be derived as a measure for a cell's probability to walk in a straight line (Zengel et al., 2011). The Euclidian distance d_E (in μm) and accumulated distance d_A (in μm) of a trajectory are required to determine DI . The d_E



represents the distance between end (\vec{x}_n) and start point (\vec{x}_1) of a trajectory, whereas the d_A approximates the path integral by

$$d_A = \sum_{i=2}^n |\vec{x}_i - \vec{x}_{i-1}|$$

Hereby, $|\cdot|$ denotes the vector norm. The directness DI can be calculated according to

$$DI = \frac{d_E}{d_A}$$

Values for DI close to one indicate straight migration. In addition to directness, the efficiency of forward migration in a certain direction represented by a unit vector \vec{v} can be characterized by the dimensionless forward migration index $FMI_{\vec{v}}$ that reads

$$FMI_{\vec{v}} = \frac{\langle \vec{v}, \vec{x}_n - \vec{x}_1 \rangle}{d_A}$$

whereby $\langle \cdot, \cdot \rangle$ is the scalar product.

When supposing that the speed of a migrating cell is independent of migration orientation and only considering the direction of motion in a plane, the travel can be thought of as a random walk on the unit circle specified by a set of $n-1$ angles $\{\alpha_i\}_{i=1}^{n-1}$. The turning angle $\Delta\alpha$ was calculated from a matrix composed of columns representing trajectories of a live cell imaging experiment. If a preferred direction of travel is found, the random walk is biased. Circular statistics support analysis of a random walk, e.g., by identification of the angular variance (Hill and Häder, 1997). The circular mean $\bar{\alpha}$ and the dimensionless mean length R are derived from

$$R \cos(\bar{\alpha}) = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{\cos(\alpha_i)}{n-1}, R \sin(\bar{\alpha}) = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{\sin(\alpha_i)}{n-1}$$

When R tends to one, the angle distribution is sharply peaked, whereas an almost uniform angle distribution is found for R close to zero (Mardia, 1972).

Demonstration of Markow property and estimation of the Kramers-Moyal coefficients

The directness DI , the forward migration index $FMI_{\vec{v}}$, the circular mean $\bar{\alpha}$, and the dimensionless mean length R provide statistical characteristics of cell migration. However, they do not provide insight into migration dynamics. Such information can be generated by using a continuous model of cell migration that is parameterized based on experimental data. A basis for a continuous random walk model for the traveling orientation $a(t)$ is constituted by the Fokker-Planck equation

$$\frac{\partial}{\partial t} P(\alpha, t) = \left(-\frac{\partial}{\partial \alpha} D_1(\alpha, t) + \frac{\partial^2}{\partial \alpha^2} D_2(\alpha, t) \right) P(\alpha, t)$$

which has been used previously to investigate moving microorganisms and endothelial cells (Hill and Häder, 1997; Kahlig et al., 2013). A prerequisite for the application of the Fokker-Planck equation is the demonstration that the studied system is memory-free and represents a Markow process (Risken, 2012), which can be achieved using the Chapman-Kolmogorov equation and

X²-statistics (Friedrich et al., 2000). Markow property was verified by X²-statistics for different time steps Δt . Therefore, the conditional probability density $P(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t)$ for the turning angle $\Delta\alpha$ was calculated and continuity properties were ensured. The conditional probability density was processed using a moving average. Two consecutive positions of a defined time difference Δt were identified and, based on the resulting difference vector, the probability for a distinct turning angle $\Delta\alpha$ was derived along the trajectories. Hereby, Δt was a multiple integer of the sampling rate. The numerical evaluation of

$$\chi^2 = \int_{\Omega} \int_{\Omega} \frac{(P(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t) - \bar{P}(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t))^2}{P(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t) + \bar{P}(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t)} d\alpha d\Delta\alpha$$

allowed identifying a suitable time step for which the Markow assumption held. Markow property was assumed for a significance level exhibiting a probability of 95%.

In the Fokker-Planck equation, the so called Kramers-Moyal coefficients $D_1(\alpha, t)$ and $D_2(\alpha, t)$ describe drift (D_1) and diffusion (D_2) of the probability distribution. When supposing a small constant time shift Δt between all changes in orientation, migration direction is either changed by a small angle $\Delta\alpha(t)$ or remains. From the conditional probability density $P(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t)$ of distinct time steps, the Kramers-Moyal coefficients can be calculated by

$$D_n(\alpha, t) = \frac{1}{n!} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int_{\Omega} \Delta\alpha^n P(\alpha + \Delta\alpha, t + \Delta t | \alpha, t) d\Delta\alpha$$

to parameterize the respective random walk model (van Mourik et al., 2006). The parameterized model allows analyzing system dynamics and identification of migration stability and robustness.

Macrophage-conditioned culture of human dermal fibroblasts in a collagen hydrogel

Long-term effects of macrophage-conditioned medium on fibroblasts in a collagen hydrogel were studied to assess tissue remodeling. Fibroblasts were suspended in 500 μ l rat tail collagen type I hydrogel (manufactured in-house) at a final concentration of $2 \cdot 10^5$ cells per ml. Following gelation for 30 min at 37°C, hydrogels were overlaid with 250 μ l medium: (I) 1 ng/ml TGF β 1-enriched (Peprotech) medium, or (II) standard DMEM high glucose medium supplemented with 10% FCS, or (III) 30% macrophage-material-conditioned medium, or (IV) 30% cell-free material-conditioned medium. All medium approaches were supplemented with 100 μ M ascorbic acid phosphate (Wako, Neuss, Germany) to support collagen synthesis. Experiments were performed in triplicate for each macrophage donor. Medium was exchanged every second to third day. On day 14, wet weight was measured and samples were fixed in 4% paraformaldehyde over night at 4°C followed by paraffin embedding. Tissue sections of 5 μ m thickness were stained for connective tissue with Azan staining according to the manufacturer's protocol (Morphisto, Frankfurt, Germany).

Image analysis

Images of tissue sections were taken with fluorescence microscope BZ-9000 (Keyence, Neu-Isenburg, Germany). Further



analysis was performed using ImageJ software. Background subtraction was equally performed on all images, using the rolling ball method with a diameter of 3000 pixels. Azan staining allowed a qualitative evaluation of collagen tissue remodeling of histological images. To quantify tissue remodeling, the cyan mean intensity (CMI) was analyzed. Histological images were decomposed to CMYK-images to evaluate the CMI value. Following this, cyan channel images were converted to 8-bit. Histograms enabled the read-out of the CMI for Azan-stained histological sections.

Statistical analysis

Continuous donor-dependent data was analyzed for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. If normal distribution was confirmed, statistical differences were analyzed using one-way repeated measures ANOVA, followed by a post-hoc Fisher's least significant difference test. For not normally distributed data, Friedman's ANOVA was applied, followed by the Wilcoxon signed rank test to test pair-wise on significant differences. For all statistical tests $p \leq 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Characterization of pre-differentiated macrophages

The choice of maturation factors, i.e., granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) for macrophage differentiation determines the state of pro- or anti-inflammation of the mature macrophages generated (Vogel et al., 2014). In this study, differentiation to a moderate anti-inflammatory M2 macrophage subtype involved in long-term chronic tissue-remodeling and fibrosis was preferred (Franz et al., 2011). Thus, monocytes were incubated with M-CSF for six days in culture medium (Ambarus et al., 2012; Spiller et al., 2014; Vogel et al., 2014). Robustness of differentiation was confirmed by analyzing phenotypic clusters of differentiation in flow cytometry (Tab. 1). CD14, expected on monocytes as well as on macrophages, was expressed. During macrophage differentiation, the typically

upregulated clusters CD68 and CD206 were exhibited by macrophages, and the M2-phenotypic expression of CD163 was shown. The absence of CD80 and CD197, both expressed by M1-phenotypes, verified induced M2 cell identity. Post differentiation, macrophages were cultured on biomaterial surfaces for 48 h. Cellular adherence on biomaterial surfaces was shown by immunohistological staining of ICAM-1 (Fig. 2A).

3.2 Chemokine adsorption on biomaterials and active secretion by biomaterial-resident macrophages

Protein adsorption on biomaterials represents a primary effect of contact of a foreign body with body fluids like blood plasma or interstitial fluid. In our experimental approach, serum supplemented to culture medium naturally contains proteins like growth factors. The supplementation of serum allows mimicking of the first contact of the biomaterial with body fluids. To evaluate the biomaterial-dependency of protein-surface-adsorption, PDGF (Fig. 2B), FGF (Fig. 2C), and TGF- β 1 (Fig. 2D) concentrations in biomaterial-conditioned medium in the absence of cells were analyzed. Differences in protein adsorption were revealed among glass, PTFE, and titanium surfaces. Adsorption of PDGF and FGF decreased from glass with a high adsorption to PTFE with a moderate adsorption and titanium with the lowest adsorption capacity. Adsorption of TGF- β 1 was comparable for glass and PTFE, whereas titanium resulted in the lowest adsorption. These findings indicated that the macrophage-material-modulated contribution to fibroblast chemotaxis and tissue remodeling would have to be compared with medium conditioned with the material in the absence of macrophages. Therefore, material-conditioned medium was used as a control in the two-chamber-based chemotaxis device, opposing chamber was filled with macrophage-material-conditioned medium. Also, in the experimental approach of tissue remodeling, a material-conditioned medium control was included to discriminate between macrophage-surface and medium-surface effects.

In comparison to respective material-conditioned medium in the absence of cells, macrophages cultured on glass surfaces did not significantly modulate PDGF, FGF, and TGF- β 1 levels in the medium. Culture on PTFE induced the secretion of PDGF,

Tab. 1: Characteristic expression of M2-phenotypic clusters of differentiation after differentiation of monocytes with M-CSF
The percentage of positively stained clusters of differentiation (CD) on macrophages is shown for five primary cell donors.

| Donor no. | Cluster of differentiation (% positive) | | | | | |
|-------------|---|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | CD14 | CD68 | CD80 | CD163 | CD197 | CD206 |
| 1 | 98.6 | 98.1 | 0.0 | 92.8 | 0.0 | 88.5 |
| 2 | 98.7 | 99.0 | 0.0 | 88.2 | 0.0 | 89.8 |
| 3 | 99.4 | 89.8 | 0.0 | 97.9 | 0.0 | 93.7 |
| 4 | 98.8 | 89.4 | 0.0 | 95.2 | 0.0 | 95.5 |
| 5 | 97.7 | 75.1 | 0.0 | 91.2 | 0.0 | 82.7 |
| Mean | 98.6 | 90.3 | 0.0 | 93.1 | 0.0 | 90.0 |
| SD | 0.6 | 9.6 | 0.0 | 3.7 | 0.0 | 5.0 |

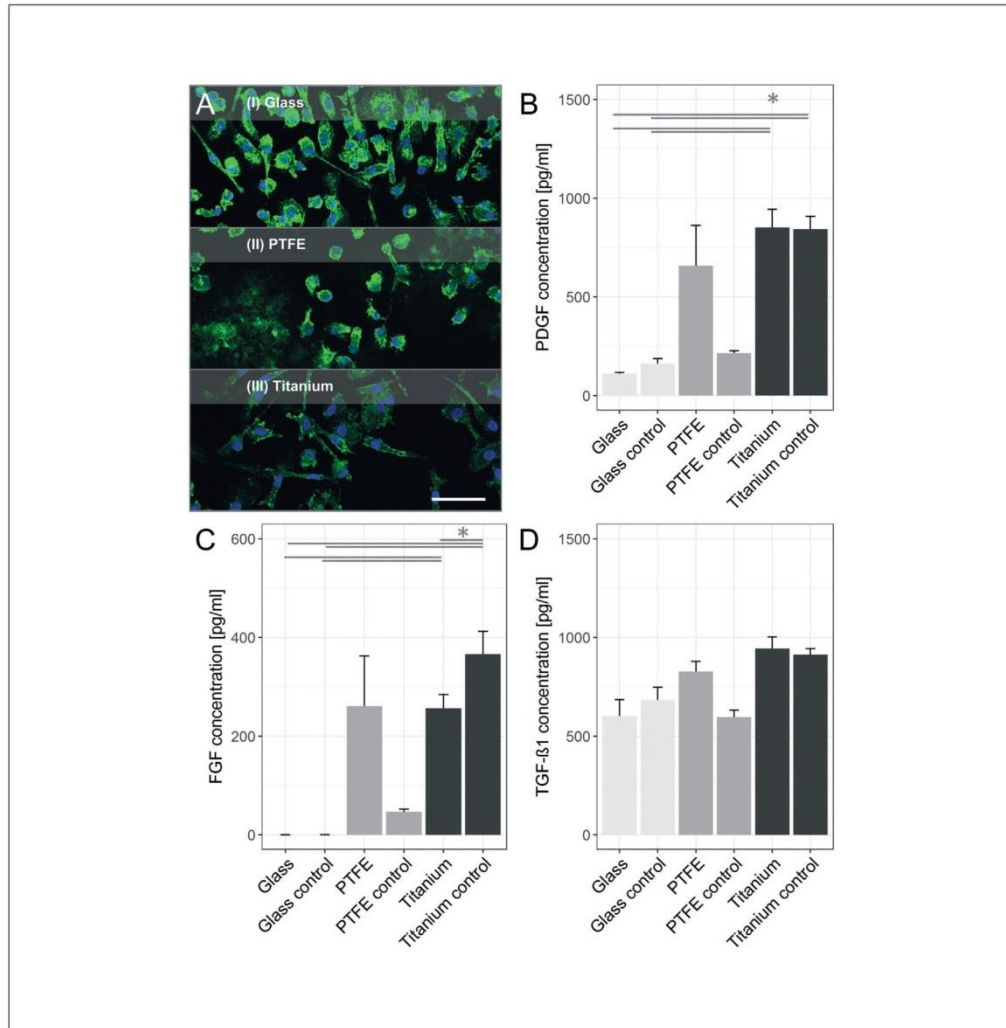


Fig. 2: Macrophage adhesion on biomaterial surfaces, active secretion of growth factors by macrophages, and passive growth factor surface adsorption

Macrophages show a material-dependent adherence on glass, PTFE, and titanium surfaces. (A) Immunohistological staining of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, green) and nuclear DAPI staining (blue) visualized macrophage adhesion and morphology on biomaterial surfaces after 48 h. The scale bar indicates 50 μm and is valid for all images. Material-induced active growth factor secretion by macrophages and passive growth factor adsorption on the biomaterial surface were characterized by measurement of (B) PDGF, (C) FGF, and (D) TGF- β 1 in macrophage-material and material-conditioned control medium. The PTFE values showed an inhomogeneous variance as well as a not-normally distributed range (p -value > 0.05). Therefore, PTFE values were excluded from the statistical analysis. One-way repeated measures ANOVA on PTFE-excluded datasets showed significant differences between glass and titanium for PDGF and FGF (p -value ≤ 0.05). No significant differences were found for TGF- β 1 (p -value = 0.17). A p -value ≤ 0.05 was considered significant. In total, supernatants of five donors were characterized. Mean values \pm SEM are represented.

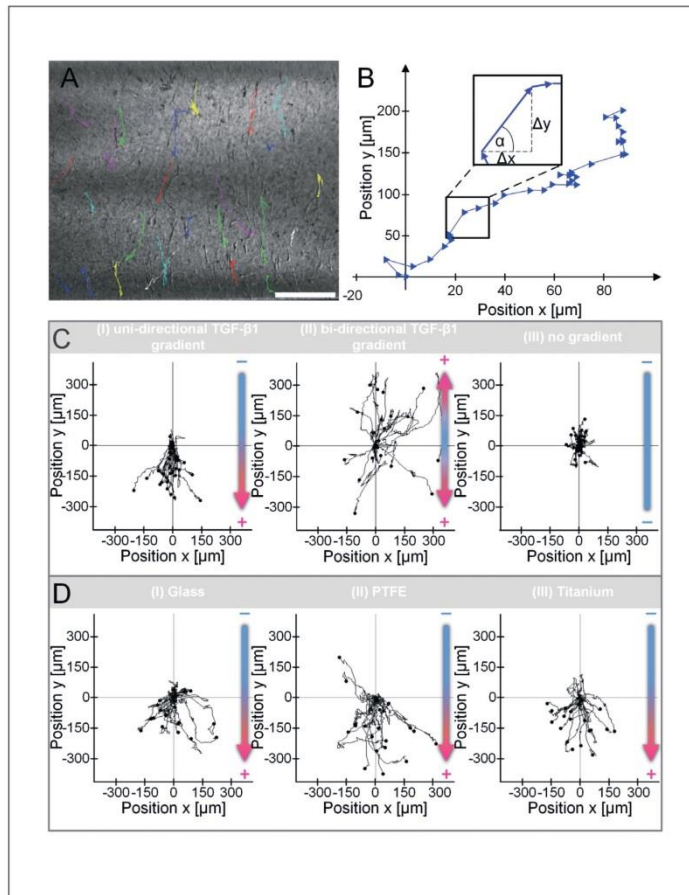


Fig. 3: Tracking and analysis of fibroblast chemotaxis

(A) Trajectories of collagen-embedded fibroblasts in the observation channel were obtained employing live cell imaging microscopy. Each colored line represents a trajectory of an individual cell. The scale bar indicates 250 μm .

(B) Recorded trajectories were composed of incremental displacements in the direction that is defined by the angle α (rad).

(C) To compare fibroblast chemotaxis, trajectories were displaced so that each walk starts in zero origin. A (I) unidirectional gradient of TGF- β 1 resulted in trajectories orientated along the gradient. In contrast, no biased walk was detected for a (II) bi-directional gradient or for (III) fibroblast migration without a gradient.

(D) Trajectories recorded from fibroblasts in response to gradients of macrophage-material-conditioned medium. Macrophages cultured on (I) glass, (II) PTFE, or (III) titanium induced fibroblast chemotaxis in the direction of the gradient. Each data set is composed of 20 individual cells. Graphs are exemplarily shown for the supernatant of one macrophage donor.

FGF and TGF- β 1 in macrophages. PDGF concentrations increased from 214.4 ± 12.7 to 656.4 ± 205.7 pg/ml, FGF concentrations increased from 46.7 ± 5.4 to 261.0 ± 101.2 pg/ml, and TGF- β 1 concentrations increased from 596.6 ± 36.0 pg/ml to 827.1 ± 51.0 pg/ml in PTFE macrophage-conditioned medium. While titanium-resident macrophages did not induce a change of PDGF and TGF- β 1 levels, a significant decrease of FGF concentration, from 366.4 ± 46.1 pg/ml in material-conditioned blank medium to 256.0 ± 28.2 pg/ml conditioned medium, was measured (p -value ≤ 0.05).

3.3 Validation of the experimental chemotaxis design

Employing live cell imaging, trajectories of fibroblasts in a 3D microenvironment were recorded (Fig. 3A). Direction and length of incremental steps were derived from the coordinates

(Fig. 3B). To validate the experimental approach in 3D chemotaxis μ -Slides, fibroblast migration towards a defined chemokine gradient of TGF- β 1 in (I) uni- or (II) bi-direction was measured and compared to (III) a negative control without any chemical gradient (Fig. 3C). Towards a uni- or bidirectional chemical gradient of TGF- β 1, fibroblasts migrated along the gradients. In contrast to a migration towards a unidirectional gradient, the mean direction of migration in between all trajectories was not biased for a bi-directional gradient or migration without gradient. Compared to the cellular walk distance in y -direction without any gradient, the distance between initial and final fibroblasts' position increased for uni- and bi-directional gradient from 150 μm for the negative control to 300 μm in the gradient setup.

In live cell experiments, macrophage-material-conditioned medium induced biased fibroblast migration (Fig. 3D). For all tested materials, fibroblasts aligned their tracks along the gra-

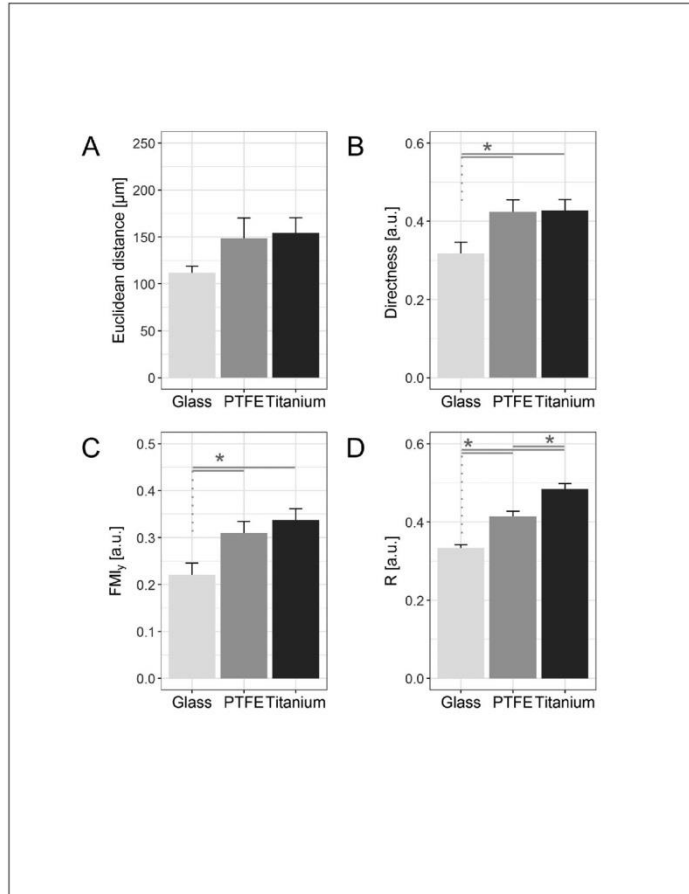


Fig. 4: Statistical analysis of fibroblast chemotaxis

Statistical parameters were derived from recorded migration data.

(A) The difference between initial and end position of a cell is expressed as the Euclidean distance d_E .

No significant differences among materials were obtained for d_E . (B) The directness DI , denoted by the quotient between d_E and the accumulated distance d_A , represents a measure for the straightness of the trajectories.

(C) The efficiency of migration in y direction can be assessed by the forward migration index (FMI_y).

(D) The mean length R provides information on the angle distribution of a migration process. Significant differences between materials were found for DI , FMI_y and R (p -value ≤ 0.05). Trajectories were analyzed for five primary macrophage donors. Values for each donor are visualized by grey squares. Mean and SEM are shown.

dient. To characterize fibroblast chemotaxis, discretized tracks were analyzed employing linear and circular statistics (Fig. 4). No significant differences were detected for the Euclidean distance d_E . Measured travel distances ranged from $112.0 \pm 7.0 \mu\text{m}$ for glass to $154.4 \pm 16.2 \mu\text{m}$ for titanium. For the directness DI , significant differences were found between glass (0.32 ± 0.03) and titanium (0.43 ± 0.03) as well as glass and PTFE (0.42 ± 0.03). The same pattern of significance was revealed for the efficiency of migration in y direction, described by the forward migration index (FMI_y). Here, glass resulted in a FMI_y of 0.22 ± 0.03 , whereas titanium and PTFE exhibited significantly higher values of 0.34 ± 0.02 and 0.31 ± 0.02 , respectively. For the angle distribution, significant differences were detected between all materials. Highest values for the mean length R measured for titanium (0.48 ± 0.01) indicated a strongly peaked angle distribution compared to glass (0.33 ± 0.01) and PTFE (0.41 ± 0.01).

3.4 Dynamics of macrophage-stimulated fibroblast chemotaxis

Linear and circular statistics confirmed the impact of a bio-material on macrophage-modulated fibroblast chemotaxis. To investigate migration dynamics and migration robustness, a stochastic computational model was developed (Fig. 5). Based on the Fokker-Planck equation, the dynamics of the angle probability distribution were analyzed. Following verification of the Markov property to ensure that the requirements for the applicability of the Fokker-Planck equation are met, Kramers-Moyal coefficients were derived. To calculate $D_1(a, t)$, which represents the unbiased random walk, steady-state conditions were assumed and $D_n(a, t)$ was substituted for $D_n(a)$ ($n = 1, 2$). For all materials, a zero-crossing embedded in a linear range of $D_1(a)$ was found in the gradient direction (≈ 4.7 rad). The zero

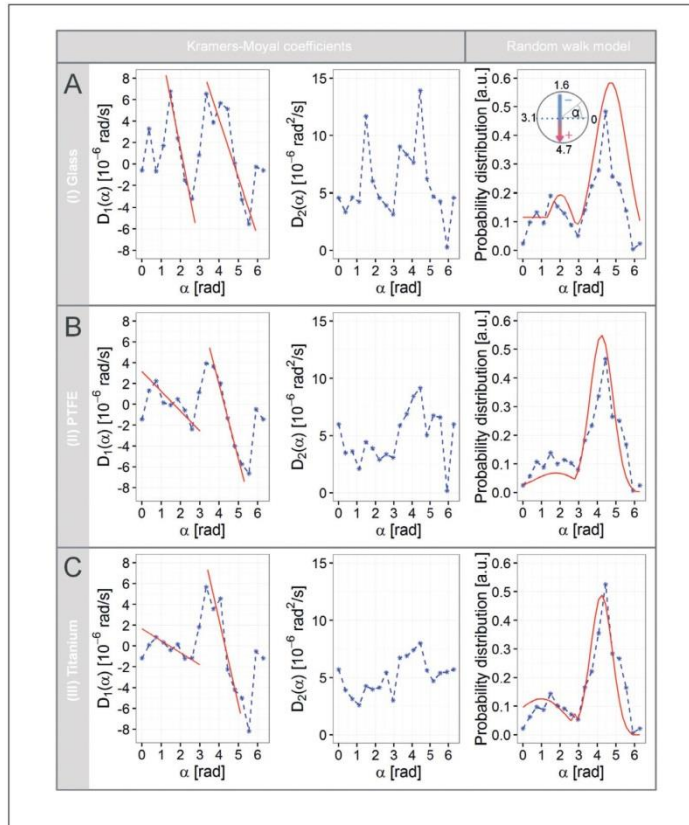


Fig. 5: Continuous random walk model and migration robustness

For all tested materials (A) glass, (B) PTFE, and (C) titanium, the Kramers-Moyal coefficients $D_1(\alpha)$ and $D_2(\alpha)$ were derived. The drift coefficient $D_1(\alpha)$ was characterized by two linear ranges (red lines) with zero points at 1.5 and 4.3 rad. They illustrate a pole in direction (4.3 rad) and an antipole (1.5 rad) in the opposite direction of the chemical gradient. The highest values for diffusion coefficient $D_2(\alpha)$ were detected in the proximity of the zero point. Comparison of measured angle probability distribution (dotted blue line) and the solution of the parameterized Fokker-Planck equation (red line) demonstrated a high predictive power of the stochastic model. For the calculation of the Kramers-Moyal coefficients, 20 tracks of all five donors were compiled ($n = 100$).

crossing of the drift coefficient accumulates the probability that a cell migrates with a distinct angle, and thus induces a biased walk. Traveling cells are redirected towards the gradient when entering the linear range. Positive deviations between the actual direction and the zero-crossing result in negative drift values, and negative deviations in positive drift values. The width of the linear range determines the region from which cells are guided towards the gradient, and thus the attractivity of the gradient. The slope of the linear range is a measure for the velocity of the reorientation. A second, differently strong pronounced zero crossing of $D_1(\alpha)$ was detected in the opposite direction (≈ 1.5 rad). This antipole weakens the attractivity of the gradient. In addition to biochemical signals, the second zero-crossing is also influenced by event-triggered reorientation, e.g., cell division or cell-cell interaction. Stochastic variations in the migration direction are introduced by the diffusion coefficient. Diffusion in gradient direction was differently increased for the three materials. For glass, the diffusion coefficient as well as the antipole were most pronounced, confirming the lowest in-

duction of fibroblast chemotaxis (Fig. 5A). In contrast, the high chemotactic potential of titanium was reflected by lowest values for the diffusion coefficient and a weakly expressed antipole (Fig. 5C). Induction of fibroblast migration by PTFE is ranked between the other tested biomaterials, depicted by a moderate slope and width of the linear range in addition to values for the diffusion coefficient in between the values of glass and titanium (Fig. 5B). The results of the continuous model provide a qualitative characterization of the migration; nevertheless, obtained findings correspond with the statistical analysis of the recorded trajectories. When substituting the Kramers-Moyal coefficients into the Fokker-Planck equation, the partial differential equation could be solved. Therefore, Kramers-Moyal coefficients were approximated by partial continuous functions. Obtained angle probability distributions correlated with the experimental angle distribution probability patterns, emphasizing the predictive power of the *in silico* model. Thus, the model represents a tool for the generation of mechanistic understanding of fibroblast chemotaxis.

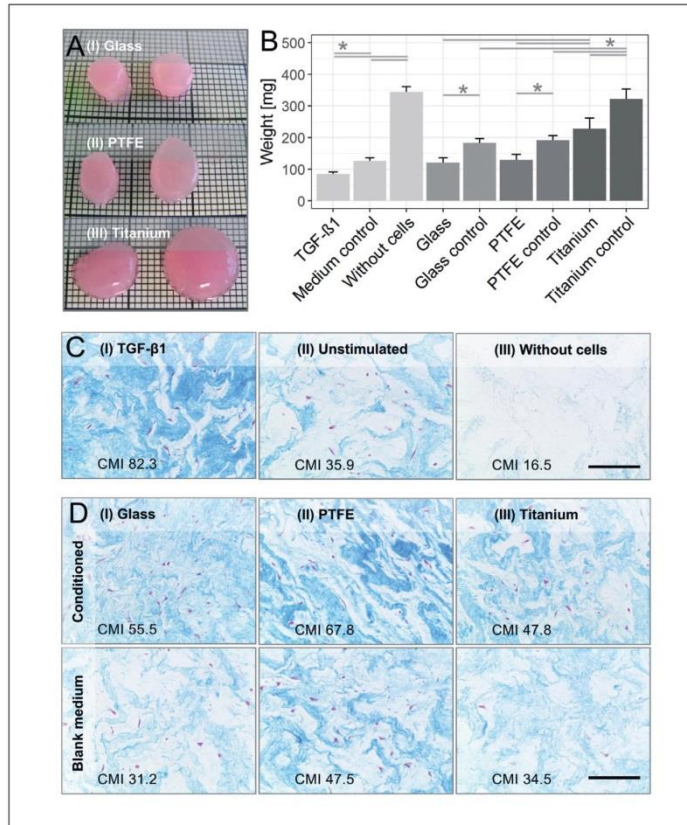


Fig. 6: Fibrous 3D tissue model to evaluate macrophage-material-induced effects on tissue remodeling

Medium conditioned with different materials (glass, PTFE and titanium) and macrophages derived from five human donors were harvested. Samples were each applied to three individual tissue models of fibroblasts in a collagen hydrogel. Respective material-conditioned control medium was used to identify macrophage-specific effects.

(A) On day 14 of culture, macrophage-material-induced effects on hydrogel (left side) contraction compared to the effects of respective material-conditioned control medium (right side) were visually apparent and correlated with the wet weight of tissue samples (B). In the plot, the weight is visualized as mean \pm SEM; $p \leq 0.05$ was considered significant. In (C) and (D), tissue remodeling is confirmed by histological Azan staining of fibrous tissue sections. Collagenous fibers appear blue and cell nuclei in purple. Cyan Mean Intensity (CMI) allowed a quantitative evaluation of blue values. Each scale bar represents 100 μ m and is valid for all horizontal aligned images.

3.5 Macrophage-mediated tissue remodeling

To confirm the collagen hydrogel concept as a model for *in vitro* tissue remodeling, (I) TGF- β 1 was supplemented as a positive control to a 14-day culture of fibroblasts and compared to (II) a hydrogel without additional pro-fibrotic stimulation as well as (III) a hydrogel without cells. For the evaluation of macrophage-biomaterial mediated effects, (IV) macrophage-material conditioned as well as (V) material-conditioned medium were incubated for 14 days on respective fibroblast-based tissue models. Hydrogel contraction was macroscopically visible in all experimental conditions, exemplarily illustrated for the tested materials in Figure 6A.

Tissue remodeling activity of fibroblasts cultured in a collagen hydrogel treated with TGF- β 1 or macrophage-conditioned medium compared to cell-free hydrogels, was further demonstrated by a significantly decreased weight (Fig. 6B). For all materials tested, macrophage-material-conditioned medium induced a significant weight reduction of collagen hydrogels in comparison to material-conditioned medium control. This rela-

tive weight reduction revealed a material dependent tissue-remodeling effect increasing from glass (weight reduction of 60 mg) to PTFE (weight reduction of 70 mg) and titanium (weight reduction of 90 mg). Related to an initial expected weight of 500 mg, the final weight induced by material-conditioned medium identified a significantly lower weight loss of titanium-conditioned medium (320 ± 31 mg) compared to glass-conditioned medium (180 ± 13 mg) and PTFE-conditioned medium (190 ± 15 mg). Similar patterns of significance were observed between absolute weights under macrophage-material-conditioned medium harvested from titanium (230 ± 34 mg) compared to glass (120 ± 15 mg) and PTFE (130 ± 18 mg).

Observations in weight measurements were confirmed by histological Azan staining of tissue sections. The Cyan Mean Intensity (CMI) value supported qualitative visible histological differences and allowed quantitative evaluation. Proof of collagen hydrogel concept as a model for *in vitro* tissue remodeling was demonstrated by an increased collagen fiber density under TGF- β 1-stimulated fibroblast culture (Fig. 6C). The CMI in-



creased from 35.9 without any additional stimulation to 82.3 in the TGF- β 1-stimulated tissue. Hydrogels without any cells consisted of loosely structured collagen fibers (CMI 16.5). In comparison to material-conditioned blank medium, macrophage-material-conditioned medium increased collagen fiber density (Fig. 6D). The relative increase of CMI showed a material dependent ranking from titanium (Δ CMI 13.3), to PTFE (Δ CMI 20.3), up to glass (Δ CMI 24.3). Absolute CMI values induced by macrophage-conditioned medium showed a CMI of 47.8 for titanium and 55.5 for glass. The strongest effect was observed on PTFE-conditioned macrophage-conditioned medium. Here, collagen fibers formed concentrated collagen bundles in hydrogels. These effects were reinforced by a relatively high CMI of 67.8.

4 Discussion

In vitro tests are useful to screen medical devices or implants as an alternative to animal studies. One advantage of *in vitro* tests is the avoidance of physiological differences between species by isolation of cells from human tissue, which are subsequently embedded in a biomimetic 3D test microenvironment. Furthermore, *in vitro* tests facilitate the breakdown of complex mechanisms into separate sub-processes, allowing a more precise and detailed study than is possible *in vivo* (ISO 10993-4:2002, Part 4, www.iso.org). In our study, we investigated the material dependency of two sub-processes involved in the foreign body reaction: (A) acute fibroblast chemotaxis, mediated by material-resident macrophages, and (B) chronic modulation of tissue remodeling. The proposed assays provide a new screening platform to ascertain the impact of each process on the apparent grade of foreign body reaction.

A micro device was employed to record real-time single-cell migration, supporting investigations on chemotaxis in a biomimetic microenvironment with well-defined and long-term-stable chemical gradients. Trajectory appearance and directly-accessible migration parameters, such as the Euclidian distance, did not allow to distinguish between different biomaterials. Material differentiation was achieved by employing linear and circular statistics, whereby the analysis of the migration angle resolved the materials' chemotactic capacity most distinctively. Due to these findings, a biased random walk model for the migration angle was developed. Such continuous models enable unraveling complex empirical data (van Mourik et al., 2006). The investigated model parameters allowed assessing the biomaterials' potential to induce fibroblast migration. Zero crossings of the drift coefficient determine the preferred migration direction. The derived model parameters allow a scoring of the tested biomaterials, attributing a strong and robust fibroblast accumulation at the implant site to PTFE and the lowest fibroblast accumulation to titanium. These findings are confirmed by the circular statistics of fibroblast migration. Interestingly, linear Kramers-Moyal drift coefficients have also been reported for swimming microorganisms attracted by a light source (Hill and Häder, 1997), indicating linear reorientation as a generic biological mechanism. *In vivo*, arriving fibroblasts remodel the tissue

in the proximity of the biomaterial. To cover this long-term effect of macrophage-material interaction, we here propose a fibrous tissue model, including fibroblasts in a 3D collagen hydrogel matrix cultured under macrophage-material-conditioned medium. Tissue contraction, weight reduction, and deposition of extracellular matrix indicated a fibrotic process with a strong material dependency.

Our experimental design is aligned with the physiological microenvironment at the implant site. Dynamics of protein adsorption from blood fluid to biomaterial surface are resembled by the supplementation of FCS to the culture medium. Dependent on protein-surface, protein-protein, protein-water, and water-surface interactions, protein adsorption capacity from multi-complex biological fluids, like serum-supplemented cell culture medium, cannot be predicted from universal correlations (Vogler, 2012; Tejero et al., 2014). In our study, the measurement of growth factors in material-conditioned medium confirmed a strong material-dependency of protein adsorption. To identify macrophage-substrate effects on chemotaxis and tissue remodeling, material-conditioned blank medium was used as reference. With respect to material-conditioned control medium, a higher cellular net secretion, overlaying passive protein adsorption effects in macrophage-material-conditioned medium, was identified for chemotaxis and tissue remodeling. Interestingly, in addition to a material-dependent protein secretion, also a material-dependent protein consumption was observed, i.e., FGF was significantly decreased in the presence of macrophages on titanium. Particularly, with regard to material-induced cellular responses, single-cytokine measurements, here shown for FGF, PDGF, and TGF- β 1, are not sufficient to allow ranking of biomaterials. Instead, using fibroblasts as a sensor of the net molecular secretion profile allows a better read out of cellular responses to biomaterials, here demonstrated for macrophage-material-mediated chemotaxis and tissue remodeling.

Our experiments on titanium surfaces revealed a higher macrophage-induced chemotactic activity, reflected by directed, forward-aligned fibroblast migration. These results are supported by the highest weight reduction ratio of the tissue model cultured under macrophage-titanium-conditioned medium compared to the titanium-medium control. In contrast to macrophage-induced chemotactic activity, the absolute weight of fibrous tissue related to initial weight remained high, leading to a relatively low collagen deposition observed in histology. Further insight is needed that reveals whether a higher cellular activity in response to biomaterials is favorable for the physiological healing process and might positively influence the end point of fibrous encapsulation. Macrophages cultured on PTFE surfaces stimulate a directed and forward-orientated migration of fibroblasts, however the alignment to the gradient was significantly lower compared to titanium. While the weight reduction ratio of fibrous tissue in comparison to blank medium control is moderate, the final weight related to the initial weight decreases greatly. This macrophage-PTFE-induced tissue contraction is strengthened by a high collagen fiber deposition.

State of the art *in vivo* models are based on histological evaluation, e.g., inflammatory infiltrates and matrix deposition. To our knowledge, there are no *in vivo* chemotaxis models



available, which continuously evaluate the biomaterials tested here. Our new *in vitro* test platform provides the advantage of allowing the study of the process of biomaterial-induced chemotaxis. *In vivo* studies have revealed a lower fibrous encapsulation and reactive inflammatory zone surrounding titanium implants compared to PTFE (Thomsen et al., 1986), copper (Suska et al., 2008), and stainless steel (Ungersböck et al., 1994). Formation of adherent fibrous tissue is reported for PTFE-aortic-patches in dogs (von Recum et al., 1978) as well as for vascular grafts in humans. Comparison of absolute weight reduction related to initial weight and collagen deposition with those *in vivo* studies, reveal a high consistency of developed fibrous tissue models to state-of-the-art scoring.

5 Conclusion

To date, the contributions of chemotaxis and tissue remodeling to the complex mechanisms of foreign body fibrous encapsulation could not be distinguished *in vitro*. We propose an *in vitro* multi-modular test platform that allows quantitative and qualitative evaluation of (I) material-induced chemotaxis and (II) tissue-remodeling by human fibroblasts. Significant differences in material dependency were found between the two processes, indicating that they are non-corresponding processes. Identification of processes with a strong material dependency enables informed decision making in biomaterial development.

References

- Ahad, I. U., Butruk, B., Ayele, M. et al. (2015). Extreme ultraviolet (EUV) surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) for control of biocompatibility. *Nucl Instrum Meth B* 364, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2015.08.093>
- Albini, A., Adelmann-Grill, B. C. and Müller, P. K. (1985). Fibroblast chemotaxis. *Coll Relat Res* 5, 283-296. [https://doi.org/10.1016/S0174-173X\(85\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S0174-173X(85)80018-2)
- Ambarus, C. A., Krausz, S., van Eijk, M. et al. (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375, 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.10.013>
- Barron, L. and Wynn, T. A. (2011). Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G723-728. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2010>
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A. S., Hondermarck, H. et al. (2000). FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 295-302. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(00\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00014-9)
- Cheesborough, J. E., Liu, J., Hsu, D. et al. (2016). Prospective repair of ventral hernia working group type 3 and 4 abdominal wall defects with condensed polytetrafluoroethylene (Motif-MESH) mesh. *Am J Surg* 211, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2015.03.033>
- Chen, S. Y., Lin, J. S., Lin, H. C. et al. (2015). Dependence of fibroblast infiltration in tumor stroma on type IV collagen-initiated integrin signal through induction of platelet-derived growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1853, 929-939. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2015.02.004>
- Coker, R. K., Laurent, G. J., Shahzeidi, S. et al. (1997). Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production *in vitro* but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 150, 981-991.
- Franz, S., Rammelt, S., Sehnarweber, D. et al. (2011). Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 32, 6692-6709. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078>
- Friedrich, R., Siegert, S., Peinke, J. et al. (2000). Extracting model equations from experimental data. *Physics Letters A* 271, 217-222. [https://doi.org/10.1016/S0375-9601\(00\)00334-0](https://doi.org/10.1016/S0375-9601(00)00334-0)
- Grainger, D. W. (2013). All charged up about implanted biomaterials. *Nat Biotechnol* 31, 507-509. <https://doi.org/10.1038/nbt.2600>
- Grant, M. B., Khaw, P. T., Schultz, G. S. et al. (1992). Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 3292-3301.
- Heldin, C. H. and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79, 1283-1316.
- Hill, N. A. and Häder, D. P. (1997). A biased random walk model for the trajectories of swimming micro-organisms. *J Theor Biol* 186, 503-526. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0421>
- Jaguin, M., Houllbert, N., Fardel, O. et al. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>
- Kahlig, A., Hansmann, J., Groeber, F. et al. (2013). *In silico* approaches for the identification of optimal culture condition for tissue engineered bone substitutes. *Curr Anal Chem* 9, 16-28. <https://doi.org/10.2174/157341113804486563>
- Mardia, K. V. (1972). *Statistics of Directional Data*. Academic Press. <https://books.google.de/books?id=IG7c-yvRs38C>
- Mohammed, M. T., Khan, Z. A. and Siddiquee, A. N. (2014). Surface modifications of titanium materials for developing corrosion behavior in human body environment: A review. *Procedia Materials Science* 6, 1610-1618. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.144>
- Möller, B., Terheyden, H., Açil, Y. et al. (2012). A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: An *in vivo* and *in vitro* study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41, 638-645. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2012.02.004>
- Murray, L. A., Rosada, R., Moreira, A. P. et al. (2010). Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages. *PLoS One* 5, e9683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009683>
- Park, S., Park, M., Kim, B. H. et al. (2015). Acute suppression of TGF-ss with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants.



- J Control Release* 200, 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.021>
- Pohlars, D., Brenmoehl, J., Loffler, I. et al. (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs – molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 1792, 746-756. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.06.004>
- Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C. et al. (2011). Raman spectroscopy: A noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 1027-1040. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0082>
- Risken, H. (2012). *The Fokker-Planck Equation: Methods of Solution and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer. <https://books.google.de/books?id=dXvpCAAAQBAJ>
- Rodriguez, A., Meyerson, H. and Anderson, J. M. (2009). Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites. *J Biomed Mater Res A* 89, 152-159. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31939>
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S. et al. (1982). Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92, 584-588. <https://doi.org/10.1083/jcb.92.2.584>
- Shreiber, D. I., Enever, P. A. J. and Tranquillo, R. T. (2001). Effects of PDGF-BB on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Exp Cell Res* 266, 155-166. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5208>
- Souza, J. C. M., Barbosa, S. L., Ariza, E. A. et al. (2015). How do titanium and Ti6Al4V corrode in fluoridated medium as found in the oral cavity? An in vitro study. *Mater Sci Eng C* 47, 384-393. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.055>
- Spiller, K. L., Nassiri, S., Witherel, C. E. et al. (2014). Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* 37C, 194-207. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.017>
- Suska, F., Emanuelsson, L., Johansson, A. et al. (2008). Fibrous capsule formation around titanium and copper. *J Biomed Mater Res A* 85, 888-896. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31575>
- Tejero, R., Anitua, E. and Orive, G. (2014). Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. *Prog Polym Sci* 39, 1406-1447. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.01.001>
- Thomsen, P., Bjursten, L. M. and Ericson, L. E. (1986). Implants in the abdominal wall of the rat. *Scand J Plast Reconstr Surg* 20, 173-182. <https://doi.org/10.3109/02844318609006316>
- Ungersböck, A., Perren, S. M. and Pohler, O. (1994). Comparison of the tissue reaction to implants made of a beta titanium alloy and pure titanium. Experimental study on rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 5, 788-792. <https://doi.org/10.1007/BF00213136>
- van Loon, S. L. M., Smits, A. I. P. M., Driessen-Mol, A. et al. (2013). The Immune Response in In Situ Tissue Engineering of Aortic Heart Valves. In E. Aikawa (ed.), *Calcific Aortic Valve Disease* (207-245). Rijeka, Croatia: InTech. <https://doi.org/10.5772/54354>
- van Mourik, A. M., Daffertshofer, A. and Beek, P. J. (2006). Estimating Kramers-Moyal coefficients in short and non-stationary data sets. *Physics Letters A* 351, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2005.10.066>
- Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L. et al. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79, 285-293. <https://doi.org/10.1189/jlb.0105015>
- Vogel, D. Y., Glim, J. E., Staveniuter, A. W. et al. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219, 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
- Vogler, E. A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* 33, 1201-1237. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.059>
- von Recum, A. F., Imamura, H., Freed, P. S. et al. (1978). Biocompatibility tests of components of an implantable cardiac assist device. *J Biomed Mater Res* 12, 743-765. <https://doi.org/10.1002/jbm.820120513>
- Zengel, P., Nguyen-Hoang, A., Schildhammer, C. et al. (2011). mu-Slide chemotaxis: A new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol* 12, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-21>

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Our work was funded by the German Federal Ministry of Education and Research; program NanoMatFutur; grant agreement number 13N12971 – ETface.

Correspondence to

Jan Hansmann, Dr.-Ing.
University Hospital Wuerzburg
Roentgenring 11
97070 Wuerzburg, Germany
Phone: +49 931 3181209
e-mail: Jan.Hansmann@uni-wuerzburg.de

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A comparative multi-parametric *in vitro* model identifies the power of test conditions to predict the fibrotic tendency of a biomaterial

Maren Jannasch¹, Sabine Gaetzner¹, Tobias Weigel¹, Heike Walles^{1,2}, Tobias Schmitz¹ & Jan Hansmann^{1,2}

Received: 12 December 2016

Accepted: 31 March 2017

Published online: 10 May 2017

Despite growing effort to advance materials towards a low fibrotic progression, all implants elicit adverse tissue responses. Pre-clinical biomaterial assessment relies on animals testing, which can be complemented by *in vitro* tests to address the Russell and Burch's 3R aspect of reducing animal burden. However, a poor correlation between *in vitro* and *in vivo* biomaterial assessments confirms a need for suitable *in vitro* biomaterial tests. The aim of the study was to identify a test setting, which is predictive and might be time- and cost-efficient. We demonstrated how sensitive *in vitro* biomaterial assessment based on human primary macrophages depends on test conditions. Moreover, possible clinical scenarios such as lipopolysaccharide contamination, contact to autologous blood plasma, and presence of IL-4 in an immune niche influence the outcome of a biomaterial ranking. Nevertheless, by using glass, titanium, polytetrafluorethylene, silicone, and polyethylene representing a specific material-induced fibrotic response and by comparison to literature data, we were able to identify a test condition that provides a high correlation to state-of-the-art *in vivo* studies. Most important, biomaterial ranking obtained under native plasma test conditions showed a high predictive accuracy compared to *in vivo* assessments, strengthening a biomimetic three-dimensional *in vitro* test platform.

The increasing use of biomaterials in regenerative medicine to replace or repair tissue defects or to support body functions, demonstrates the clinical relevance of appropriate biocompatibility test methods. Following implantation, all biomaterials induce adverse tissue responses, comprising inflammation, fibrosis or thrombosis¹⁻³. Upon exposition of a biomaterials' surface to blood fluids, proteins adsorb immediately, thereby enabling cell adhesion, coagulation, and complement activation. Induced by tissue injury and affected by protein-material interactions, alarm signals are released to the extracellular space, stimulating the migration of immune cells to the implant region^{4,5}. Within hours, granulocytes enter the tissue site and start to structurally attack by the release proteases and reactive oxygen species the surrounding tissue and the biomaterial. Following next days, granulocytes are replaced by macrophages at the wound site⁶. Usually, implant dimension and a non-degradable nature cause a failure to clearance the foreign body by phagocytosis⁷. The persistence of macrophages in direct contact to the implant surface confirms the central role of macrophages in the foreign body reaction. Over time, a transition from short-lived pro-inflammatory M1 to long-lived M2 macrophages is observed^{8,9}. This cellular polarization is influenced by inflammatory mediators, such as material-adhesive, pathogen-associated molecular patterns or local cytokine milieu¹⁰. For example, an inadequate cleaning of the implant can be apparent by a surface contamination with lipopolysaccharide (LPS), an outer membrane component of Gram-negative bacteria, shifting cellular balance to a pro-inflammatory state¹¹. In contrast to that, IL-4, produced by granulocytes or T_H2-lymphocytes, strengthens the longevity of M2 macrophages on biomaterial surface by induction of multi-cellular membrane fusion to giant cells^{12,13}. Furthermore, systemic conditions such as alterations in metabolism, e.g. diabetes and smoking habits, as well as quantity and quality of tissue contribute to individual compatibility reactions between recipients¹⁴⁻¹⁶. The cellular shift towards M2 phenotype is one key step towards cellular isolation of the foreign

¹University Hospital Wuerzburg, Department Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERM), Roentgenring 11, 97070, Wuerzburg, Germany. ²Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Translational Center Wuerzburg Regenerative Therapies in Oncology and Musculoskeletal Disease, 97070, Wuerzburg, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.H. (email: Jan.Hansmann@uni-wuerzburg.de)

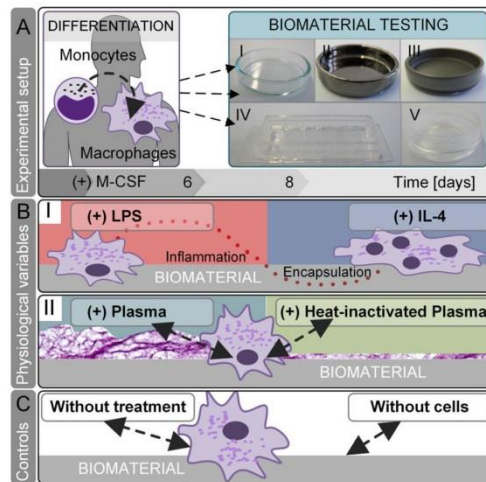


Figure 1. *In vitro* screening of physiological test conditions for the predictive power to evaluate a biomaterials' fibrotic potential. (A) In our experimental setup, human blood-derived monocytes were differentiated by supplementation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to M2-like macrophages. Subsequently, macrophages were cultured on biomaterials for 48 h: (I) glass, (II) titanium, (III) PTFE, (IV) silicone and (V) PE. (B) On each material, we tested conditions that mimic the physiological *in vivo* niche on materials' surface: (I) A common cause of implant failure - LPS contamination - polarizes macrophages' fate towards pro-inflammation. In contrast, the presence of IL-4 in the immune niche strengthens a pro-survival cellular phenotype - the fusion of macrophages towards foreign body giant cells. (II) A biomimetic approach of protein-material interaction was resembled by applying human autologous blood-derived plasma on biomaterials surface. By calcification of plasma, a primary fibrous three-dimensional niche was formed. In comparison to native blood plasma, the inactivation of heat labile protein, e.g. complement, growth, and coagulation factors was assessed by heat-inactivation (HI) of human plasma. (C) As controls served test conditions without any additions and without cells.

body from internal host's body. The chronic deposition of M2 macrophages in the proximity of the implant stimulates surrounding fibroblasts to generate a dense fibrous capsule^{8,9} - exemplarily demonstrated by M2-phenotypic arginase expression metabolizing arginine to ornithine, which in turn promotes fibrosis by proliferation and collagen synthesis^{17,18}. To overcome those fibrotic adverse side effects and thereby ensure therapeutic success constitute main challenges in biomaterial development.

Current gold standard for the assessment of material-induced local tissue responses after implantation are animal studies [ISO 10993-6:2007, Part 6]. In complement to those long-term *in vivo* studies, *in vitro* tests facilitate short-term screening for acute effects of blood-material interaction [ISO 10993-4:2002, Part 4]. However, as inadequate test conditions often result in a poor correlation between *in vitro* and *in vivo*¹⁹, it must be ensured that obtained *in vitro* results are not biased or even determined by the test conditions or performance of experimental setup. To achieve an *in vitro* test that correlates to the fibrotic response observed *in vivo*, our aim was to identify test conditions for the development of a predictive human *in vitro* test system. Such an *in vitro* test system might be more efficient in terms of cost and time than animal testing and aligns to the 3R's principle to reduce animal burden²⁰.

Beside technical test variables like surface-to-volume ratio, sample collection, or tested readout parameters, also physiological variables recapitulating the process of foreign body reaction influence the materials' assessment *in vitro*, e.g. the interaction of blood plasma proteins with a biomaterial surface. Our experimental approach (Fig. 1) assesses the impact of physiological test conditions for the development of a standardized and predictive *in vitro* biomaterial test system. Those test conditions reflect a biomimetic implant scenario such as implant contamination, an immunological wound niche and blood protein-material interaction.

To consider that monocytes differentiate *in vivo* immediately upon extravasation, our testing was based on monocyte-derived primary human macrophages. Although this mechanism is important, the differentiation of monocytes into a M2-like phenotype prior to biomaterial testing is often neglected. These cells were used in a specific inflammatory spectrum, which moreover mimic the heterogeneous human immune system closer than immortalized cell lines. Due to its involvement in the long-term fibrotic response to biomaterials, macrophages were differentiated towards a M2-like phenotype by applying macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to the culture medium^{21,22}. LPS and IL-4 test conditions allowed modeling a broad inflammatory spectrum of macrophages: LPS induces a strong inflammation that polarizes a M2-like-to-M1 transition, whereas IL-4 strengthens a M2-phenotypic escape of apoptosis towards cellular adherence and fusion²³.

| Year[Reference] Author | Category [species, application] | Type of material | Outcome |
|-------------------------------|---|------------------------------|---|
| 2015 ³² Kindsfater | clinical study [human, knee bearing] | Polyethylene | PE showed no revisions, osteolysis or implant dissociation. |
| 2010 ³³ Deshpande | clinical study [human, facial skeletal augmentation] | Polyethylene | PE had a good long-term survivorship and a low complication incidence. |
| 1993 ³⁴ Wellisz | clinical study [human, facial or head reconstruction] | porous Polyethylene | Porous PE exhibited tissue ingrowth. |
| 2008 ³⁵ Suska | animal study [rat, subcutaneous implant] | Titanium, copper | Titanium surrounded a thinner fibrous capsule with lower inflammatory cells and vascularity than copper. |
| 1994 ³⁶ Ungersböck | animal study [rabbit, tibia implant] | Titanium, stainless steel | Fibrous tissue surrounding titanium was thinner and inflammatory cellular numbers were lower compared to stainless steel. |
| 1997 ³⁷ Shannon | animal study [rats, subcutaneous implant] | Titanium, stainless steel | In between titanium and stainless steel no differences in capsule thickness and cell response were found. Qualitative capsule characterization revealed less dense and circumferentially-packed tissue around titanium compared to stainless steel. |
| 1986 ³⁸ Thomsen | animal study [rat, abdominal wall implant] | Titanium, PTFE | Titanium implants were in direct contact with the connective tissue without inflammatory cells. In contrast, a fibrous capsule surrounded the PTFE implants. |
| 1978 ³⁹ von Recum | animal study [dog, aortic patch] | PTFE, Polyurethan | Polyurethan was encapsulated in a fluid cyst, whereas PTFE was moderately surrounded by tightly adherent fibrous tissue. |
| 2002 ⁴⁰ Batniji | animal study [rabbit, subperiosteal pocket implant] | PTFE, Silicone | The silicone implants elicited compared to PTFE a significantly thicker capsule and less neovascularization. |
| 2005 ⁴¹ Ustundag | animal study [rabbit, paraglottic space implant] | PTFE, Silicone | Around silicone a fibrous capsule formed, whereas PTFE limited the formation of a fibrous capsule. |
| 1996 ⁴² Trumpy | clinical study [human, subcutaneous implant] | PTFE, hard and soft Silicone | All materials developed a fibrous capsule decreasing in order to soft silicone, PTFE and hard silicone. |
| 2003 ⁴³ Siggelkow | clinical study [human, breast implant] | Silicone | A main reason for explantation of intact implants was capsular contracture, which was related to capsule thickness. |

Table 1. Preclinical and clinical studies allowed a comparison and evaluation of the test materials regarding their fibrotic tendencies. These studies emphasized an increasing fibrotic response from PE, titanium, PTFE to silicone. This literature-based biomaterial ranking finally substantiated the validation of our test conditions on their predictive power.

To ensure that the test system is applicable for a broad spectrum of biomaterials, we tested five distinct types of materials: glass, titanium, polytetrafluorethylene (PTFE), silicone, and polyethylene (PE). In regenerative medicine, titanium is preferably used in bone replacement^{24–26}, whereas PTFE is applied for vascular prosthesis, nerve conduits, or subcutaneous augmentation^{27,28}. Silicone is commonly harnessed for soft tissue replacement²⁹, e.g. as mammary implant or in laryngoplasty³⁰, and PE is found in joint replacement^{31,32}, facial skeletal or head augmentation^{33,34}. We additionally included glass as a control for a standard cell culture material. In order to allow an evaluation of the fibrotic tendencies of those materials, we reviewed literature on animal and clinical studies (see Table 1). Although no meta-analysis of the tested biomaterials is available, several preclinical and clinical studies allow a comparison and ranking of the used materials respective to their fibrotic potential. A good long-term survival, tissue ingrowth and a low complication incidence is shown for PE implants in humans^{32–34}. In animal studies, also titanium was characterized by a low fibrotic response^{35–38}, whereas a moderate inflammatory reaction and a fibrous encapsulation were observed following PTFE implantation^{38,39}. Strongest adverse effects such as a thick capsule formation were elicited by silicone implants^{40–43}. Despite silicone's endorsement as the most widely applied biomaterial, a debate on its safety in humans continuously remains^{29,44}. These studies demonstrate

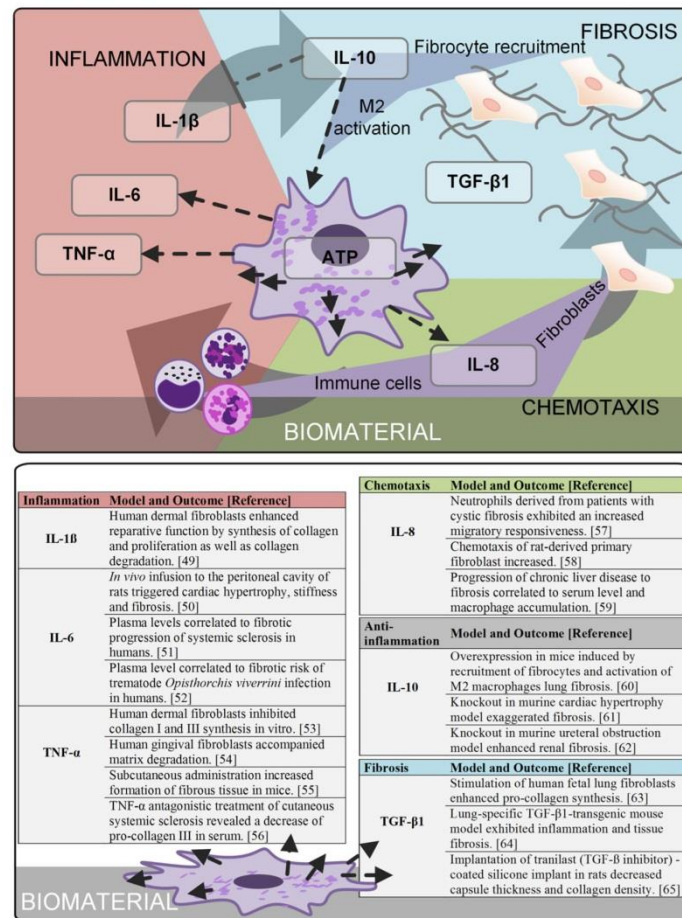


Figure 2. To characterize materials' fibrotic potential, the influence of the selected test conditions on the net secretion of cytokines was investigated. All selected readout factors represent fibrotic drivers: a strong cellular viability on materials' surface maintains a chronic responsiveness to the foreign body; a pro-inflammatory component at the initial stage of cell-implant contact induces a fibrotic progression and a chemokine gradient guiding further cells to implant region strengthens both the inflammatory and fibrotic response. Despite the mechanism of surface-induced cytokine secretion and their influence to final fibrotic progression is poorly understood, pre-clinical and clinical studies from adjacent research areas substantiate the selection of readout parameters.

an increasing fibrotic potential from PE, titanium, PTFE to silicone, and were used for the validation of our test conditions.

A still newly arising field to assess a material's biocompatibility is to characterize the potential to induce the secretion of inflammatory mediators⁴⁵. The capacity of materials to modulate the cytokine response has been already demonstrated for murine macrophage-like RAW 264.7 and primary monocytes^{46,47}. However, a mechanistic understanding on biomaterial-surface-induced cytokine secretion and its role in fibrosis remained unresolved until now⁴⁵. Therefore, the influence of the selected test conditions on the cytokine net effect was investigated and caught by multiple readout parameters. Despite the mechanism of surface-induced cytokine secretion and their influence to final fibrotic progression is poorly understood¹⁷, studies from adjacent research areas substantiate the understanding on cytokines' involvement in fibrosis (Fig. 2). From state-of-the-art cytokine classifications the following assumptions were made:

- (I) a strong cellular viability on materials' surface maintains a chronic responsiveness to the foreign body
- (II) a pro-inflammatory component at the initial stage of cell-implant contact triggers a fibrotic progression
- (III) a chemokine gradient guiding further cells to implant region strengthens both the inflammatory and the fibrotic response

These assumptions finally rendered the fundament for the selection and interpretation of the tested quantitative readout factors: we quantified the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10 and TGF- β 1 in the cell culture supernatant; additionally, ATP levels (CellTiter) considered cellular viability at the surface site.

To test pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α at short-term 48 hours addresses the initial inflammatory trigger of a fibrotic progression⁴⁸. Whereas IL-1 β shows unique bi-functional reparative- as well as degradative functions⁴⁹, IL-6 demonstrates pro-fibrotic functions on cellular and systemic level⁵⁰⁻⁵². In contrast, TNF- α induces fibrosis as a systemic trigger of inflammation, overlaying direct anti-fibrotic cellular effects^{48,53-56}. Materials' ability to induce migration of cells to the implant is measured by IL-8 as a bi-functional chemokine that guides the infiltrations of inflammatory cells as well as fibroblasts⁵⁷⁻⁵⁹, rendering both, the inflammatory trigger and the cellular key mediator of fibrosis – the fibroblast. Additionally, a chemotactic potential has been furthermore reported for IL-10⁶⁰, whereas the complete knockout demonstrated its anti-inflammatory functionality in fibrosis^{61,62}. Those controversial studies might refer to its pleiotropic concentration-dependent, stabilizing at moderate concentrations soft tissue balance, whereas its overexpression leads to fibrocyte recruitment and M2 activation, and thereby to fibrosis. A direct measurement to assess a biomaterials' potential to induce fibrosis is the quantification of pro-fibrotic growth factors, such as TGF- β 1⁶³⁻⁶⁵.

To finally demonstrate the relevance of test conditions, a comparative model was introduced. The model facilitated the assessment of test conditions regarding their capacity to predict the fibrotic response of a biomaterial *in vivo*.

Results

Phenotypic characterization of pre-differentiated macrophages. *In vivo*, monocytes differentiate immediately upon extravasation. Thus, our test system was based on monocyte-derived primary macrophages. Furthermore, macrophages were differentiated towards a M2-like phenotype due to its involvement in the long-term fibrotic response to biomaterials. Therefore, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) was applied for six days to culture medium^{21,22}. Robustness of differentiation was shown by analyzing phenotypic markers (Fig. 3). As typically expected, CD14, CD68, and CD206 were exhibited by obtained macrophages. The M2-like-phenotypic expression of CD163, in absence of M1-specific CD80 verified induced M2-like cell identity. Surprisingly, the isolation source influenced the expression of CD197. As previously described, monocytes isolated from leukocyte concentrate showed an absence of CD197 following M-CSF-induced differentiation⁶⁶. In this study, we used whole blood to isolate and differentiate monocytes to M2-like macrophages. Thereby, we identified CD197 as a tissue-source-dependent marker. Post differentiation, macrophages were cultured on biomaterial surfaces for 48 h (experimental approach see Fig. 1).

Macrophage morphology is influenced by test condition. Glass, titanium, PTFE, silicone, and PE are commonly-used biomaterials. Moreover, these materials are known to cause a specific fibrotic response, thereby allowing the validation of the assessed test conditions regarding their predictive accuracy (see Table 1). Considering different scenarios such as inadequate cleaning of an implant, contact to blood fluid, and presence of neighboring inflammatory cells such as granulocytes and T_H2-lymphocytes at a wound site, the assessed test conditions comprised the physiological effects of LPS contamination, contact to autologous blood plasma, and IL-4 cytokine milieu on the response of macrophages in contact to different biomaterials. To address our first hypothetical fibrotic driver - a strong cellular viability on materials' surface - we investigated cell adherence and morphology by histologically staining CD54 and β -Actin on glass, titanium, and PTFE (Fig. 4). Topography and working distance did not allow capturing images on silicone and PE, demonstrating a limited applicability of histological assessments that requires suitable surface geometries. Nevertheless, after 48 h of culture, a strong effect of the test conditions on cellular adherence and shape was revealed on the assessed materials. On glass, titanium, and PTFE, a circular shape of macrophages was observed without additional pretreatment. In contrast, LPS induced cellular adherence on glass and a cell clustering on titanium and PTFE. Macrophages' formation of elongated cytoplasmic sprouts, strongly observed on glass and titanium, was affected by plasma surface treatment. As expected, surface treatment with heat-inactivated plasma led to a low cell adherence on all assessed materials. Interestingly, morphological changes of macrophages in between tested materials were highly provoked following IL-4 stimulation. On glass surfaces, a closed cellular cover was formed, whereas an elongated cellular shape was observed in response to titanium. The typically observed macrophage clustering on PTFE was not inhibited by IL-4.

Cellular viability on biomaterials reveals an effect of test conditions. Based on the assumption that viable cells at wound site sustain a chronic responsiveness to the biomaterial, cell count is a well-accepted parameter to assess biocompatibility [ISO 10993-6:2007, Part 6]. As described for silicone and PE surfaces, microscopic imaging is limited to specific working distances and suitable sample geometries. Instead of histological quantification, we preferred luminescence-based ATP measurements (CellTiter) as a viability parameter (Fig. 5). This quantitative assay covers in a direct surface-exposed procedure the whole surface area, and is suitable for various surface geometries without losing cells due to extensive washing. Interestingly, cell counts did not correlate to viability assessed by luminescence. Exemplarily, luminescence readout dropped after LPS stimulation, whereas IL-4 stimulation increased viability - in both cases, a high cell adherence was observed in histology. In addition to cell counts, ATP values are influenced by macrophages' phenotype-dependent metabolic state. Inflammatory

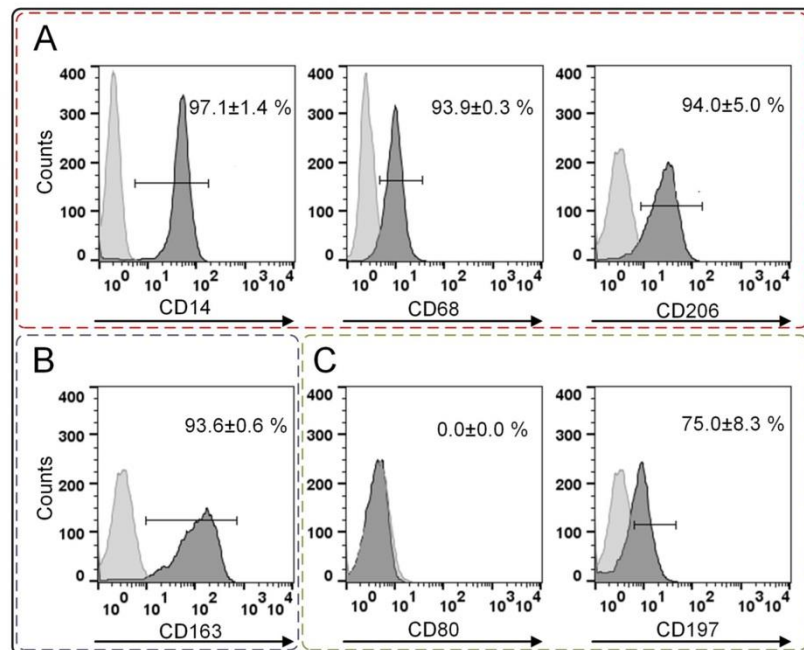


Figure 3. Prior material testing, the differentiation of monocytes to M2-like macrophages was confirmed. (A) Macrophage markers CD14, CD68, and CD206 were expressed. (B) The differentiation towards a M2-like phenotype was shown by CD163 positive profile, whereas (C) CD80 allowed distinguishing between M1 and M2. Here, its absence rejected the M1 differentiation. The marker CD197 was expressed by macrophages differentiated from whole-blood-derived monocytes. Histograms exemplarily represent the differentiation cluster of one donor; whereas mean values \pm SD represent data of three blood donors. A high compliance between all three donors was found. The light-grey histograms represent the isotype controls. The following abbreviations are used: SD for standard deviation, CD for cluster of differentiation.

M1 macrophages are metabolically reprogrammed to aerobic glycolysis, switching metabolism towards a faster ATP synthesis with a decreased net yield (two ATP molecules). In contrast, chronic M2 macrophages classically generate ATP by mitochondrial oxidative phosphorylation (net yield of 36 ATP molecules)^{18,67}. Our findings correspond to those expectations: on all tested materials the LPS- and IL-4-stimulated test conditions represented the minimum and maximum values of viability. Those findings support the capacity of our experimental design to cover the whole macrophage spectrum between M1 and M2 phenotypes. In addition, the impact of our study design, to evaluate test conditions is underlined by significant differences. Exemplarily, for titanium and silicone, cultures without additional treatment revealed significant differences in viability compared to all other tested conditions.

A material-dependent effect on viability was found for both plasma conditions. Following plasma treatment, the viability assessed on glass, titanium, PTFE and PE was in the higher measurement range, whereas on silicone surfaces both plasma test conditions showed values in the lower measurement range. Independent of test conditions, differences in viability between materials were observed, exemplarily demonstrated by a lower viability on silicone and PE.

Test conditions influence cytokine secretion. The cytokine secretion by material-resident macrophages showed a high variation in between blood donors. To cover this donor-to-donor variation, we increased experimental replicates to ten blood donors. A pro-inflammatory component at the initial stage of cell-implant contact is one key mechanism mediating the macrophage-modulated chronic response to a foreign body. To address this second hypothesis, the concentrations of pro-inflammatory IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Fig. 6) were analyzed in the supernatant at short-term 48 h. LPS stimulation increased the secretion of most cytokines to a major extent; exceptionally TGF- β 1 levels remained entirely LPS-unaffected. Due to the lower cytokine levels observed for all other test conditions and to increase the resolution of test conditions, data of LPS stimulation is shown in separate graph (Figure S1).

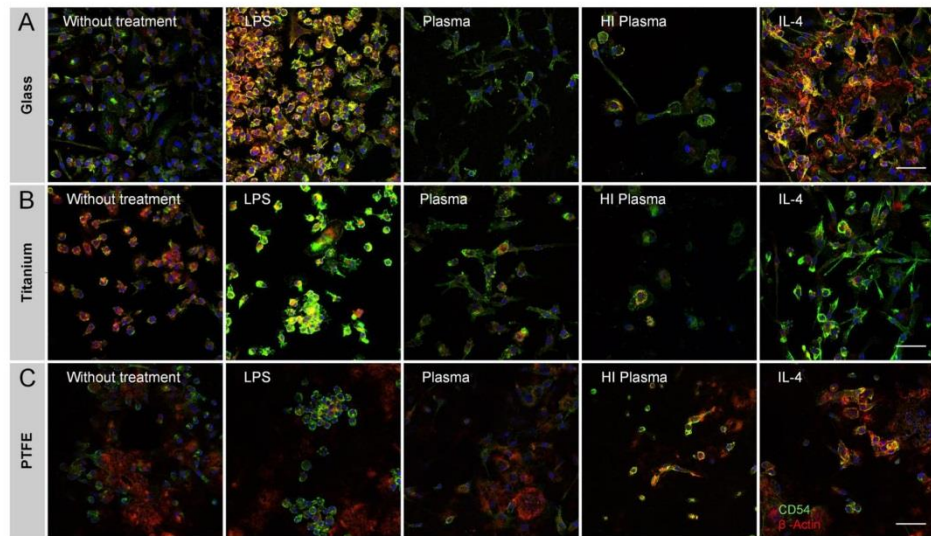


Figure 4. Immune-histological staining of intercellular adhesion molecule CD54 (green) and β -Actin (red) illustrated morphological changes in dependency of test conditions and material on (A) glass, (B) titanium and (C) PTFE. An uneven topography and a long working distance prohibited to capture sharp images on silicone and PE surfaces. The scale bar depicts 50 μ m and is valid for all images. The following abbreviations are used: HI for heat-inactivated.

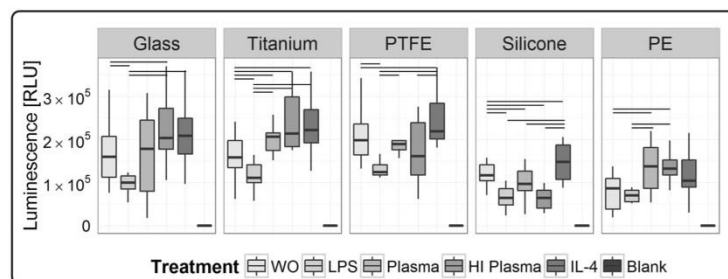


Figure 5. Surface-associated viability of macrophages following test procedure of 48 h was assessed by semi-quantitative ATP measurement, using a luminescence-based assay (CellTiter). Significant differences between the test conditions were found on all tested materials. Data is comprised of ten human macrophage donors ($n = 10$). Significance level is considered with a p -value ≤ 0.05 . The following abbreviations are used: WO for without treatment, HI for heat-inactivated.

With respect to test variables, no significant differences between materials and test conditions were detected for IL-1 β levels. On most materials macrophages' IL-1 β secretion remained below detection limit. Similarly, also in response to PTFE and silicone only few donors secreted IL-1 β (Fig. 6A). In contrast to IL-1 β , macrophages responded condition-specifically to biomaterials by IL-6 secretion. On all tested materials, IL-4 treatment induced a decrease of IL-6. A modulatory effect between the test conditions was observed on glass, where significant higher IL-6 levels were detected under non-treated test conditions compared to heat-inactivated plasma and IL-4 treatment (Fig. 6B). Titanium, PTFE, and silicone surfaces stimulated TNF- α secretion, especially for heat-inactivated plasma. A modulatory power of plasma-material-interaction was observed on titanium and PTFE, where plasma induced a TNF- α decrease, in contrast to an increase on silicone surfaces. For TNF- α strongest dependency on test conditions was detected for the material silicone (Fig. 6C).

Considering our third model hypothesis - a chemokine gradient guiding further cells to implant region - we identified IL-8 as a potent chemotactic readout factor characterizing the potential of a test condition to induce the

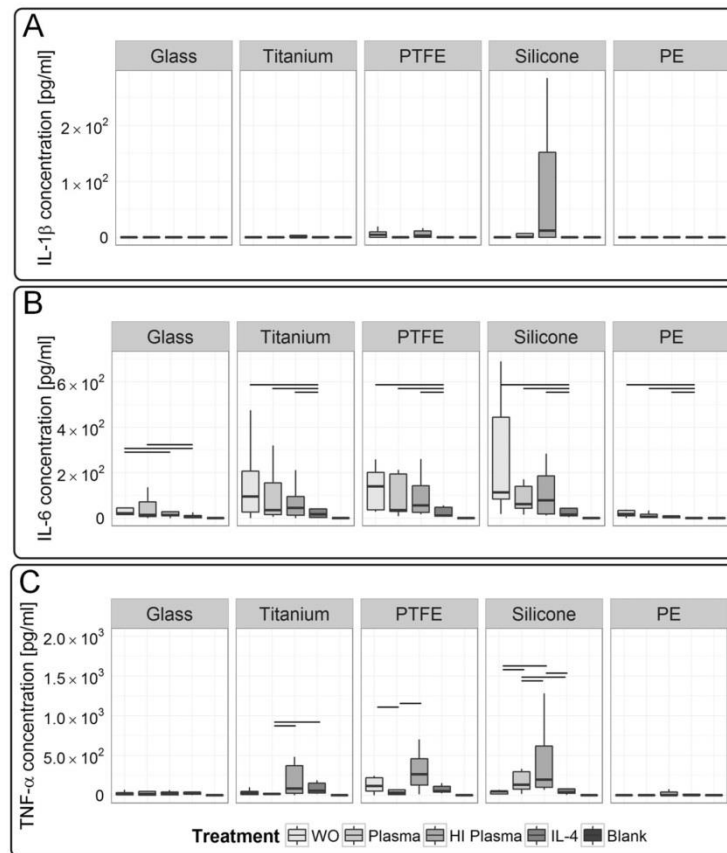


Figure 6. Macrophages' response showed a dependency on test conditions and revealed a material induced secretion of acute pro-inflammatory cytokines. **(A)** Interestingly, IL-1 β did not resolve differences between test conditions. **(B)** In contrast, IL-6 showed a strong dependency on test conditions for tests on glass, whereas **(C)** TNF- α demonstrated a dependency for tests on titanium, PTFE and silicone surfaces. Data of ten donors is shown ($n = 10$). A p -value ≤ 0.05 is considered as significant. LPS stimulation induced a high cytokine secretion, reasonably leading to provide the obtained data in separate graphs (see Figure S1). The following abbreviations are used: WO for without treatment, HI for heat-inactivated.

release of a chemotactic gradient by macrophages (Fig. 7A). Hereby, in response to glass a significant IL-8 increase was detected for native compared to heat-inactivated plasma test condition. Moreover, on all tested materials, IL-8 levels were significantly decreased under IL-4 stimulation.

Following differentiation, a specific cytokine profile of IL-10 (anti-inflammatory), in absence of IL-12 (pro-inflammatory), is phenotypically expected for M2-like macrophages. Moreover, IL-10 secretion depends on costimulatory activation, e.g. by LPS or material characteristics. Despite pro-inflammatory stimulation, the activated M2-like-M1-transition phenotype exhibits a locked IL-10 versus IL-12 response mode⁶⁸. Our results are consistent with those reports, strengthening a high stability of our M2-like phenotype during the test procedure (Fig. 7B). Nevertheless, a treatment dependency of IL-10 level was found on glass, PTFE, and silicone surfaces, whereby on those materials, IL-10 levels were highest for untreated and IL-4-treated test conditions.

We included blank medium cultured on respective material surface as a reference to assess constituents of cytokines present in medium. To note, all measured cytokines in samples obtained from surfaces that were treated with native and heat-inactivated plasma did not exceed blank medium control; thereby blank medium was evaluated as a predictive control. As a component of fetal calf serum that was supplemented to the cell culture medium, TGF- β 1 was present at high basal levels in the medium control (Fig. 7C; see blank medium measurement). In previous studies, we already showed that fibroblast growth factor (FGF) and platelet-derived growth factor (PDGF)

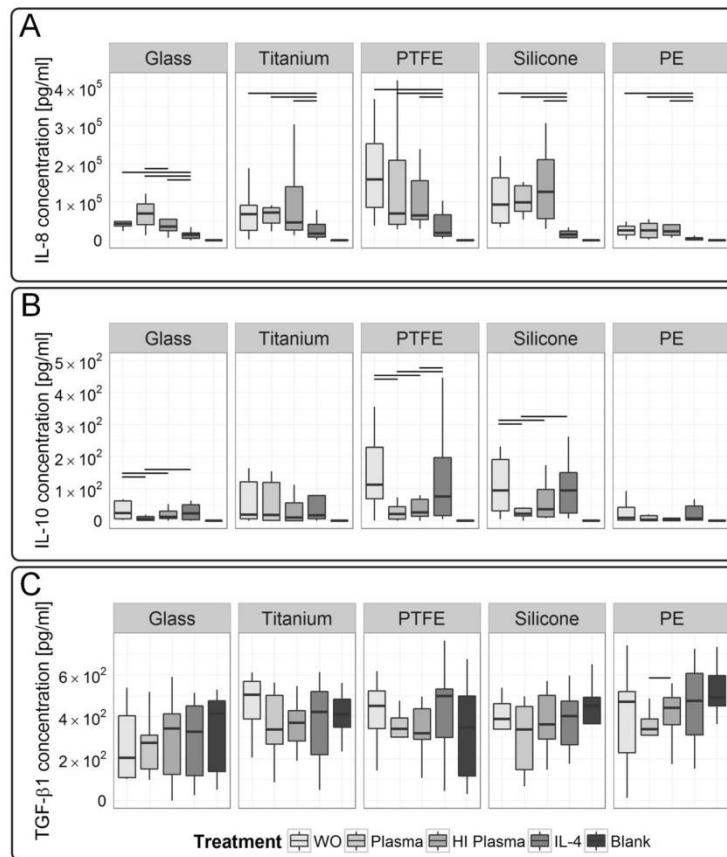


Figure 7. Chemokine IL-8, and anti-inflammatory cytokine IL-10 revealed significant differences between the test conditions, whereas pro-fibrotic growth factor TGF- β 1 did not resolve differences. **(A)** Here, we demonstrated a test condition dependency of IL-8 levels for tests on glass. **(B)** Additionally, IL-10 levels differed significantly between test conditions on glass, PTFE and silicone surfaces. **(C)** Macrophages' secretion of TGF- β 1 did not exceed the basal level found in the culture medium, thereby no effect of the test conditions were resolved. Those cytokines were analyzed in the supernatant of ten macrophage donors ($n = 10$). A p -value ≤ 0.05 is considered as significant. LPS-induced secretion of cytokines is provided in separate graphs (see Figure S1). The following abbreviations are used: WO for without treatment, HI for heat-inactivated.

did not exceed the medium threshold as well⁶⁶. Nevertheless, in mimicry to the microenvironment at the implant site, serum supplementation to culture medium resembled the dynamics of protein adsorption to biomaterial surface⁶⁹. Interestingly, on PE a significant TGF- β 1 consumption by macrophages was detected by a decreasing TGF- β 1 concentration for native compared to heat-inactivated plasma test conditions.

Overall, significant differences in between the test conditions were demonstrated by the cytokine release. IL-6 and IL-8 showed a test condition dependency for tests performed on glass, whereas TNF- α demonstrated a test condition dependency for tests conducted on titanium, PTFE, and silicone. Additionally, differences in the IL-10 concentration were observed in between the test conditions for glass, PTFE and silicone. However, no general valid correlation in between readout factors and the test conditions was found.

Comparative modeling allows condensation of the data to a scoring system used for biomaterial ranking. A comparative model was introduced to show the relevance of test conditions on the capacity of an *in vitro* test to discriminate in between biomaterials (Equation 1 and Figure S2). For each test condition, the sum of the significance profile from pair-wise comparison of each material to all other tested materials was derived. Thereby, materials that were significantly higher for many readout parameters compared to other tested

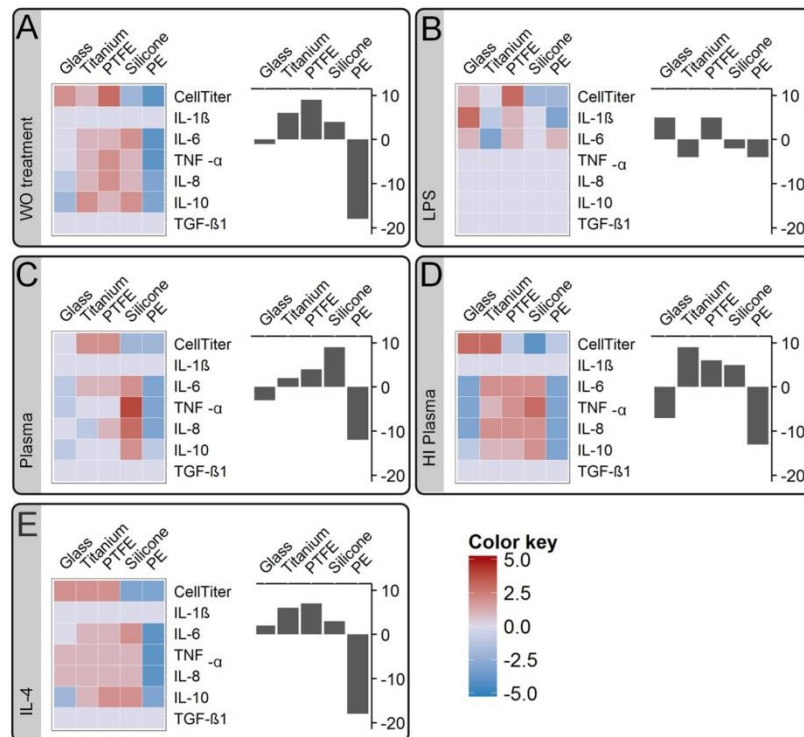


Figure 8. A significance profile of each material in comparison to all other tested materials was translated to a material scoring model. The obtained significance score values were translated into a color map in range of blue for minus values to red for positive values (left graph). Thereby, this scoring model visualized differences between the test conditions and finally allowed the evaluation of each specific readout factor respective to its predictive power. Finally for each material, the material ranking model summarized all readout-dependent scores in a bar plot (right graph). By comparing the literature-based biomaterial ranking to the obtained material rankings, a validation of each test condition for its accuracy to predict a fibrotic progression was performed: (A) without (WO) treatment, (B) LPS stimulation, (C) native plasma and (D) heat-inactivated (HI) plasma treatment as well as (E) IL-4 stimulation.

materials were attributed with a high positive score, whereas a low scoring was assigned to materials that showed many significantly lower readout parameters. This simple scoring condensed the complex data set composed of five materials, five test conditions, ten donors, and seven readout factors to one assessment criterion. The scoring of each test material was translated into a heat map, graphically representing differences between biomaterials and for each specific readout factor (Fig. 8, heat map). Finally, by summation of all readout-factor-dependent scores a test-condition-specific material ranking was obtained (Fig. 8, bar chart).

Plasma treatment facilitates predictive assessment of biomaterials. According to current literature (see Table 1) the potential of tested biomaterials to induce a fibrotic response *in vivo*, increases in the order of PE, titanium and PTFE to silicone. This state-of-the-art material assessment was used as the basis to validate the predictive power of the selected readout factors or finally of the derived biomaterial ranking.

The predictive power of each readout factor was visualized in a heat map (Fig. 8). A readout factor with an increasing color from blue to red for PE, over titanium and PTFE to silicone, represented a promising candidate for a parameter with a high predictive power. Exemplarily, under plasma test conditions IL-8 was identified as a highly predictive factor. Whereas, IL-6, TNF- α , and IL-10 showed a high correlation too, however finally lacked a discrimination between the materials titanium and PTFE. In contrast, IL-1 β and TGF- β 1 did not resolve differences between the tested biomaterials, and thereby totally failed a correlation to the literature-based biomaterial ranking.

In our material scoring model, the color pattern of the heat map revealed differences between the significance profiles under each test condition. Those findings strengthened the importance of our experimental approach to ensure suitable test conditions when assessing a biomaterial *in vitro*. Differences of the color pattern between the test conditions finally affected materials' ranking position.

State-of-the-art fibrotic classifications of the materials tested here allowed proving the validity of our data. Thereby, the ranking obtained under native plasma test conditions, increasing from PE ($\Sigma_{score} = -12$), titanium ($\Sigma_{score} = 2$), and PTFE ($\Sigma_{score} = 4$) to silicone ($\Sigma_{score} = 9$) was identified as a highly correlating to respective animal and clinical studies (see Table 1).

Interestingly, in analogy to plasma treatment, PE and glass were attributed with negative values for untreated and heat-inactivated plasma test conditions. Moreover, PTFE, titanium, and silicone obtained positive ranking values. However, the relative ranking position of the positively valued materials did only correspond to current biomaterial assessment for plasma treatment. This finding emphasized that especially silicone, PTFE and titanium require suitable test conditions.

LPS-dependent material scoring was limited to the readout factors CellTiter, IL-1 β , and IL-6, whereas all other readout factors revealed no significant differences between materials for LPS stimulation. Hereby, under pro-inflammatory LPS stimulation, IL-1 β entirely resolved significant differences in between materials. LPS stimulation led to a biomaterial ranking that showed no similarities to the rankings obtained under other test parameters: titanium ($\Sigma_{score} = -4$), silicone ($\Sigma_{score} = -2$) and PE ($\Sigma_{score} = -4$) received a negative value, glass ($\Sigma_{score} = 5$) and PTFE ($\Sigma_{score} = 5$) were attributed with positive values. Those results demonstrate how sensitive a pyrogen contamination impairs the assessment of a biomaterial.

To sum up, our material scoring model visualized differences between tested materials and between the readout factors (Fig. 8, heat map). The heat map allowed the identification of readout factors with a high predictive power. Differences between the color patterns strengthened the importance to compare test conditions and to characterize their influence when assessing a biomaterial *in vitro*. This has not been shown before. The ranking obtained under native plasma test conditions, showed a high predictive power in respect to animal and clinical studies, which is an important finding in biomaterial development. Most striking, our results demonstrate that a correlation between *in vitro* and *in vivo* biomaterial studies is attainable, if a suitable test condition is applied.

Discussion

Despite scientific efforts to advance a materials capacity to achieve a low fibrotic encapsulation, all medical devices elicit adverse tissue responses. The current gold standard for material assessment is the animal model that is cost- and time-intensive⁷⁰. Complementary, screening for biomaterials can be supported by *in vitro* tests. However, *in vitro* tests often entail a poor correlation between *in vitro* and *in vivo*¹⁹. By comparing test conditions in a human *in vitro* biomaterial study, we identified an experimental setup that closely correlates to the fibrotic response observed in animal and clinical studies.

Post-implantation of a biomaterial, a transition of acute pro-inflammation to a chronic progression into fibrous encapsulation is observed. The complexity of this fibrotic response is a major hurdle for the development of an *in vitro* biomaterial test system. To assess a biomaterial through the secretion of cytokines that are known as molecular mediators of fibrosis, is still a relatively new field⁴⁵. Here, we showed that on basis of multiple readout parameters the sensitivity and accuracy of an *in vitro* test system are increased. By our multi-parametric approach, test conditions that reflect a biomimetic implant scenario such as implant contamination, blood-protein-material interaction, or an immunological wound niche were successfully evaluated regarding their predictive power. Each test condition was proved by a broad spectrum of four, totally distinct, biomaterial types: titanium, PTFE, silicone, and PE. For those tested biomaterials, literature data describing materials' fibrotic progression *in vivo* was harnessed to validate a test condition. Following this procedure, we identified the pretreatment of test surfaces with human blood plasma as a test procedure with a high predictive accuracy. In detail, by supplementation of calcium to citrate-phosphate-stabilized plasma, clotting and the formation of a fibrin network are induced. Thereby, on materials' surface a three-dimensional fibrous niche is assembled⁷¹. Furthermore, through the biomaterial-dependent adsorption of plasma proteins cell adhesion is enabled, allowing the cells to sense and to respond to the foreign surface⁶⁹. The high correlation of this biomimetic approach to the *in vivo* situation justifies novel test systems based on plasma clotting.

The screening for a test procedure with a high predictive power and accuracy is complex, like seeking a needle in a haystack. Nevertheless, a poor correlation between inflammatory animal models and human conditions strengthens its importance⁷². Critical voices have been raised, stating an overreliance of animal systems to model human immunology^{73,74}. Particularly, it has been shown, that macrophages of different tissue sites and in between species differ in their phagocytic activity, chemotactic responsiveness and sensitivity⁷⁵. Moreover, differences between species are morphologically visible; pulmonary alveolar macrophages from mice, rats, and dogs show similarities, whereas humans' are heterogeneous and larger in size⁷⁶.

This data supports the importance of orientating biomaterial research on the complex conditions found in humans. The use of human cells and matrix components - here evaluated for blood-derived macrophages and fibrin matrix - is actually no translational immunological research, nevertheless represents a step towards clinical translation, which is often underestimated⁷⁴. Therefore, the establishment of an *in vitro* test system based on human cells and tissues into current common practice needs to be promoted⁷⁴. Due to the use of single cell lines or relatively small donor groups, *in vitro* test systems are often criticized and diminished considering their predictive power. By the use of primary macrophages from a relative large number of blood donors ($n = 10$), we addressed both aspects in our study. In addition, the availability of human blood allows the isolation of relatively large cell amounts, and thereby a large-scale study design becomes achievable - in this study, five different materials under five test conditions were tested. This resulted in twenty-five test approaches and a total test surface area

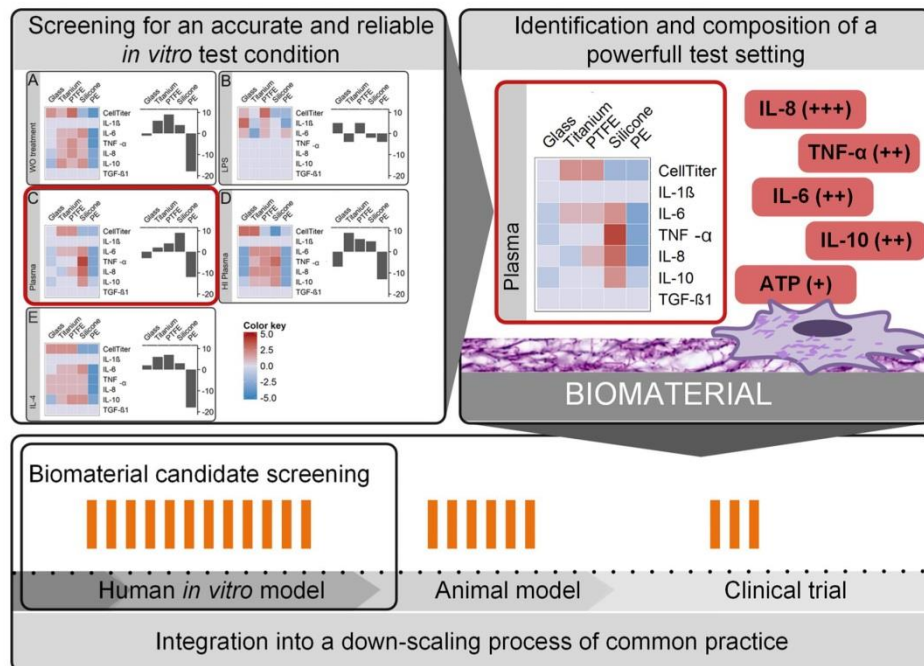


Figure 9. The integration of human-based *in vitro* test models into a down-scaling process of common practice is often neglected. One major flaw is a low correlation of *in vitro* tests to *in vivo* studies. In this study we propose a procedure to overcome this hurdle. In a large-scale *in vitro* screening approach, we identified an accurate and suitable condition for biomaterial testing and proved its validity by correlation to a well-described effect—the fibrotic progression—observed *in vivo*. On basis of this screening approach a well-defined *in vitro* test setting with a high predictive power was composed of (I) plasma pretreatment of biomaterials' surface and (II) a set of highly predictive readout factors. We hope that the obtained data justifies a down-scaling of the *in vitro* test procedure to the identified condition and will be applied for large-scale biomaterial candidate screenings in following studies. Finally, followed by current common practice to study promising candidates in systemic animal models, and carrying the positively-validated biomaterials in human subjects.

of 225 cm². The suitability of our test parameters in combination with our identified test condition, represent a basis for the development of a large-scale screening platform to identify promising biomaterials.

Independently on the implant site, all implantation procedures have one in common; due to the invasiveness a bleeding process is induced, and the implant surface gets in direct contact to blood. This strengthens our approach to study blood-component-material interactions. However, blood-component-interactions do not reflect a tissue-side-specific response or systemic effects. The tissue response at different implantation sites may also be divergent⁷⁷, especially in highly vascular areas such as bone and muscle, or avascular areas such as cartilage. Thereby, the clinical relevance of the *in vitro*-generated data of promising biomaterial candidates is not necessarily guaranteed. Thus, the data needs to be proved in animal models to make a decision which biomaterial candidate is carried forward into clinical trials. Our study emphasizes the potential of human-based *in vitro* tests to correlate with *in vivo* studies under suitable test conditions—here demonstrated for native plasma surface pretreatment. Thus, we propose the integration of human-based *in vitro* test systems into common practice for biomaterial assessment (Fig. 9): Starting with a broad *in vitro* screening for a predictive test condition and proving its validity by correlating to a well-described effect observed *in vivo*. Secondly, reducing the scope of test procedure to the identified condition and applying it for a biomaterial candidate screening. This is followed by the transfer of promising candidates into systemic animal studies, and finally studying the positively-validated biomaterials in human subjects.

To further improve the applicability of our test procedure, a suitable cell line can be used instead of primary human macrophages, thereby reducing the number of replicates. However, the inflammatory spectrum of cell lines is often not well-described, and must thus be compared to the response of human primary macrophages to a biomaterial. Our data set for ten different macrophage donors represents a reference to identify an appropriate cell line. Furthermore, the comparative model allowed the identification of high predictive readout factors. Thus,

we will further optimize the set of readout factors by screening for promising candidates and by replacing less predictive cytokines from the experimental set up.

In general, it should be considered that all *in vitro* test systems represent models providing a specific range of physiological functions. Thus, a suitable test system to address a specific scientific question must be carefully selected. Then, *in vitro* test systems can typically serve as a screening platform that allows the identification of adequate properties prior to the assessment of most promising candidates *in vivo*. By complementation of existing *in vivo* models, such an approach follows the Russell and Burch's 3R aspect of reducing animal burden^{20, 78}. However, a poor correlation between *in vitro* and *in vivo* assessments confirms a clear need for predictive *in vitro* biomaterial tests¹⁹. The inadequacy of the current *in vitro* assessment strengthens our comparative approach to identify predictive test conditions for the development of a novel biomaterial *in vitro* test platform. In our human-based screening study, we demonstrated how sensitive *in vitro* biomaterial assessments rely on test conditions, finally influencing the outcome of a biomaterial ranking. Most important, we showed a high correlation in between an *in vitro* testing based on autologous plasma to *in vivo*-obtained biomaterial assessments. Thereby, we strengthen further developments for a biomimetic test system based on the combination of a three-dimensional fibrin matrix and primary macrophages to identify promising biomaterials.

Methods

Ethical clearance statement. Peripheral blood samples of 10 donors were obtained under informed consent according to ethical approval granted by the institutional ethics committee of the Julius-Maximilians-University Wuerzburg (vote 182/10) from Bavarian Red Cross blood donation service (Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, München, Germany). Experiments with blood samples were conducted in compliance with the rules for investigation on human subjects, as defined in the Declaration of Helsinki.

Plasma isolation from whole blood. Citrate-buffered autologous plasma was separated from human whole blood by centrifugation at 2500 x standard gravity (g_0) for 15 min. For each donor, partial volumes of the obtained human plasma were heat inactivated for 1 h at 56 °C (Thermocycler, Eppendorf, Hamburg, Germany). To remove precipitates, a centrifugation for 1 min at 20817 $\times g_0$ was performed. Heat-inactivated and native plasma was stored at -80 °C. To purify autologous peripheral blood mononuclear cells, buffy coat layer was collected on top of the erythrocytes and immediately further processed.

Isolation and differentiation of human monocytes to macrophages. Mononuclear cells from peripheral whole blood were isolated by ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare, Freiburg, Germany). To purify monocytes from the generated cell fraction, a negative magnetic cell separation was performed (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), catching T cells, NK cells, B cells, dendritic cells, and basophils. Obtained monocytes were cultured in RPMI GlutaMax (Gibco, Carlsbad, USA) plus 10% fetal calf serum (41F1142K, Gibco) at a concentration of 1×10^6 cells per ml and a density of 1.5×10^5 cells per cm^2 on standard polystyrene cell culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland). Monocytes were differentiated using 40 ng per ml recombinant human M-CSF (Peprotech, New Jersey, United States) for 6 days^{68, 79}. To boost differentiation, medium was refreshed on third day of culture. On day 6, cells were harvested by mechanical cell scraping.

Flow cytometric analysis. On day 6 following differentiation, differentiation robustness was ensured by flow cytometry. Expression profile was evaluated by antibody staining of 2×10^5 macrophages per antigen: CD14 (555-397, BD Bioscience, Heidelberg, Germany), CD68 (11-0689-42, eBioscience, Frankfurt am Main, Germany), CD163 (12-1639-42, eBioscience) and CD206 (12-2069-42, eBioscience), CD80 (12-1639-42, eBioscience) and CD197 (130-093-621, Miltenyi Biotec). Cells were analyzed in FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and data was further processed in FlowJo software (Tree Star, Ashland, United States). Isotype controls are included in the data analysis as light-grey histograms. Cell debris were excluded from the data analysis by gating.

Preparation of test materials. Titanium, glass, and PTFE samples were prepared as described previously⁶⁶. Briefly, titanium films were in-house deposited on glass bowls (34 mm diameter, Brandt, Wertheim, Germany) by radio frequency magnetron sputtering using a titanium target (120 mm diameter, 10 mm height) with a target-to-substrate distance of 100 mm. PTFE layer (Rhenolase MK I-grau) was deposited on glass bowls by Rhenotherm GmbH (Kempen, Germany). Silicone test chambers were prepared in-house by using Biopor[®] AB clearX 70 shore (Dreve Otoplastik GmbH, Unna, Germany). To sterilize test samples prior testing, glass and silicone as well as titanium- and PTFE-coated bowls were incubated in an ultrasonic bath with deionized water for 30 min, subsequently incubated in 70% ethanol for 15 min and finally autoclaved. Sterile standard cell culture PE culture dishes (Ibidi GmbH, Martinsried, Germany, 81156) were included in the test setting. To histologically stain cells on surfaces, glass 8-well Nunc[®] Lab-Tek[™] Chamber Slide[™] (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) were used or PTFE- and titanium-coated glass slides (Icefrost 76 \times 26 \times 1 mm, Menzel, Germany) were combined with the chamber system removed from an 8-well Nunc[®] Lab-Tek[™] Chamber Slide.

Plasma treatment of material surface. Human native and heat-inactivated plasma was thawed for 15 min at 37 °C. Plasma was applied on biomaterials' surface in a volume per surface ratio of 50 μ l per cm^2 . To eliminate the effect of the citrate buffer in the whole blood sample and thus to allow coagulation on sample surface, plasma was calcified by supplementing 150 mM calcium chloride (Sigma Aldrich, München, Germany) to a final concentration of 15 mM. Human plasma was homogeneously distributed on biomaterials' surface and incubated for 30 min at 37 °C.

Macrophage seeding on material surface. For evaluation of physiological variables on macrophages' inflammatory response to biomaterials, macrophages were seeded on (I) untreated, (II) plasma treated and

(III) biomaterials treated with heat-inactivated plasma. For macrophage polarization, macrophages were stimulated towards an (IV) inflammatory response by adding 100 ng per ml LPS (L4391, Sigma Aldrich) or (V) a M2-phenotype was strengthened by 20 ng per ml IL-4 (200-04, Peprotech). To evaluate the impact of medium-material interaction, (VI) blank RPMI GlutaMax media supplemented with 10% fetal calf serum incubated on each material surfaces served as control. Macrophages were seeded on biomaterials at a cell density of 3×10^4 cells per cm^2 at a total medium volume surface ratio of 0.22 ml per cm^2 in RPMI GlutaMax supplemented with 10% fetal calf serum. All samples were incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO_2 conditions. The medium was harvested at 48 h and centrifuged for 5 min at $10.000 \times g$.

Immunohistochemical staining. Immunohistochemical staining was performed on biomaterial surfaces following a standard staining protocol. In short, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 min at room temperature. Primary anti-human CD54 (AH55411, Invitrogen, Carlsbad, United States) was incubated in a 1:100 dilution overnight at 4 °C and secondary anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (A-21202, Invitrogen) was applied in a 1:400 dilution for 60 min at room temperature. Following, 2.5% phalloidin anti-beta-actin Alexa Fluor 555 (A34055, Invitrogen) in phosphate buffered saline plus 1% bovine serum albumin (Applichem, Darmstadt, Germany) was incubated for 20 min. Dapi-Fluoromount (eBioscience) was used for sealing. Images were captured on a confocal laser scanning microscope (TCS SP8, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). Background subtraction and contrast enhancement was equally performed on all images (ImageJ 1.49 m, National Institutes of Health, Bethesda, United States). Surface topography and long distance prohibited to capture images of cells on silicone and PE surfaces.

Cell viability. Biomaterials' surface was washed once with phosphate buffered saline (Gibco). CellTiter reagent (Promega, Mannheim, Germany) was applied to a total volume of 78 μl per cm^2 and assay was performed according to manufactures procedure. Luminescence was measured in triplicates using a microplate Tecan Reader infinite® M200 (Crailsheim, Germany).

Cytokine measurement. Secretion of human TGF- β 1 (BMS249, eBioscience) was analyzed by ELISA, used according to the manufacturer's protocol. Samples were measured in duplicates with a Microplate Reader (Tecan Reader infinite® M200, Tecan, Crailsheim, Germany). IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α in cell culture supernatant were characterized by human Inflammatory Cytokine CBA (551811, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to manufacturer's protocol. Analysis was performed with FACS Calibur (BD Biosciences) and data was processed using FCAP Array Software 3.0 (BD Biosciences).

Statistical Analysis on treatment dependency. Continuous donor-dependent data was identified as not-normally distributed using Shapiro-Wilk Test. Friedman's ANOVA was applied, followed by Wilcoxon signed rank test to test pair-wise on significant differences between test conditions of biomaterial surfaces. For all statistical tests, a p -value ≤ 0.05 was considered as significant. All statistical tests were performed with OriginPro 9.1G statistical software (OriginLab Corporation, Northampton, US).

Statistical Analysis on material dependency and biomaterial scoring. To allow a pair-wise material evaluation, a scoring system was introduced. Therefore, significant differences between two sets of n measured readout factors f for two materials $M1 \{f_{M1,i}\}_{i=1}^n$ and $M2 \{f_{M2,i}\}_{i=1}^n$ were analyzed by Wilcoxon signed rank test. For all statistical tests a p -value ≤ 0.05 was considered as significant. A pair-wise significant higher mean value for material $M1$ in comparison to material $M2$ was translated into a scoring with a value of 1 for material $M1$, whereas a pair-wise significant lower mean value for material $M1$ in comparison to material $M2$ resulted in a scoring of -1 for material $M1$. If no significant difference was found (p -value > 0.05), a zero value was included in the assessment.

$$\text{Score} := (\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n, \{f_{M2,i}\}_{i=1}^n) \rightarrow \begin{cases} 0, & p > 0.05 \\ 1, & \overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n} > \overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n} \text{ and } p \leq 0.05 \\ -1, & \overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n} < \overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n} \text{ and } p \leq 0.05 \end{cases} \quad (1)$$

Hereby, $\overline{\{f_{M1,i}\}_{i=1}^n}$ denotes the mean value of set of n measured readout factor f for $M1$ and $\overline{\{f_{M2,i}\}_{i=1}^n}$ for $M2$ respectively. To derive the relevance of a specific readout factor, the sum of the significance profile from pair-wise scoring for each material was calculated. Thereby, the factor-dependent relation of a material in comparison to all other materials was obtained. Final material ranking was based on all measured readout factors f . Therefore, the sum of all factor-dependent scores was computed.

References

1. Montanaro, L., Campoccia, D. & Arciola, C. R. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* **28**, 5155–5168, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.003 (2007).
2. Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* **25**, 5681–5703, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.023 (2004).
3. Thevenot, P., Hu, W. & Tang, L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem* **8**, 270–280, doi:10.2174/156802608783790901 (2008).
4. Grainger, D. W. All charged up about implanted biomaterials. *Nature biotechnology* **31**, 507–509, doi:10.1038/nbt.2600 (2013).
5. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* **20**, 86–100, doi:10.1016/j.smim.2007.11.004 (2008).

6. Bryers, J. D., Giachelli, C. M. & Ratner, B. D. Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. *Biotechnology and bioengineering* **109**, 1898–1911, doi:10.1002/bit.24559 (2012).
7. Kou, P. M. & Babensee, J. E. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of biomedical materials research. Part A* **96**, 239–260, doi:10.1002/jbm.a.96a:1 (2011).
8. van Loon, S. L. M. *et al.* The immune response in situ tissue engineering of aortic heart valves. *Calcific Aortic Valve Disease, InTech*, doi:10.5772/54354, available from: <https://www.intechopen.com/books/calcific-aortic-valve-disease/the-immune-response-in-situ-tissue-engineering-of-aortic-heart-valves> (2013).
9. Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. & Simon, J. C. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* **32**, 6692–6709, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.078 (2011).
10. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969, doi:10.1038/nri2448 (2008).
11. Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials* **26**, 6811–6817, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.063 (2005).
12. Kao, W. J., McNally, A. K., Hiltner, A. & Anderson, J. M. Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) *in vivo*. *Journal of biomedical materials research* **29**, 1267–1275, doi:10.1002/jbm.820291014 (1995).
13. McNally, A. K. & Anderson, J. M. Foreign body-type multinucleated giant cell formation is potently induced by alpha-tocopherol and prevented by the diacylglycerol kinase inhibitor R59022. *Am J Pathol* **163**, 1147–1156, doi:10.1016/S0002-9440(10)63474-8 (2003).
14. Porter, J. A. & von Fraunhofer, J. A. Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. *Gen Dent* **53**, 423–432, quiz 433, 446 (2005).
15. Wood, M. R. & Vermilyea, S. G. Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed, P. A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* **92**, 447–462, doi:10.1016/S0022391304005207 (2004).
16. Abullais, S., AlQahtani, N., Kudyar, N. & Priyanka, N. Success of dental implants: Must-know prognostic factors. *Journal of Dental Implants* **6**, 44–48, doi:10.4103/0974-6781.190387 (2016).
17. Albina, J. E., Caldwell, M. D., Henry, W. L. Jr. & Mills, C. D. Regulation of macrophage functions by L-arginine. *J Exp Med* **169**, 1021–1029, doi:10.1084/jem.169.3.1021 (1989).
18. Klopffleisch, R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers. *Acta biomaterialia* **43**, 3–13, doi:10.1016/j.actbio.2016.07.003 (2016).
19. Hulsart-Billstrom, G. *et al.* A surprisingly poor correlation between *in vitro* and *in vivo* testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur Cell Mater* **31**, 312–322, doi:10.22203/eCM (2016).
20. Russell, W. B. R. The principles of humane experimental technique. *Methuen & Co. Ltd* (1959).
21. Spiller, K. L. *et al.* Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* **37C**, 194–207, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.017 (2014).
22. Vogel, D. Y. *et al.* Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* (2014).
23. Spiller, K. L. *et al.* The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **35**, 4477–4488, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.012 (2014).
24. Möller, B. *et al.* A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an *in vivo* and *in vitro* study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **41**, 638–645, doi:10.1016/j.ijom.2012.02.004 (2012).
25. Souza, J. C. M. *et al.* How do titanium and Ti6Al4V corrode in fluoridated medium as found in the oral cavity? An *in vitro* study. *Materials Science and Engineering: C* **47**, 384–393, doi:10.1016/j.msec.2014.11.055 (2015).
26. Mohammed, M. T., Khan, Z. A. & Siddiquee, A. N. Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. *Procedia Materials Science* **6**, 1610–1618, doi:10.2147/IJN.S80000 (2014).
27. Ahad, I. U. *et al.* Extreme ultraviolet (EUV) surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) for control of biocompatibility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **364**, 98–107, doi:10.1016/j.nimb.2015.08.093 (2015).
28. Cheesborough, J. E., Liu, J., Hsu, D. & Dumanian, G. A. Prospective repair of Ventral Hernia Working Group type 3 and 4 abdominal wall defects with condensed polytetrafluoroethylene (MotiMESH) mesh. *The American Journal of Surgery* **211**, 1–10, doi:10.1016/j.amjsurg.2015.03.033 (2016).
29. Backovic, A. & Wolfram, D. Silicone mammary implants—can we turn back the time? *Exp Gerontol* **42**, 713–718, doi:10.1016/j.exger.2007.04.003 (2007).
30. Ovari, A. *et al.* Polydimethylsiloxane for injection laryngoplasty: two cases necessitating tracheotomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **271**, 839–844, doi:10.1007/s00405-014-2897-6 (2014).
31. Smith, R. A., Maghsoodpour, A. & Hallab, N. J. *In vivo* response to cross-linked polyethylene and polycarbonate-urethane particles. *Journal of biomedical materials research. Part A* **93**, 227–234, doi:10.1002/jbm.a.32531 (2010).
32. Kindsfater, K. A. *et al.* *In Vivo* Performance of Moderately Crosslinked, Thermally Treated Polyethylene in a Prospective Randomized Controlled Primary Total Knee Arthroplasty Trial. *The Journal of Arthroplasty* **30**, 1333–1338, doi:10.1016/j.arth.2015.02.041 (2015).
33. Deshpande, S. & Munoli, A. Long-term results of high-density porous polyethylene implants in facial skeletal augmentation: An Indian perspective. *Indian J Plast Surg* **43**, 34–39, doi:10.4103/0970-0358.63955 (2010).
34. Wellisz, T. Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesthetic Plast Surg* **17**, 339–344, doi:10.1007/BF00437109 (1993).
35. Suska, F., Emanuelsson, L., Johansson, A., Tengvall, P. & Thomsen, P. Fibrous capsule formation around titanium and copper. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **85A**, 888–896, doi:10.1002/jbm.a.31575 (2008).
36. Ungersböck, A., Perren, S. M. & Pohler, O. Comparison of the tissue reaction to implants made of a beta titanium alloy and pure titanium. *Experimental study on rabbits. Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **5**, 788–792 (1994).
37. Shannon, C., Thull, R. & von Recum, A. Types I and III collagen in the tissue capsules of titanium and stainless-steel implants. *Journal of biomedical materials research* **34**, 401–408, doi:10.1002/(ISSN)1097-4636 (1997).
38. Thomsen, P., Bjursten, L. M. & Ericson, L. E. Implants in the Abdominal Wall of the Rat. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* **20**, 173–182, doi:10.3109/02844318609006316 (1986).
39. von Recum, A. F. *et al.* Biocompatibility tests of components of an implantable cardiac assist device. *Journal of biomedical materials research* **12**, 743–765, doi:10.1002/jbm.820120513 (1978).
40. Batniji, R. K. *et al.* Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. *Archives of Facial Plastic Surgery* **4**, 111–113, doi:10.1001/archfaci.4.2.111 (2002).
41. Ustundag, E., Boyaci, Z., Keskin, G., Kaur, A. & Ozkarakas, H. Soft Tissue Response of the Larynx to Silicone, Gore-Tex, and Irradiated Cartilage Implants. *The Laryngoscope* **115**, 1009–1014, doi:10.1097/01.MLG.0000162644.63752.BC (2005).
42. Trumpy, L. G. R. B. & Lyberg, Z. Soft tissue response to proplast-teflon and silicone in humans: Morphological and immunohistochemical observations. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **24**, 117, doi:10.1016/S1010-5182(96)80542-7 (1996).
43. Siggelkow, W. *et al.* Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. *Biomaterials* **24**, 1101–1109, doi:10.1016/S0142-9612(02)00429-5 (2003).
44. Vasey, F. B., Zarabadi, S. A., Seleznick, M. & Ricca, L. Where there's smoke there's fire: the silicone breast implant controversy continues to flicker: a new disease that needs to be defined. *J Rheumatol* **30**, 2092–2094 (2003).

45. Schindler, S., von Aulock, S., Daneshian, M. & Hartung, T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX* **26**, 265–277, doi:10.14573/altex (2009).
46. Refai, A. K., Textor, M., Brunette, D. M. & Waterfield, J. D. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of biomedical materials research. Part A* **70**, 194–205, doi:10.1002/jbm.a.30075 (2004).
47. Soskolne, W. A., Cohen, S., Sennerby, L., Wennerberg, A. & Shapira, L. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF- α and PGE₂. *Clin Oral Implants Res* **13**, 86–93, doi:10.1034/j.1600-0501.2002.130111.x (2002).
48. Distler, J. H., Schett, G., Gay, S. & Distler, O. The controversial role of tumor necrosis factor alpha in fibrotic diseases. *Arthritis Rheum* **58**, 2228–2235, doi:10.1002/art.v58:8 (2008).
49. Postlethwaite, A. E. *et al.* Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* **106**, 311–318, doi:10.1083/jcb.106.2.311 (1988).
50. Melendez, G. C. *et al.* Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* **56**, 225–231, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.148635 (2010).
51. Khan, K. *et al.* Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1235–1242, doi:10.1136/annrheumdis-2011-200955 (2012).
52. Sripa, B. *et al.* Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1654, doi:10.1371/journal.pntd.0001654 (2012).
53. Mauviel, A. *et al.* Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **96**, 243–249, doi:10.1111/1523-1747.ep12462185 (1991).
54. Meikle, M. C., Atkinson, S. J., Ward, R. V., Murphy, G. & Reynolds, J. J. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontol Res* **24**, 207–213, doi:10.1111/jre.1989.24.issue-3 (1989).
55. Piquet, P. F., Grau, G. E. & Vassalli, P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am J Pathol* **136**, 103–110 (1990).
56. Denton, C. P. *et al.* An open-label pilot study of infliximab therapy in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **68**, 1433–1439, doi:10.1136/ard.2008.096123 (2009).
57. Brennan, S., Cooper, D. & Sly, P. D. Directed neutrophil migration to IL-8 is increased in cystic fibrosis: a study of the effect of erythromycin. *Thorax* **56**, 62–64, doi:10.1136/thorax.56.1.62 (2001).
58. Dunlevy, J. R. & Couchman, J. R. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci* **108**(Pt 1), 311–321 (1995).
59. Zimmermann, H. W. *et al.* Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* **6**, e21381, doi:10.1371/journal.pone.0021381 (2011).
60. Sun, L. *et al.* New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**, L341–353, doi:10.1152/ajplung.00122.2010 (2011).
61. Verma, S. K. *et al.* Interleukin-10 Treatment Attenuates Pressure Overload–Induced Hypertrophic Remodeling and Improves Heart Function via Signal Transducers and Activators of Transcription 3–Dependent Inhibition of Nuclear Factor- κ B. *Circulation* **126**, 418–429, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.112185 (2012).
62. Jin, Y. *et al.* Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 801–811, doi:10.1038/labinvest.2013.64 (2013).
63. Coker, R. K. *et al.* Transforming growth factors- β 1, - β 2, and - β 3 stimulate fibroblast procollagen production *in vitro* but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* **150**, 981–991 (1997).
64. Lee, C. G. *et al.* Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor β 1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* **200**, 377–389, doi:10.1084/jem.20040104 (2004).
65. Park, S. *et al.* Acute suppression of TGF- β s with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **200**, 125–137, doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.021 (2015).
66. Jannasch, M. *et al.* *In vitro* chemotaxis and tissue remodeling assays quantitatively characterize foreign body reaction. *ALTEX* (2016).
67. El Kasmi, K. C. & Stenmark, K. R. Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Semin Immunol* **27**, 267–275, doi:10.1016/j.smim.2015.09.001 (2015).
68. Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L., van der Zanden, L. & Ottenhoff, T. H. M. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology* **79**, 285–293, doi:10.1189/jlb.0105015 (2006).
69. Tang, L., Wu, Y. & Timmons, R. B. Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *Journal of biomedical materials research* **42**, 156–163, doi:10.1002/(ISSN)1097-4636 (1998).
70. Knight, A. *The Costs and Benefits of Animal Experiments.* (Palgrave Macmillan UK, 2011).
71. Zhuo, R., Siedlecki, C. A. & Vogler, E. A. Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* **27**, 4325–4332, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.001 (2006).
72. Seok, J. *et al.* Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 3507–3512, doi:10.1073/pnas.1222878110 (2013).
73. Davis, M. M. A prescription for human immunology. *Immunity* **29**, 835–838, doi:10.1016/j.immuni.2008.12.003 (2008).
74. Hayday, A. C. & Peakman, M. The habitual, diverse and surmountable obstacles to human immunology research. *Nat Immunol* **9**, 575–580, doi:10.1038/ni0608-575 (2008).
75. Haley, P. J. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* **188**, 49–71, doi:10.1016/S0300-483X(03)00043-X (2003).
76. Haley, P. J., Muggenburg, B. A., Weissman, D. N. & Bice, D. E. Comparative morphology and morphometry of alveolar macrophages from six species. *Am J Anat* **191**, 401–407, doi:10.1002/aja.1001910407 (1991).
77. Luttkhuizen, D. T. *et al.* The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression. *Biomaterials* **27**, 5763–5770, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.004 (2006).
78. McNally, A. K., Jones, J. A., Macewan, S. R., Colton, E. & Anderson, J. M. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *Journal of biomedical materials research. Part A* **86**, 535–543, doi:10.1002/jbm.a.31658 (2008).
79. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology* **281**, 51–61, doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.010 (2013).

Acknowledgements

Our work was funded by the German Federal Ministry of Education and Research; program NanoMatFutur; grant agreement number 13N12971 – ETface.

Author Contributions

H.J. and W.H. and J.M. conceived the experiments. J.M. conducted the experiments. G.S. analyzed the supernatants. S.T. and W.T. prepared the biomaterial samples. J.M. analyzed the results. H.J. and J.M. prepared the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-01584-9

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017