

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und Rehabilitative Medizin

(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Axel Ekkernkamp)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

Entwicklung eines neuen *in vivo* Modells zur Analyse der
Oberflächeneigenschaften von Implantatmaterialien in Bezug auf die
Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion
Kaltes Atmosphärendruckplasma als integrationsfördernde Option

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:

Frauke Grottke

geb. am: 26.01.1991

in: Stade (jetzt
Hansestadt Stade)

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. Axel Sckell

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Andreas Seekamp

Ort, Raum: Zoom-Meeting

Tag der Disputation: 29.09.2021

Gewidmet den Mädchen und Frauen, denen der Zugang zu Bildung und Forschung verwehrt wird.

Teile dieser Arbeit wurden schon veröffentlicht und vorgestellt:

28.10.2014 Vortrag „Physikalisches Niedertemperaturplasma zur Oberflächenbehandlung von Metallimplantaten als vielversprechende integrationsfördernde Option - eine experimentelle *in vivo*-Studie“ Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie Berlin, im Rahmen der Wilhelm-Roux-Preis-Sitzung, (Abstract) German Medical Science GMS Publishing House; Düsseldorf DOI: 10.3205/14dkou577

18.09.2014 Vortrag „The Application of Tissue Tolerable Plasma Improves Early Phase Integration of Metal Implants – an *in vivo* Study Using Intravital Fluorescence Microscopy” 3rd Young Professionals Workshop on Plasma Medicine; Zinnowitz

02.05.2014 Vortrag „Entwicklung eines effizienten *in vivo* Modells zur Untersuchung neuer Implantatmaterialien“ 62. Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen; Baden Baden, dotiert mit dem 1. Nachwuchsförderpreis 2014 der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen e.V.

27.09.2013 Poster-Präsentation „A new experimental non-animal but *in vivo* model for the qualitative and quantitative analysis of the interaction of metal implants and soft tissue using intravital fluorescence-microscopy” 2nd Joint Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology and the Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research, Dresden

Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG	1
I.1 VORBEMERKUNG	1
I.2 ZIELSETZUNG	3
II MATERIAL UND METHODEN	5
II.1 MATERIAL	5
II.1.1 SPF EIER	5
II.1.2 IMPLANTATE	5
II.1.3 EINFÜHRUNG ZU DEN BEGRIFFEN PLASMA, PLASMAMEDIZIN UND PLASMAQUELLE	6
II.1.3.1 PLASMA	6
II.1.3.2 EINFÜHRUNG IN DIE PLASMAMEDIZIN	7
II.1.3.2.1 THERAPEUTISCHE ANWENDUNGSBEISPIELE	7
II.1.3.2.2 PLASMA ZUR OBERFLÄCHENMODIFIKATION IM MEDIZINISCHEN BEREICH	8
II.1.3.2.3 BIOLOGISCHE DEKONTAMINATION MIT PLASMEN	9
II.1.3.3 PLASMAQUELLE	10
II.1.4 AUFLISTUNG DER VERWENDETEN MATERIALIEN	12
II.1.4.1 GERÄTE	12
II.1.4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	13
II.1.4.3 CHEMIKALIEN	14
II.1.4.4 GAS	14
II.2 EXPERIMENTELLES <i>IN VIVO</i> MODELL UND PRÄPARATIONSTECHNIK	15
II.2.1 EINFÜHRUNG	15
II.2.1.1 CHORIOALLANTOIS-MEMBRAN	15
II.2.1.2 HÜHNER-EMBRYONEN-TEST, HÜHNEREITEST AN DER CHORIOALLANTOIS-MEMBRAN UND HET-MN	15
II.2.2 BEBRÜTUNG DER EIER	16
II.2.3 PRÄPARATION DER EIER	17
II.2.4 EIN-/AUSSCHLUSSKRITERIEN	19
II.2.5 AUFBRINGEN DER IMPLANTATE AUF DIE CAM	19
II.2.6 OBERFLÄCHENMODIFIKATION DER IMPLANTATE MIT CAP	21

II.2.7 VERSUCHSGRUPPEN DER HAUPTVERSUCHSREIHEN	22
II.2.8 ZELLMARKIERUNG UND INTRAVITALMIKROSKOPIE	23
II.2.8.1 ZELLMARKIERUNG MIT HILFE EINES FLUORESCENZFARBSTOFFES	23
II.2.8.1.1 EINFÜHRUNG	23
II.2.8.1.2 VERSUCHSAUFBAU FÜR DIE INJEKTION	23
II.2.8.2 INTRAVITALMIKROSKOPIE	25
II.2.8.2.1 EINFÜHRUNG	25
II.2.8.2.2 VERSUCHSAUFBAU INTRAVITALMIKROSKOPIE	26
II.2.9. CHRONOLOGISCHER VERSUCHSABLAUF	28
II.2.10 PROTOKOLL	28
II.2.11 AUSWERTUNG	30
II.2.11.1 FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTE (FGD)	30
II.2.11.2 EINFÜHRUNG LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION (LEI)	31
II.2.11.3 GEMESSENE VARIABLEN DER LEI	32
II.2.11.3.1 GEFÄßDURCHMESSER	32
II.2.11.3.2 ANZAHL DER ROLLER (N_{ROLLER}) UND GESAMTZAHL DER LEUKOZYTEN ($N_{\text{WBCNON-STICKING}}$) PRO 30 S	33
II.2.11.3.3 ANZAHL DER STICKER	34
II.2.11.3.4 ZENTRALE FLIEßGESCHWINDIGKEIT [$\mu\text{m/s}$]	35
II.2.11.4 ERRECHNETE VARIABLEN	36
II.2.11.4.1 ANTEIL ROLLER (ROLLING COUNT) [%]	36
II.2.11.4.2 ZELLDICHTE DER STICKER [ZELLEN/ MM^2]	36
II.2.11.4.3 LEUKOZYTEN FLUX [ZELLEN/($\text{MM}^2 \cdot \text{s}$)]	36
II.2.11.4.4 BLUTFLUSS [PL/S]	37
II.2.11.4.5 SCHERRATE [1/S]	37
II.2.12 STATISTIK	38

III ERGEBNISSE **39**

III.1 VORVERSUCHE	39
III.2 VERSUCHE ZUR MODELLANWENDUNG	40
III.2.1 FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTE TITAN NATIV, NICKEL NATIV UND KONTROLLE	40
III.2.2 FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTE IN VERSCHIEDENEN ABSTÄNDEN ZUM CHIP	41
III.2.3 LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION TITAN NATIV, NICKEL NATIV UND KONTROLLE	43

III.3 ETABLIERUNG DES MODELLS UNTER ANWENDUNG VON CAP	45
III.3.1. FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTEN NICKEL NATIV UND NICKEL-CAP	45
III.3.2 LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION NICKEL NATIV UND NICKEL-CAP	46
III.3.3 FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTEN TITAN NATIV UND TITAN-CAP	48
III.3.4 LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION TITAN NATIV UND TITAN-CAP	49
IV DISKUSSION	51
<hr/>	
IV.1 METHODE	51
IV.1.1 EIGNUNG DES MODELLS	51
IV.1.1.1 BESONDERHEITEN UND UNTERSCHIEDE DER BLUTZELLEN DES HÜHNEREMBRYOS IM VERGLEICH ZU BLUTZELLEN DES SÄUGERS UND MÖGLICHE EINSCHRÄNKUNGEN IN BEZUG AUF DIE LEI	53
IV.1.1.1.1 KERNHALTIGE ZELLEN/KRITIK DER VERWENDUNG DES BEGRIFFS „LEUKOZYTEN-ENDOTHEL- INTERAKTION“	53
IV.1.1.1.2 PHAGOZYTOSE-EIGENSCHAFTEN DER BLUTZELLEN VON HÜHNEREMBRYONEN	54
IV.1.1.2 IMMUNKOMPETENZ DES HÜHNEREMBRYOS	55
IV.1.1.3 ZUSAMMENFASSUNG EIGNUNG DES MODELLS	57
IV.1.2 VERSUCHSPROTOKOLL	57
IV.1.2.1 ABLAUF VOR DEM BEBRÜTUNGSSTART	57
IV.1.2.2 VERSUCHSZEITPUNKT UND VERSUCHSPROTOKOLL	58
IV.1.3 VERWENDETE METALLE	59
IV.1.4 IMPLANTATION DER METALLCHIPS	59
IV.1.5 LEUKOZYTEN-FÄRBUNG	60
IV.1.6 AUSWERTUNG	60
IV.2 ERGEBNISSE	61
IV.2.1 ERGEBNISSE DER FGD	61
IV.2.2 ERGEBNISSE DER LEI	64
IV.3 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	67
V ZUSAMMENFASSUNG	69
<hr/>	
VI LITERATURVERZEICHNIS	70
<hr/>	

VII ANHANG	87
------------	----

VIII DANKSAGUNG	88
-----------------	----

Abkürzungsverzeichnis:

A	Fläche	Flux	Leukozyten Flux
A _{Kreis}	Kreisfläche	g	Gramm
A _{Mantel}	Mantelfläche	G	Gauge, Maßeinheit für den Außendurchmesser einer Kanüle, entspricht etwa 0,9 mm
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch	h	Stunde
BIC	Bone-To-Implant-Contact (Knochen-zu-Implantat-Kontakt)	HET	Hühner-Embryonen-Test
CAM	Chorioallantoismembran	HET-CAM	Hühnereitest an der Chorioallantoismembran
CAP	Cold Atmospheric Plasma (Kaltes Atmosphärendruckplasma)	HET-MN	Hühnereitest mit Mikronukleusinduktion
-COOH	Carboxylgruppe	HUVEC	Humane Umbilikalvenen Endothelzellen
cm	Zentimeter	ID	Inner Diameter (Innerer Durchmesser)
d	Durchmesser	IL-8	Interleukin-8
den _{Sticker}	Density Sticker (Zelldichte der Sticker)	IVM	Intravitalmikroskopie
DIN	Durch das Deutsche Institut für Normung festgelegte Norm	kHz	Kilohertz
et al.	Et alii (und andere)	kV	Kilovolt
etc.	Et ce-te-ra (und so weiter)	Kontrolle	Kontrollgruppe
FGD	Funktionelle Gefäßdichte	L	Länge
FGD _c	Funktionelle Gefäßdichte in unmittelbarer Nähe des Chips	l	Liter
FGD _z	Funktionelle Gefäßdichte zentral	LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
FGD _p	Funktionelle Gefäßdichte peripher	LSL	Lohmann Selected Leghorn (Hühnerrasse)
Flow	Blutfluss	m	Meter
		m ²	Quadratmeter

MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein		(Reaktive Sauerstoffspezies)
		RNS	Reactive Nitrogen Species
MHz	Megahertz		(Reaktive Stickstoffspezies)
min	Minute	RS	Reactive Species
μl	Mikroliter		(Reaktive Spezies)
μm	Mikrometer	s	Sekunde, Strecke
μM	Mikromolar	s.	siehe
ml	Milliliter	S.	Seite
mm	Millimeter	slm	Standard-Liter pro Minute
mm ²	Quadratmillimeter	s.o.	Siehe oben
n	Anzahl	SPF	Specified Pathogens free
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells (Nukleärer Transkriptionsfaktor der Kappa Leichtketten von aktivierten B-Zellen)		(Frei von spezifizierten Pathogenen)
		sr	Scheerrate
		t	Zeit
-NH ₂	Aminogruppe	THP-1	Zellreihe mit monozytären Eigenschaften
n _{Roller}	Anzahl Roller	Titan _{CAP}	Gruppe Titan mit CAP-Behandlung
n _{Sticker}	Anzahl der Sticker		
n _{WBCnon-sticking}	Gesamtzahl der Leukozyten ohne Sticker	TTP	Tissue Tolerable Plasma (Gewebeverträgliches Plasma)
Nickel _{CAP}	Gruppe Nickel mit CAP-Behandlung	TUM-CAM	Tumor-Chorio-Allantois-Membran
OD	Outer Diameter (Äußerer Durchmesser)	u.a.	Unter anderem
-OH	Hydroxygruppe	UV-Licht	Ultraviolettes Licht
OPS	Operationen- und Prozedurenschlüssel	VUV	Vakuumultraviolett
p	Peripher	v	Geschwindigkeit
pl	Pikoliter	v _{Blut}	Blutgeschwindigkeit
rc	Rolling Count (Anteil Roller)	VHS	Video Home System
ROS	Reactive Oxygen Species	Vol	Volumen

Vol.-%	Volumenprozent	Σ	Summe
vs.	Versus	π	Pi, Verhältnis von Kreisumfang zu Kreisdurchmesser
WBC	White Blood Cells (Weiße Blutkörperchen)		
WKW	Wasserkontaktwinkel	3R	„Replace“, „Reduce“ und „Refine“ (ersetzen, reduzieren, weiterentwickeln)
z	Zentral		
z.B.	Zum Beispiel		
°C	Grad Celsius		

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Implantate. Darstellung eines auf einem Deckglas fixierten konvexen Metallchips. Links schematische Darstellung im Querschnitt, rechts fotografische Aufsicht.....	5
Abbildung 2: Die „vier“ Aggregatzustände modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung des INP Greifswald e.V.....	6
Abbildung 3: kINPen® MED (Neoplas tools GmbH, Greifswald) Grundgerät mit Handgerät....	10
Abbildung 4: Beleuchtung der Hühnereier mit der Schierlampe. Links: Es ist eine deutliche Gefäßzeichnung sowie die Umriss des Embryos erkennbar. Rechts: Markieren der Luftblase.	18
Abbildung 5: Präparation der CAM. A: Entfernen der Eischale und der äußeren Schalenmembran im Bereich der Luftblase, B: Abziehen der inneren Eimembran, C: Aufsicht auf die CAM.	18
Abbildung 6: Metallchip an Deckglas fixiert. Links Deckglas mit 15 mm Durchmesser, rechts Deckglas mit 20 mm Durchmesser.	20
Abbildung 7: Metallchip nach erfolgreicher Implantation.....	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Metallchips und der Chorioallantoismembran ..	21
Abbildung 9: Oberflächenbehandlung eines Metallchips mit dem kINPen® MED.....	21
Abbildung 10: Mikromanipulator samt Injektionsvorrichtung.....	23
Abbildung 11: Mikrogaskanüle im Vergleich zu einer 20 G Kanüle.....	24
Abbildung 12: Versuchsaufbau Intravitalmikroskopie	27
Abbildung 13: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Rhodaminfilter B: Schematische Darstellung der ROI in unmittelbarer Nähe des Chips.	27
Abbildung 14: Chronologischer Versuchsablauf	28
Abbildung 15: Messung der Funktionellen Gefäßdichte links direkt am Chip, rechts zentral ..	30
Abbildung 16: Schritte der Leukozyten-Endothel-Interaktion, modifiziert nach Ley et al. (Ley et al. 2007)	32
Abbildung 17: Messung Gefäßdurchmesser	33
Abbildung 18: Schematische Darstellung Anzahl Leukozyten und Anzahl Roller.	34
Abbildung 19: Aufnahme mit Rhodamin-Filter, venöses Gefäß mit angefärbten Zellen des Blutstroms und Stickern.....	35

Abbildung 20: FGD direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle.	40
Abbildung 21: Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle	41
Abbildung 22: Funktionelle Gefäßdichte Nickel nativ, Einzelwertdarstellung, verschiedene Entfernungen zum Metallchip	42
Abbildung 23: Funktionelle Gefäßdichte Titan nativ, Einzelwertdarstellung, verschiedene Entfernungen zum Metallchip	42
Abbildung 24: Anteil Roller, Einzelwertdarstellung, Nickel, Titan nativ und Kontrolle	44
Abbildung 25: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel, Titan nativ und Kontrolle	44
Abbildung 26: Funktionelle Gefäßdichte direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP.....	45
Abbildung 27: Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP.....	46
Abbildung 28: Anteil Roller zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP.....	47
Abbildung 29: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP	47
Abbildung 30: Funktionelle Gefäßdichte direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP	48
Abbildung 31: Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP behandelt	48
Abbildung 32: Anteil Roller zentral, Einzelwertdarstellung Titan nativ und Titan-CAP.....	50
Abbildung 33: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP	50

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen der Hauptversuchsreihen.....	22
Tabelle 2: Versuchsprotokoll	29
Tabelle 3: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologische Variablen Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle	43
Tabelle 4: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologischer Variablen, Nickel nativ und Nickel-CAP	46
Tabelle 5: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologischer Variablen, Titan nativ und Titan-CAP	49
Tabelle 6: Angaben über Keimfreiheit der gelieferten Hühnereier (Valo BioMedia).....	87

I Einleitung

I.1 Vorbemerkung

Implantate finden heutzutage Anwendung in den unterschiedlichsten Teilgebieten der Medizin. In der Orthopädie und Unfallchirurgie kommen sie klassischerweise zur Stabilisierung von Frakturen oder als Ersatz für verschlissene oder beschädigte Gelenke zum Einsatz. Laut Daten des statistischen Bundesamtes handelte es sich bei der „Implantation einer Endoprothese am Hüftgelenk (OPS 5-820)“ mit insgesamt 239.204 durchgeführten Operationen um die sechst häufigste Operation bei vollstationär behandelten Krankenhauspatienten im Jahr 2018. Die „Implantation einer Endoprothese am Kniegelenk (OPS 5-822)“ rangierte mit insgesamt 190.427 Fällen im selben Zeitraum auf Platz 14 (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019). Diese Fallzahlen machen deutlich, welche medizinische und wirtschaftsethische Verantwortung der Entwicklung von Implantatmaterialien zukommt. Bei steigender Lebenserwartung und Aktivität im Alter sowie Ausweitung der Indikation für jüngere Patienten werden zudem höhere Ansprüche an die Haltbarkeit und Standzeiten von Implantaten gestellt.

Die durchschnittliche Standzeit eines Hüftimplantates lag 2006 bei etwa 15 Jahren (Sargeant et al. 2006). In Schweden wurde bei 4,7 % der Patienten im Beobachtungszeitraum von 2005 bis 2017 eine Reoperation nach Hüft-Totalendoprothesen-Operation durchgeführt (Kärrholm et al. 2018). Aspekte, die zum Implantatversagen führen sind u.a. Abrieb und Korrosion, Kapselbildung, Entzündungen und mechanische Ermüdung (Geetha et al. 2009). Dabei sind die häufigsten Ursachen des Implantatversagens bei Hüft-Endoprothesen die Osteolyse und aseptische Lockerung des Implantates (Sargeant et al. 2006). Implantat und Implantatlager beeinflussen sich dabei nach der Implantation gegenseitig: Das Implantat ist durch Chlorid-Ionen und die proteinhaltige Flüssigkeit der Korrosion ausgesetzt (Geetha et al. 2009). Abriebpartikel und gelöste Metallionen können das Immunsystem aktivieren und z.B. durch Stimulation von Osteoklasten über die Bildung von Osteolysen zur Lockerung des Implantates führen (Ingham et al. 2005, Sargeant et al. 2006). Um diese Effekte möglichst gering zu halten, sollten Implantate idealerweise neben besten mechanischen Eigenschaften auch ein hohes Maß an Biokompatibilität (Gewebevertäglichkeit) aufweisen. Seit den 1940er Jahren unterliegt der Begriff der Biokompatibilität von Implantaten einem steten Wandel.

So wurde zu Beginn für Langzeitimplantate ein möglichst inertes Material gefordert, welches weder kanzerogen, toxisch, reizend oder allergen wirksam sein sollte (Williams 2008). Eine aktuellere Definition der Biokompatibilität formulierte Williams 2008 folgendermaßen:

The biocompatibility of a long term implantable medical device refers to the ability of the device to perform its intended function, with the desired degree of incorporation in the host, without eliciting any undesirable local or systemic effects in that host. (Williams 2008)

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften bezüglich der Biokompatibilität, Biomechanik, Korrosionsresistenz und der guten Verarbeitbarkeit sind Titan und Titanlegierung weit verbreitete Implantatmaterialien (Liu et al. 2004). Aber auch diese können in ihren Eigenschaften weiter verbessert werden, um die Standzeiten von Implantaten zu verlängern: Sie zeichnen sich beispielsweise durch eine geringen Abriebresistenz aus (Long et al. 1998). Des Weiteren konnte ohne Oberflächenmodifikation bisher keine direkte Osteointegration im Sinne einer echten Adhäsion zwischen Knochen und Implantat beobachtet werden (Liu et al. 2004). Ein unzureichendes Anhaften der Osteoblasten auf Grund von inadäquaten Oberflächeneigenschaften kann zur Ausbildung einer Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Knochen mit der Folge von frühzeitiger Implantat-Lockerung führen (Nebe et al. 2013). Entscheidend für die Osteointegration und das klinische Ergebnis ist die initiale Stabilität und Passgenauigkeit des Implantates im Knochen: Mikrobewegungen von 500 µm zwischen Implantat und Knochen hemmten die Osteointegration und führten zur Ausbildung von fibrösen Membranen (Søballe et al. 1992). Es bedarf also weiterer Oberflächenmodifikationen im Sinne einer Bioaktivierung zur Verbesserung der Osteointegration durch Stimulation der lokalen Osteogenese (Knochenbildung) und des Knochenwachstums direkt auf der Implantatfläche (Awad et al. 2017). Vorteilhaft zeigen sich dabei Ansätze, die die Oberflächenenergie von Implantaten erhöhen (Zhao et al. 2005, Lai et al. 2010). Die Oberflächenbehandlung mit kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP, cold atmospheric plasma) scheint hierbei eine vielversprechende Option zu sein. Sie führte in verschiedenen Studien zu einer Erhöhung der Oberflächenenergie (Coelho et al. 2012, Guastaldi et al. 2013) sowie zu einem reduzierten Wasserkontaktwinkel, also hydrophileren Eigenschaften (Duske et al. 2012, Chen et al. 2013). *In vitro* konnte nach Oberflächenbehandlung mit CAP eine größere Kontaktfläche zwischen Osteoblast und Implantat im Sinne einer verbesserten

Biokompatibilität gezeigt werden (Duske et al. 2012). *In vivo* zeigte sich ein signifikant erhöhter Knochen-zu-Implantat-Kontakt (Coelho et al. 2012). Darüber hinaus konnte eine antibakterielle Wirkung der Plasmabehandlung selbst gegenüber multiresistenten Erregern gezeigt werden (Reuter et al. 2014). Handheld-Geräte zur Applikation von CAP bieten zudem die Möglichkeit, verschiedenste Materialien direkt vor der Implantation kostengünstig zu behandeln (Coelho et al. 2012).

Die Implantate wirken jedoch nicht nur auf das sie direkt umgebene Knochengewebe. Entscheidend für die Untersuchung der Biokompatibilität ist auch die Reaktion des umliegenden Weichteilgewebes sowie der lokalen und systemischen Immunreaktion (Walschus et al. 2011). Zur Untersuchung der Plasma-Effekte auf lokaler und systemischer Ebene bedarf es daher weiterer Studien. Die bisherigen Erkenntnisse über Implantat-Zell-Interaktionen stammen entweder aus *in vitro* Modellen oder aus Tierversuchen. Letztere liefern bereits sowohl lokale als auch systemische Daten, sind jedoch sowohl in der Vorbereitung als auch in der Durchführung langwierig und kostenintensiv. In Anbetracht der diversen Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation unter denen die Plasmamodifikation nur ein Beispiel darstellt, mangelt es derzeit an Modellen, die die Wirkung der Implantate auf das umliegende Gewebe in einem *in vivo* 3-Kompartimenten-Modell kostengünstig und quantitativ untersuchen können. Im Sinne des 3R-Prinzips („Replace“, „Reduce“ und „Refine“) (Russell et al. 1959) sollte dabei auch aus ethischen Gründen nach Alternativen zu klassischen Tiermodellen gesucht werden. Ideal wäre hier ein Screening-Modell, welches bereits vor dem eigentlichen Tierversuch verlässliche Aussagen über die Biokompatibilität und die zu erwartende Immunreaktion liefert und so einen Zwischenschritt zwischen *in vitro* Zellkultur und *in vivo* Tierversuch darstellt.

I.2 Zielsetzung

1. Entwicklung eines neuen *in vivo* Modells zur schnellen Evaluation der Eignung von Implantat-Materialien.
 - Weiterentwicklung des Hühnerei-Test an der Chorio-Allantois-Membran (HET-CAM) zur qualitativen und quantitativen intravitalmikroskopischen Analyse der Auswirkung von Implantaten auf die Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion.

2. Anwendung des neu entwickelten *in vivo* Modells mit dem Ziel, die Reaktionsbreite des Modells zu untersuchen.
 - Es erfolgte die Analyse der Effekte von Nickel- und Titan-Implantaten auf die Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion.
3. Etablierung des neu entwickelten *in vivo* Modells unter Anwendung von CAP
 - Die zu implantierenden Metallchips wurden direkt vor der Implantation mit CAP zur Oberflächenmodifikation behandelt.
 - Anschließend erfolgte die Analyse der Effekte von Nickel-CAP und Titan-CAP Implantaten auf die Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion.

II Material und Methoden

II.1 Material

Zum Zweck des besseren Leseflusses sind die Herstellerangaben der verwendeten Materialien im Kapitel II.1.4 „Auflistung der verwendeten Materialien“ alphabetisch aufgelistet.

II.1.1 SPF Eier

Für die Versuche wurden keimfreie Hühnereier (VALO-SPF, specified pathogens free) der Rasse Lohmann Selected Leghorn (LSL), der VALO BioMedia GmbH, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland verwendet. Jede Lieferung enthielt ein individuelles Attest zur Bestätigung der Keimfreiheit (s. Anhang). Es standen insgesamt $n = 230$ Eier zur Verfügung. Vom Hersteller wurde eine Befruchtungsquote von 85 % garantiert. Die Hühnereier hatten je ein Gewicht von 65-73 g. Die Eier einer Lieferung wurden jeweils innerhalb von sieben Tagen vor der Versendung gelegt. Der Transport fand unter einer Temperatur von 15-18 °C statt.

II.1.2 Implantate

Es wurden speziell für den vorliegenden Versuchsaufbau gefertigte halbkonvexe Metallchips der Gentner GmbH, Tuttlingen (Hersteller für Hochwertige Dreh- und Frästeile für die Medizintechnik und den Maschinenbau) mit einem Durchmesser von 4 mm verwendet. Zum Einsatz kamen reines Titan, welches seit Jahrzehnten in der Implantat-Chirurgie Verwendung findet, und reines Nickel, für das *in vivo* eine starke Korrosion und Entzündungsreaktion

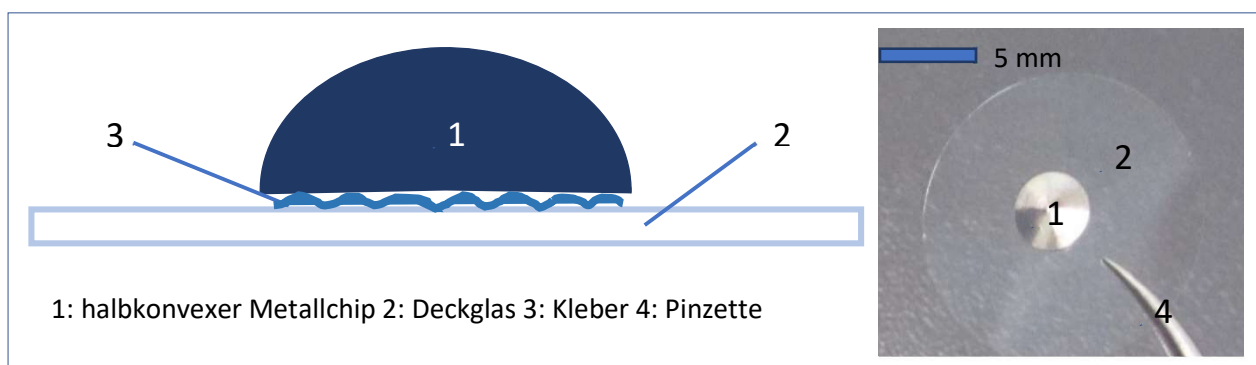


Abbildung 1: Implantate. Darstellung eines auf einem Deckglas fixierten konvexen Metallchips. Links schematische Darstellung im Querschnitt, rechts fotografische Aufsicht.

gezeigt wurde (McNamara et al. 1981, McNamara et al. 1982) . Obwohl reines Nickel daher als Implantatmaterial ungeeignet ist, wurde es verwendet, um die maximale Reaktionsbreite der (patho-)physiologischen Reaktion des Modells zu untersuchen. Die verwendeten Nickel-Metallchips hatten ein Eigengewicht von 0,03725 g, die Titan-Metallchips von 0,01695 g. Die Implantate wurden für die Hauptversuche auf einem Deckglas (d=15 mm) mit Ethyl-Cyanoacrylate-Kleber fixiert (vgl. (Sckell et al. 2009), siehe Abbildung 1) und anschließend dampfautoklaviert.

II.1.3 Einführung zu den Begriffen Plasma, Plasmamedizin und Plasmaquelle

II.1.3.1 Plasma

Der Begriff Plasma bezieht sich in dieser Arbeit auf ein physikalisches Plasma, das heißt ein ionisiertes Gas, welches auch als sogenannter vierter Aggregatzustand beschrieben wird. Schon 1816 hatte Faraday die theoretische Möglichkeit eines solchen leuchtenden vierten Aggregatzustands postuliert (Jones 1870). 1928 prägte dann Langmuir den Begriff Plasma (griechisch πλάσμα, plásma „Gebilde“) für die Beschreibung eines ionisierten Gases, bestehend aus Ionen und Elektronen, deren Gesamtladung ausgeglichen ist (Langmuir 1928).

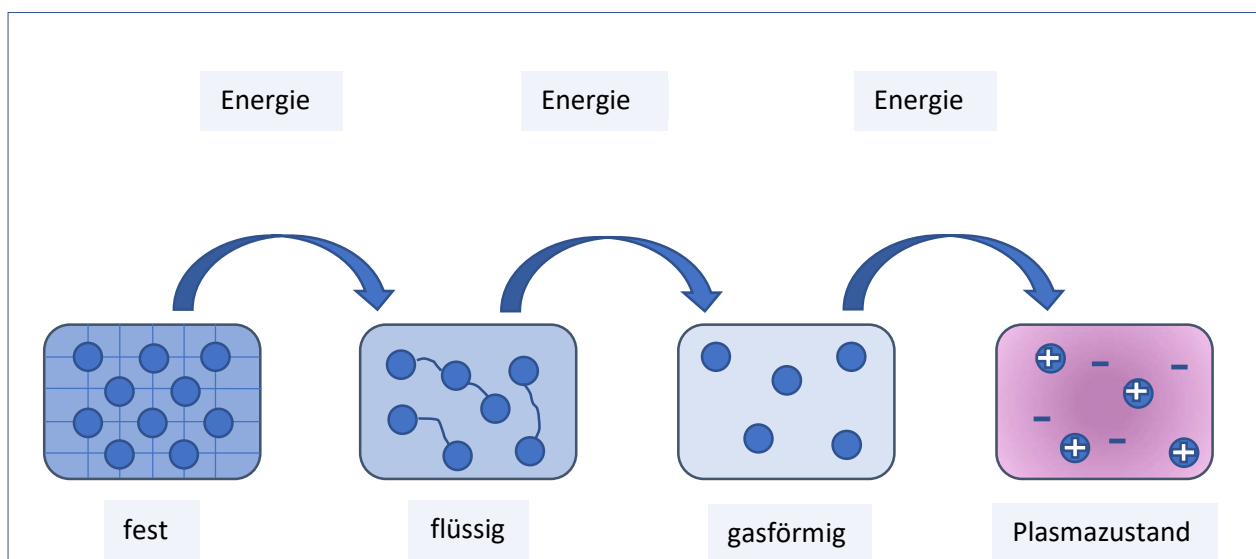


Abbildung 2: Die „vier“ Aggregatzustände modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung des INP Greifswald e.V.

Insgesamt befinden sich über 99 % der sichtbaren Materie des Universums im Plasmazustand (Spatschek 1990). Natürlich vorkommende Plasmen sind hierbei zum Beispiel Blitze, Polarlichter und der Sonnenwind. Aber auch Sterne, wie unsere Sonne, befinden sich im Plasmazustand (Piel 2010).

Künstlich hergestellte Plasmen werden beispielsweise durch elektrische Energiezufuhr eines ansonsten biologisch inerten Gases erzeugt. Hierdurch entstehen ionisierte Atome und Moleküle, die durch Interaktion mit der Umwelt (Luft, Flüssigkeit und Oberflächen) reaktive Spezies wie ROS und RNS bilden sowie UV-Licht/VUV-Strahlung, sichtbares Licht, Infrarot, Wärme, elektrische und magnetische Felder emittieren (von Woedtke et al. 2014).

II.1.3.2 Einführung in die Plasmamedizin

Die Erzeugung von Plasmen unter Atmosphärendruck und niedrigen Temperaturen (CAP) war ein Meilenstein in der Entwicklung der Plasmatechnik. Hierdurch wurde die Anwendung von Plasmen an sensiblen Materialien und lebenden Organismen ermöglicht und es öffnete sich ein weites Feld möglicher medizinischer Anwendungen. Dieses Feld lässt sich in drei teilweise überschneidende Hauptanwendungsbereiche, die therapeutische Anwendung, die Oberflächenmodifikation und die biologische Dekontamination, aufteilen (Gerling a) et al. 2016).

II.1.3.2.1 Therapeutische Anwendungsbeispiele

Der Begriff gewebeverträgliches Plasma (TTP, tissue tolerable plasma) wurde von Kramer et al. für Niedertemperatur-Plasmen mit möglicher medizinischer Verwendung geprägt (Kramer et al. 2009). Inzwischen hat sich jedoch die Bezeichnung CAP durchgesetzt. CAP findet unter anderem Anwendung in der Dermatologie. Anwendungsgebiete sind zum Beispiel die Therapie von Ekzemen und chronischen Wunden wie dem Ulcus cruris als alternative Therapieoption zu chirurgisch-ablativen Verfahren. Hierbei spielen u.a. Effekte der Wunddesinfektion sowie die Stimulation der Angiogenese (Kalghatgi et al. 2010) eine entscheidende Rolle. Weitere Informationen hierzu bietet der Übersichtsartikel von Emmert et al. (Emmert et al. 2013). Außerdem zeigen sich vielversprechende Optionen der Plasmaanwendung im Bereich der Therapie maligner Tumoren: Hierbei könnte die direkte Behandlung mit Plasma durch Stimulation der Apoptose maligner Zellen die Radikalität der chirurgischen Intervention unterstützen und gleichzeitig die Nekrosebildung reduzieren

(Partecke 2016). Die apoptotische Wirkung auf Tumorzellen wurde bereits für etliche Zellreihen, hierunter Hirntumoren, Lungentumoren, Tumoren der Haut, des Gastrointestinaltrakts sowie gynäkologische Tumoren, nachgewiesen. Eine Übersicht der Zellreihen und Literatur findet sich bei Seebauer et al. (Seebauer et al. 2016). Unter palliativen Therapiebedingungen konnte bei der Anwendung von CAP zur Dekontamination von ulzerierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eine Reduzierung der Keimlast und dem damit verbundenen unangenehmen Geruch gezeigt werden. Teilweise kam es auch zu oberflächlichen partialen Remissionen (Metelmann et al. 2015).

Auf der anderen Seite zeigen sich vielversprechende Ergebnisse im Bereich der Gewebeverträglichkeit von CAP:

Bender et al. etablierten den HET-CAM-Test (s. Kapitel II.2.1.2 „Hühner-Embryonen-Test, Hühnereitest an der Chorioallantois-Membran und HET-MN“) zur Untersuchung des Irritationspotentials von CAP: Hierbei zeigte sich für gepulstes CAP, wie es beispielsweise durch die im Weiteren beschriebene Plasmaquelle kINPen® MED erzeugt werden kann, das geringste Irritationspotential. Wobei die gemessenen Irritationen je nach Intensität nach 24 h teilweise oder vollständig reversibel waren (Bender et al. 2010, Bender et al. 2011, Bender 2012). Kluge et al. führten Studien zur Mutagenität von Plasma mit Hilfe des HET-MN durch (s. Kapitel II.2.1.2 „Hühner-Embryonen-Test, Hühnereitest an der Chorioallantois-Membran und HET-MN“). Hierbei konnten sie auch bei Anwendungsdosen, die fünf- bis zehnfach über der vorgesehenen Anwendungsdosis lagen, kein genotoxisches Potential bei Verwendung des kINPen® MED nachweisen (Kluge et al. 2016). Ebenso zeigen Hautverträglichkeitsuntersuchungen und der Einsatz von CAP in *in-vivo* Studien vielversprechende Ergebnisse (Fluhr et al. 2012, Kramer et al. 2013). In einer Langzeit-Follow-Up Studie nach Wund-Plasmabehandlung von immunkompetenten Mäusen zeigte sich 350 Tage nach Plasmaanwendung kein Anhalt für die Entstehung von Neoplasien oder eine Veränderung des Immunsystems (Schmidt et al. 2017).

II.1.3.2.2 Plasma zur Oberflächenmodifikation im medizinischen Bereich

Seit Jahrzehnten ist die Verbesserung von Oberflächeneigenschaften durch Plasmabehandlung Teil der medizinischen Forschung (von Woedtke et al. 2014). Schon in den 1970-1980er Jahren kamen Niederdruckplasmen zur Sterilisation zum Einsatz. Hierbei

handelte es sich jedoch eher um Plasma-gestützte Sterilisationsverfahren, da die verwendeten Trägergase zum Teil selbst germizid waren (Laroussi 2005). Inzwischen wurden Methoden zur Sterilisation von Oberflächen mit Niederdruckplasmen und CAP unter Verwendung nicht-germizider Trägergase (M. Moisan et al. 2001, Laroussi 2005, Lackmann et al. 2013) entwickelt. Des Weiteren wurde der Einsatz von Niederdruckplasmen und CAP zur Oberflächen-Reinigung/-Modifikation (Aronsson et al. 1997, Chen et al. 2013, Cools et al. 2014) und Bioaktivierung (Coelho et al. 2012, Nebe et al. 2013) untersucht. So konnte in Studien beispielsweise eine Reduktion des Wasserkontaktwinkels (WKW) und damit eine Verbesserung der Hydrophilie nach Plasmabehandlung gemessen werden (Monetta et al. 2011, Duske et al. 2012, Chen et al. 2013). Hierbei wird die Hydrophilie durch Bildung von polaren Gruppen wie beispielsweise -NH_2 , -OH und -COOH positiv beeinflusst (Favia et al. 1998). Der WKW korreliert mit der Oberflächenenergie. Mit Hilfe des WKW lässt sich die Oberflächenenergie daher näherungsweise bestimmen. Oberflächen mit einem WKW $> 90^\circ$ gelten als hydrophob, $< 90^\circ$ als hydrophil (Cheng et al. 2016). Für Titanoberflächen mit einer künstlich gesteigerten Hydrophilie ließ sich eine verbesserte Osteointegration im Vergleich zu unbehandelten Titanoberflächen sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien nachweisen (Schwarz et al. 2009, Lang et al. 2011). Mit CAP behandelte Oberflächen zeigten *in vitro* und *in vivo* eine verbesserte Zellausbreitung (spreading) sowie ein besseres Einwachsverhalten (Coelho et al. 2012, Duske et al. 2012).

II.1.3.2.3 Biologische Dekontamination mit Plasmen

Auch im Bereich der Dekontamination gibt es eine große Zahl an möglichen oder bereits erfolgreichen Anwendungen, wie beispielsweise Sterilisation und Aufbereitung von Medizinprodukten, Sanierung von Schimmelpilzbefall, aber auch die Reinigung von Lebensmitteln, der Innenraumluft und von Abwässern (Kramer et al. 2016). Von besonderem Interesse ist hierbei auch der Einsatz gegen multiresistente Keime und die Anwendung an Biofilmen (Fricke et al. 2012, Jablonowski et al. 2017). Die Anwendung von CAP in Kombination mit einer mechanischen Reinigung scheint zudem eine vielversprechende Option bei der Behandlung von mit Biofilm kontaminierten rauen Titanoberflächen insbesondere in Hinblick auf die anschließende Osseointegration zu sein (Duske et al. 2015). Aufgrund der komplexen und weniger spezifischen Wirkweise des CAP im Vergleich zu herkömmlichen antibiotischen Substanzen (M. Moisan et al. 2001, Daeschlein et al. 2014) scheint eine

Resistenzbildung zudem unwahrscheinlich (Zimmermann et al. 2012). Matthes et al. konnten nach wiederholter Anwendung von CAP bei *Staphylococcus aureus* in Biofilmen keine Resistenzentwicklung feststellen (Matthes et al. 2014). Es ist jedoch denkbar, dass Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber des durch Plasma emittierten oxidativen Stresses entwickeln könnten (Poole 2012, Kramer et al. 2016).

II.1.3.3 Plasmaquelle

Inzwischen stehen diverse unterschiedliche Plasmaapplikationsformen zu Verfügung, hierunter Barriere Entladung, Corona Entladung, Mikroplasma sowie der im Weiteren erläuterte Plasmajet. Für weitere Informationen zu den Plasmaquellen und ihrer möglichen

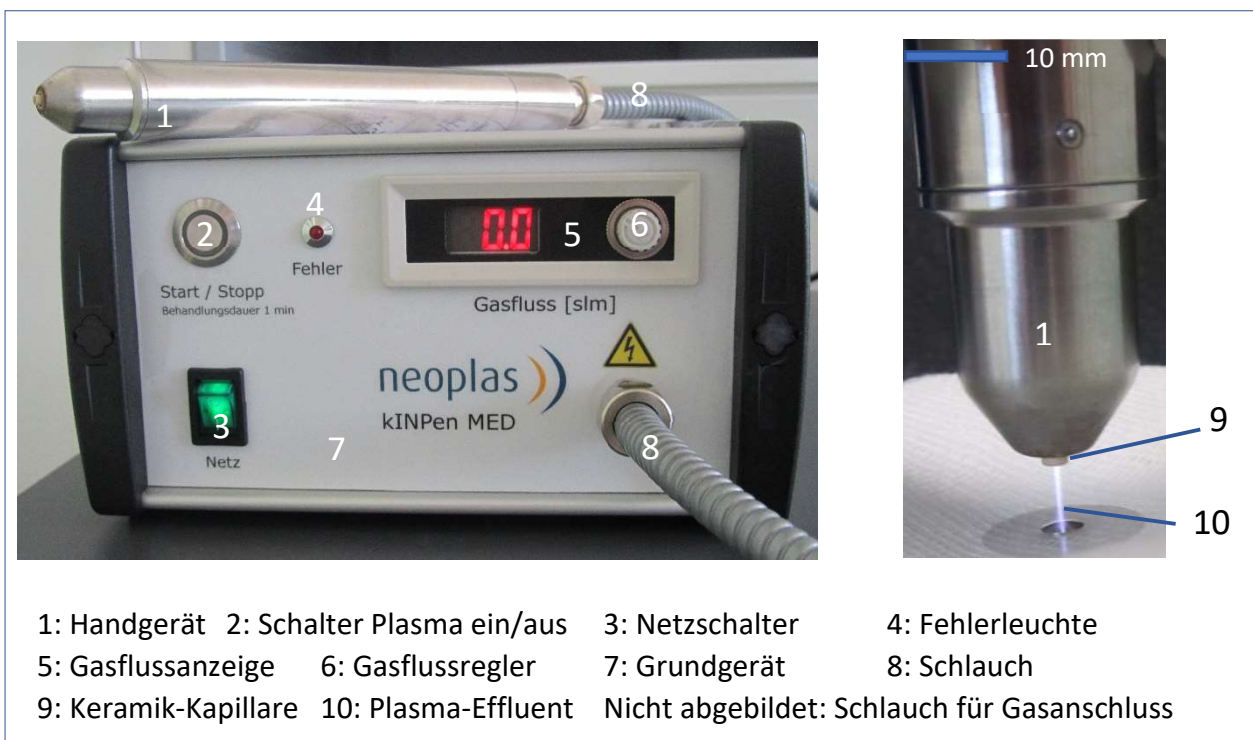


Abbildung 3: kINPen® MED (Neoplas tools GmbH, Greifswald) Grundgerät mit Handgerät

medizinischen Anwendung wird auf Gerling et al. verwiesen (Gerling et al. 2016). Zur Behandlung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Implantate wurde der kINPen® MED (Neoplas tools GmbH, Greifswald) eingesetzt (s. Abbildung 3). Dieser ist ein seit 2013 zur medizinischen Anwendung zugelassenes Kaltplasma-Gerät der Klasse 2a (DIN EN ISO 13485:2012, Konformitätserklärung Medcert GmbH, Hamburg, Deutschland). Es handelt sich

um eine mit 2,5 kHz gepulste Plasmajetquelle mit einer Plasma on/off-Zeit von 1:1 (Bekeschus et al. 2016). Mit dem Trägergas Argon wird ein kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP, cold atmospheric plasma) erzeugt. Der Jetaufbau besteht aus einer zentralen Nadelelektrode mit Hochspannungspotential, die von einer Keramik-Kapillare umgeben und so dielektrisch von dem sie umgebenden Mantel auf Massenspotential abgeschirmt ist. Das Trägergas durchfließt die Kapillare mit einem, am Grundgerät einstellbaren, konstanten Gasfluss (Gerling et al. 2016, Schönebeck 2016). Hierbei wird dem Trägergas durch Anlage einer sinusoidalen Wechselspannung (2-6 kV) mit einer Frequenz von 1,0-1,1 MHz an die zentrale Nadelelektrode Energie zugeführt. Der sichtbare Anteil des Plasmas (Plasma-Effluent) ist dabei ca. 9-12 mm lang und 1 mm im Durchmesser. Im empfohlenen Verwendungsabstand von 9-11 mm beträgt die Temperatur des erzeugten Plasmas ca. 35-38 °C (Bekeschus et al. 2016). Für die vorgestellte Studie wurde 99,9 % Argongas sowie ein Gasfluss von 5 slm verwendet.

II.1.4 Auflistung der verwendeten Materialien

Zum Zwecke des besseren Leseflusses sind die Herstellerangaben der verwendeten Materialien im Folgenden alphabetisch aufgelistet und werden im Text nicht weiter aufgegriffen.

II.1.4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutmaschine Thermo-Star 310 Bestehend aus Vorbrüter (mit Rotationsfunktion) und Schlupfbrüter (ohne Rotationsfunktion)	J. Hemel Brutgeräte GmbH&CoKG, Verl
Canon Macro lens EF 100 mm 1:2.8 USM	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Canon EOS 500D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Eierhalterung	Eigenbau, Medizintechnik Universitätsmedizin Greifswald
Intravital-Mikroskop Axiotech 100 vario	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Objektiv Achroplan 20x	
kINPen® MED	Neoplas tools GmbH, Greifswald
LED-Schierlampe Powerflash	J.Hemel Brutgeräte GmbH&CoKG, Verl
MELAG Autoklav 24	MELAG Medizintechnik oHG, Berlin
Novaflex ,FO-150 , 150W	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA
OP-Mikroskop, PZMIII BS	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe, HOB 50/AC	OSRAM GmbH, München
S/W-Monitor, 14", Typ: PVM-146mod.	Ikegami Electronics (Europe) GmbH, Neuss
S-VHS-Cassette Recorder AG-4700	Panasonic Deutschland, Hamburg

S-VHS-Recorder NV-SV120	Panasonic Deutschland, Hamburg
S-VHS-Recorder SR-S388E	JVCKENWOOD Deutschland GmbH, Bad Vilbel
TV-Adapter 60C 1/2" 0,5x	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Waage MC1 Analytic AC 120S	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeplatte	Eigenbau, Medizintechnik Universitätsmedizin Greifswald

II.1.4.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser Stärke No. 1 rund: d=15 mm d=20 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Ethyl-Cyanoacrylate-Kleber Pattex® Unirapide	Henkel AG&Co, Düsseldorf
Gewebekulturschalen, steril 100 mm x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Injektions- und Infusionsfilter 0,2 µm Luer/Lock	HVM Filtramed GmbH, Rotenburg a. d. F.
Insulin-Spritze 1 ml, BD Plastipak™	BD, Heidelberg
Kanüle 20 G, Microlance™ 3	BD, Heidelberg
Klarsichtschlauch Stericlin® 5 cm	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen
Leukoplast® hospital 1,25 cm x 9,2 m	BSN medical GmbH, Hamburg
Mikroglaskanüle, Typ ICSI with spike, straight, ID=10 µm, L=55 mm	BioMedical Instruments, Zöllnitz
Mull-Kompresse, steril, 10 cm x 10 cm	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter
Polythene Tubing 0,75 mm ID, 1,22 mm OD	Smith Medical International, Kent (UK)
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Röhrchen 45 ml, Falcon	BD, Heidelberg
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Spritze 10 ml, BD Plastipak™	BD, Heidelberg
Spritze 10 ml, BD Discardit™	BD, Heidelberg
Tegaderm™ Film 4,4 cm x 4,4 cm	3M Deutschland GmbH, Neuss
VHS-Cassette 4 h	Imation Europe B.V., Schiphol, Niederlande

II.1.4.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol 70 Vol.-%	Universitätsapotheke Greifswald
Formaldehydlösung 4,5 % pH 7	Universitätsapotheke Greifswald
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rhodamine 6G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

II.1.4.4 Gas

Gas	Hersteller
Argon 99,9 % , ALPHAGAZ™ 1 ARGON P0021S10R2A001	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf

II.2 Experimentelles *in vivo* Modell und Präparationstechnik

II.2.1 Einführung

II.2.1.1 Chorioallantois-Membran

Die Chorioallantois-Membran (CAM) des Vogelembryos ist in ihrer Funktion am ehesten mit der Plazenta der Säugetiere vergleichbar. Sie wird aus dem Chorion und der Allantois durch Verschmelzung gebildet. Somit besteht sie aus drei Schichten, dem Ektoderm (Chorion), dem Mesoderm (Chorion und Allantois) und Endoderm (Allantois). Es handelt sich um eine stark vaskularisierte Membran, die durch jeweils zwei umbilikale Venen und Arterien versorgt wird (Bellairs et al. 2014). Am Tag zehn bis zwölf nach Bebrütungsbeginn ist die CAM vollständig entwickelt und versorgt den Hühnerembryo mit Sauerstoff und dient dem Gasaustausch bis an Tag 19 die pulmonale Ventilation beginnt (Romanoff 1952, Rahn et al. 1974). Zudem übernimmt die CAM im Verlauf der Entwicklung des Embryos den aktiven Transport von Calcium und weiteren Nährstoffen von der Eischale in den embryonalen Kreislauf (Terepka et al. 1969, Tuan 1980, Packard 1994). Die Allantois dient außerdem der Aufbewahrung der Exkretionen des Hühnerembryos (Kühnel 1961).

Es finden sich diverse Versuchsprotokolle unter Verwendung der CAM als hochsensible Membran sowohl *in ovo* als auch *ex ovo*. Bereits 1911 gelang die erste Anzüchtung von Tumorzellen auf der CAM (Rous et al. 1911). Untersuchungen an der CAM finden Anwendung in der toxikologischen und pharmakologisch-therapeutischen Forschung sowie bei der Analyse von Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung (Ribatti 2016).

II.2.1.2 Hühner-Embryonen-Test, Hühnereitest an der Chorioallantois-Membran und HET-MN

Der Hühner-Embryonen-Test (HET) wurde bereits in den 1980er Jahren zur Untersuchung der Embryotoxizität, der Teratogenität und der systemischen Toxizität eingesetzt (Kemper et al. 1986). Durch Weiterentwicklung dieser Methode etablierten Luepke et al. den Hühnereitest an der Chorioallantois-Membran (HET-CAM) als Alternativ-Methode zu *in vivo* Schleimhaut-

Irritations-Tests im Tiermodell (Luepke 1985). Ab 1988 erfolgte beispielsweise in Deutschland eine großangelegte Validitätsstudie zur Überprüfung von Alternativen zum Draize-Test am Kaninchenauge (Draize et al. 1944). Unter Verwendung eines Alternativprotokolls nach Kalweit et al. und Spielmann et al. (Kalweit et al. 1990, Spielmann et al. 1991) konnte der HET-CAM als eine anerkannt validierte Alternative zur Analyse des Irritationspotenzial reizender Chemikalien bestätigt werden (Spielmann et al. 1993). Somit trägt das HET-CAM-Modell bereits zur Reduktion von Tierversuchen im Sinne der 3R („Replace“, „Reduce“ und „Refine“) bei. 1997 etablierten Wolf und Luepke den HET-MN (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, Hühereitest für Mikronukleusinduktion) als Methode zur Untersuchung der Genotoxizität (Wolf et al. 1997). Sowohl der HET-CAM als auch der HET-MN haben bereits Anwendung in der Untersuchung der Verträglichkeit von CAP gefunden (Bender et al. 2010, Kluge et al. 2016). Ardlin et al. haben bereits das Irritationspotential von Metallionen-Lösungen mit Hilfe des HET-CAM untersucht (Ardlin et al. 2005). Ergänzend dazu kommen, in der hier vorgestellten Studie zur Anwendung/Etablierung eines neuen Modells zur Untersuchung der Wirkung von Implantaten auf die Mikrozirkulation, erstmals solide Metall-Testagenzien zum Einsatz.

II.2.2 Bebrütung der Eier

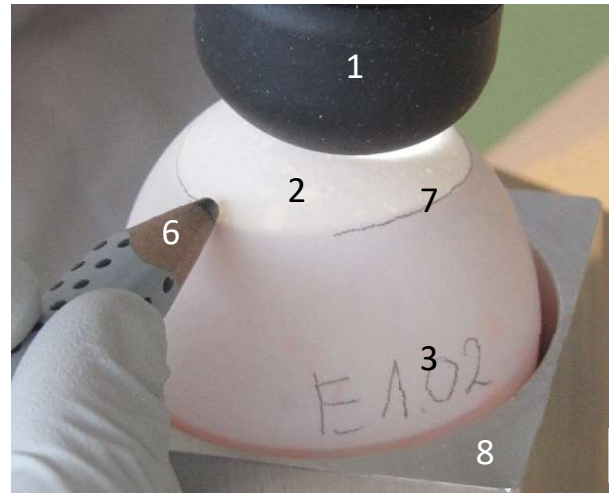
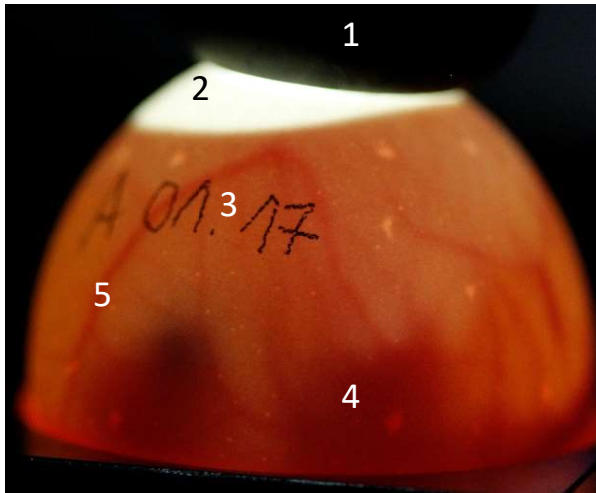
Nach Lieferung der befruchteten Hühnereier (Valo biomedica GmbH) wurden diese aus dem Transportkarton genommen und der Zustand der Eischale kontrolliert. Durch den Transport beschädigte Hühnereier mit Rissen an der Schale wurden aussortiert (insgesamt n = 10, dies entspricht 4,3 % des gesamten Lieferumfangs bei einer Gesamtzahl n = 230). Vor Bebrütungsstart wurden die Hühnereier dann zunächst nach Empfehlung des Herstellers bei Raumtemperatur gelagert. Für die Versuchsreihen wurden die Hühnereier frühestens am Folgetag der Lieferung, spätestens aber am vierten Tag nach Lieferung zur Bebrütung in einen automatisierten Vorbrüter (J. Hemel Brutgeräte GmbH) eingesetzt. Die Eier wurden bei einer Temperatur von 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % im Rotationsmodus bebrütet, dabei orientierten wir uns an Kalweit et al. (Kalweit et al. 1990). Der Rotationsmodus war so eingestellt, dass die Eier für zwei Stunden langsam in eine Richtung rotierten und dann für eine Stunde ruhen konnten. So ergaben sich pro Tag acht Rotationsphasen. Die Rotation soll die natürliche Bewegung der Eier durch den Muttervogel imitieren. Die Bebrütung vom ersten bis achten Tag erfolgte im Vorbrüter. Am neunten Bebrütungstag wurden die Eier mit dem

stumpfen Pol, an welchem sich eine Luftblase befindet, nach oben aufgestellt und anschließend ohne Rotationsmodus für weitere 24 h im Schlupfbrüter (J. Hemel Brutgeräte GmbH) bebrütet. Dies führte zur Anlagerung der CAM unmittelbar unter die Luftblase. Nach erfolgter Präparation und Implantation der unterschiedlichen Metalle am zehnten Bebrütungstag (siehe hierzu Kapitel II.2.3 „Präparation der Eier“ und II.2.5 „Aufbringen der Implantate auf die CAM“) wurden die Eier ebenfalls mit dem stumpfen Pol nach oben für weitere 24 h im Schlupfbrüter bebrütet. Es erfolgte demnach eine durchgehende Bebrütung der Hühnereier, die nur zum Zweck der Implantation und der mikroskopischen Untersuchung unterbrochen wurde. Während der Präparation und Implantation wurde die Temperatur der Hühnereier mit einer hierfür entworfenen Vorrichtung aus einer Wärmeplatte und einer Metalleierhalterung konstant gehalten.

Nach jeder Experimentalreihe wurden der Brutschrank, sowie die Brutschieber mit Terralin® wischdesinfiziert.

II.2.3 Präparation der Eier

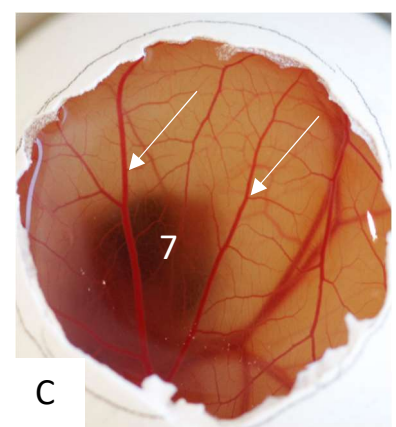
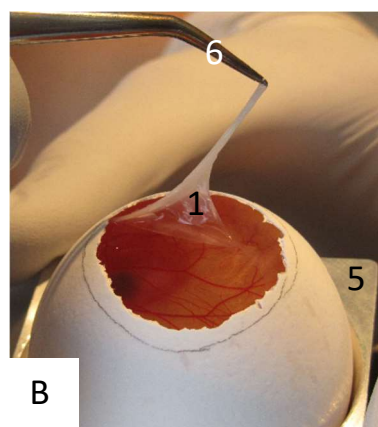
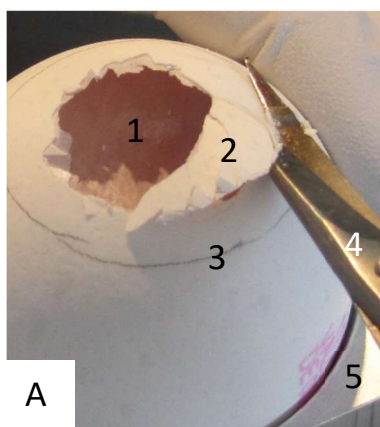
Am zehnten Bebrütungstag erfolgte nach Vinardell (Vinardell et al. 1994) die Präparation der Eier am stumpfen Pol im Bereich der Luftblase zur Darstellung der CAM. Mit Hilfe einer Schierlampe wurde zunächst der Vitalitätszustand der Eier überprüft. Nicht belegte sowie tote Hühnereier wurden aussortiert. Als nicht belegte Eier wurden dabei Eier eingestuft, die keinerlei Gefäßzeichnung aufwiesen. Diese Anzahl betrug $n = 14$ (6,1 %) bei einem Gesamtlieferumfang von $n = 230$ und lag damit in dem vom Hersteller garantierten Bereich. Die Anzahl nicht vitaler Eier am zehnten Bebrütungstag betrug $n = 31$ (13,5 %). Diese Eier zeigten im Vergleich zu den nicht belegten zumindest ein rudimentär angelegtes Gefäßnetz, enthielten aber keinen oder einen nicht vitalen Hühnerembryo. Unter Beleuchtung mit einer Schierlampe wurde mit einem Bleistift die Begrenzung der Luftblase auf der Eischale markiert (s. Abbildung 4). Danach wurden die Eier mit 70 %igem Ethanol wischdesinfiziert und die Eischale anschließend mit Hilfe einer 20 G Kanüle am stumpfen Pol geöffnet. Die weitere



- 1: Schierlampe 2: Luftblase 3: Identifikationsnummer des Eies 4: Umriss des Hühnerembryos
 5: durchscheinende Gefäße der CAM 6: Bleistift
 7: Markierung der Luftblasengrenze 8: Eihalterung

Abbildung 4: Beleuchtung der Hühnereier mit der Schierlampe. Links: Es ist eine deutliche Gefäßzeichnung sowie die Umriss des Embryos erkennbar. Rechts: Markieren der Luftblase.

Präparation erfolgte mit Hilfe von Schere und Pinzette indem zunächst spiralförmig die Öffnung erweitert wurde (s. Abbildung 5 A) und abstehende Eischalenreste mit der Pinzette vorsichtig entfernt wurden. Hierbei war stets darauf zu achten, dass genügend Abstand zu der zuvor markierten Luftblasengrenze gehalten wurde, da sonst abbrechende Eischalenstückchen die innere Eimembran und die CAM peripher verletzt hätten. Ein Abstand von etwa 1 mm war dazu ausreichend. Nachdem die Eischale und die äußere Schalenmembran entfernt waren, wurde die innere Schalenmembran mit 200 µl NaCl 0,9 % befeuchtet und



- 1: Innere Eimembran 2: Eischale und äußere Schalenmembran 3: Markierung der Luftblasengrenze 4: Schere 5: Eihalterung 6: Pinzette 7: Embryo
 Pfeile: Gefäße der CAM

Abbildung 5: Präparation der CAM. A: Entfernen der Eischale und der äußeren Schalenmembran im Bereich der Luftblase, B: Abziehen der inneren Eimembran, C: Aufsicht auf die CAM.

anschließend mit einer Pinzette zunächst peripher punktiert und dann spiralförmig abgezogen (s. Abbildung 5 B). Der zentrale Abschnitt der freigelegten CAM (s. Abbildung 5 C) diente als Implantatlager der in Kapitel II.1.2 „Implantate“ beschriebenen Implantate.

II.2.4 Ein-/Ausschlusskriterien

Insgesamt standen für die Versuche $n = 230$ Eier zur Verfügung. Von den Versuchen ausgeschlossen wurden beim Transport beschädigte, nicht belegte oder am zehnten Bebrütungstag nicht vitale Eier (s.o. zusammen $n = 55$, 23,9 %). Lufteinschlüsse in der CAM oder größere Blutungen nach Präparation führten ebenfalls zum Ausschluss. Außerdem wurden nur Hühnereier eingeschlossen, bei denen die CAM ausreichend entwickelt war, d.h. die eröffnete Fläche vollständig von der CAM ausgefüllt war. Des Weiteren wurden nur Eier mit mindestens zwei peripher gelegenen gut für die Punktion geeigneten Gefäßen (z.B. Gabelungen) eingeschlossen. Dies war von Bedeutung, da der zentrale Anteil wie im Folgenden beschrieben mit einem Deckglas bedeckt wurde und zum anderen der zentrale Anteil als spätere Untersuchungsregion (Region of Interest) nicht durch Manipulation bei der Punktion beeinträchtigt werden sollte. Nach Präparation mussten somit weitere $n = 81$ (35,2 %) Eier ausgeschlossen werden.

II.2.5 Aufbringen der Implantate auf die CAM

Zunächst erfolgten mehrere Versuchsreihen, um die optimale Implantationsform für die Metallchips herauszufinden. Hierbei wurde untersucht, in wieweit die Hühnereier die Implantation von Metallchips tolerieren. Hierzu standen insgesamt $n = 20$ Eier zur Verfügung. Zunächst wurden die sterile halbkonvexe Metallchips ohne Deckglas (Durchmesser 4 mm, siehe Kapitel II.1.2 „Implantate“) nach Freilegung der CAM mit der konvexen Seite nach unten zentral auf die CAM gelegt. Da der Chip aufgrund seines Eigengewichtes bei kleiner Auflagefläche im Verlauf der 24 h Bebrütungszeit oder bei der Mikroskopie versank, wurden die Chips in weiteren Versuchen an Deckgläsern fixiert. Die Metallchips wurden zentral an kreisförmigen Deckgläsern mit 15 mm und 20 mm Durchmesser mit Ethyl-Cyanoacrylate-Kleber fixiert und dampfautoklaviert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Implantate direkt auf die CAM gelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass zwischen CAM und Deckglas keine

Luftblasen eingeschlossen wurden. Durch die nun größere Auflagefläche blieben die Metallchips auf der CAM liegen. Abbildung 6 zeigt die unterschiedlich großen Deckgläser vor der Implantation.

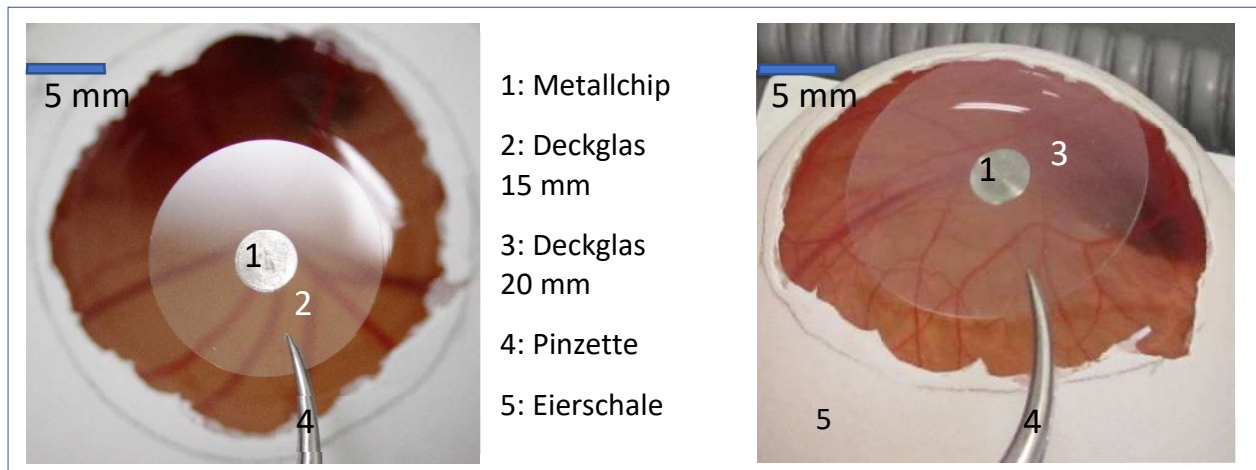


Abbildung 6: Metallchip an Deckglas fixiert. Links Deckglas mit 15 mm Durchmesser, rechts Deckglas mit 20 mm Durchmesser.

Nach den Erfahrungen der Vorversuche (s. oben und Kapitel III.1 „Vorversuche“ sowie Erläuterungen in Kapitel IV.1.4 „Implantation der Metallchips“) wurden die halbkonvexen Metallchips mit einem Durchmesser von 4 mm aus reinem Nickel oder Titan an einem Deckglas mit 15 mm Durchmesser fixiert und anschließend dampfautoklaviert. Nach erfolgreicher Implantation (siehe Abbildung 7) wurden die Eier mit Tegaderm® verschlossen und somit vor Austrocknung und Infektion geschützt für 24 h weiter bebrütet.

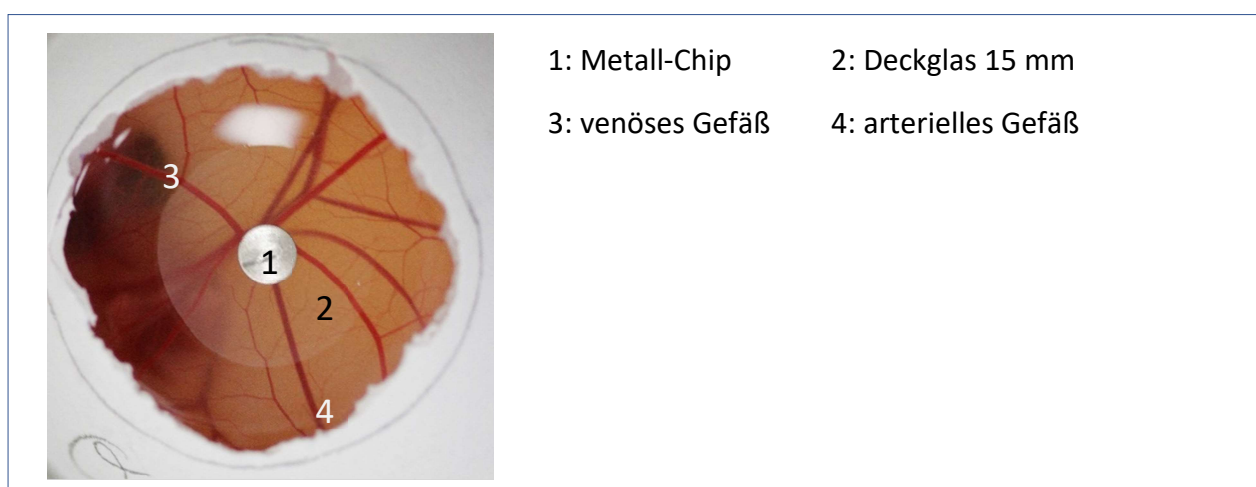


Abbildung 7: Metallchip nach erfolgreicher Implantation

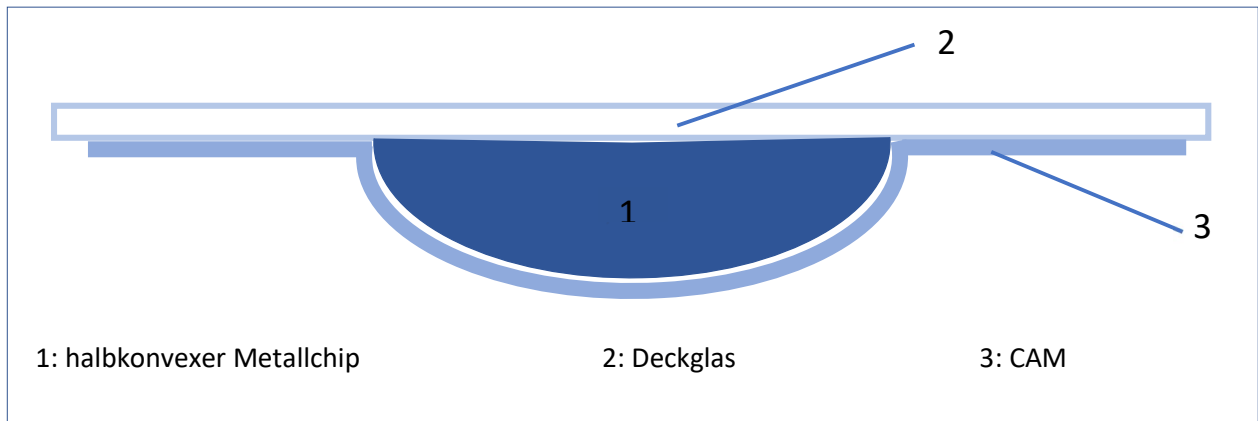


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Metallchips und der Chorioallantoismembran

Wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, legte sich die CAM im Verlauf der 24 h direkt an den Metallchip und das Deckglas an.

II.2.6 Oberflächenmodifikation der Implantate mit CAP

Die Behandlung mit CAP erfolgte unmittelbar vor der Implantation. Hierbei wurde die Behandlung mit dem Plasmajet kINPen® MED (neoplas tools GmbH) (siehe Kapitel II.1.3.3 „Plasmaquelle“) für 2 min bei einem Gasfluss von 5 slm durchgeführt. Die Behandlung erfolgte mäanderförmig per Hand mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 mm/s. Die Behandlungsdauer und Gasflusseinstellung orientierte sich an Ergebnissen von Duske et al. zum Benetzungsverhalten von Titanoberflächen nach Plasmabehandlung (Duske et al. 2012).

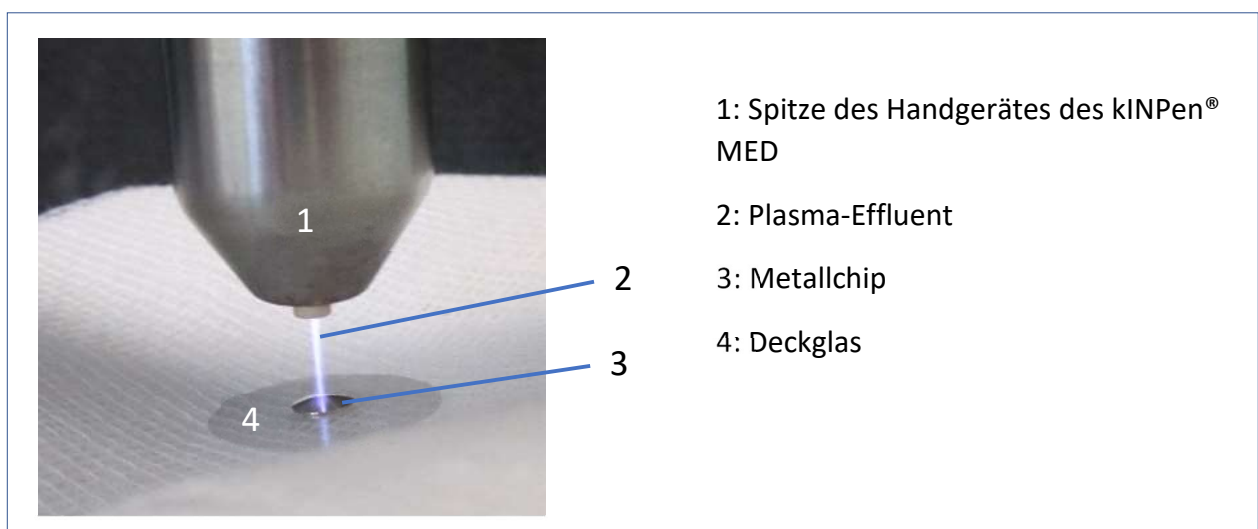


Abbildung 9: Oberflächenbehandlung eines Metallchips mit dem kINPen® MED

II.2.7 Versuchsgruppen der Hauptversuchsreihen

Erst nach der Präparation der CAM erfolgte die Randomisierung und Zuordnung zu den Versuchsgruppen.

In den Versuchen zur Anwendung des Modells wurden die Eier zunächst in die Gruppen **Nickel nativ** und **Titan nativ** aufgeteilt. Diese Eier erhielten nach Präparation entweder einen unbehandelten an einem Deckglas fixierten Nickel- oder Titan-Chip (s. Kapitel II.1.2 „Implantate“). In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob das Modell grundsätzlich geeignet sein könnte, um unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene Materialien zu zeigen (s. hierzu auch Kapitel II.1.2 „Implantate“). In den Versuchsreihen zur Etablierung des Modells wurden die Versuchseier nach der Präparation der CAM in die Gruppen **Nickel-CAP** und **Titan-CAP** aufgeteilt. Diese Versuchseier erhielten Nickel- oder Titan-Chips, die unmittelbar vor der Implantation mit CAP (siehe Kapitel II.2.6 „Oberflächenmodifikation der Implantate mit CAP“) behandelt worden waren. Als interne Kontrollgruppe (**Kontrolle**) dienten jeweils die peripheren Areale der mit nativem Titan behandelten Versuchseier. Eine Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen zeigt Tabelle 1.

Kontrolle	Titan nativ	Nickel nativ	Titan-CAP	Nickel-CAP
n=7	n=7	n=8	n=5	n=6

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen der Hauptversuchsreihen

II.2.8 Zellmarkierung und Intravitalmikroskopie

II.2.8.1 Zellmarkierung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes

II.2.8.1.1 Einführung

Zur Markierung der immunkompetenten, kernhaltigen Zellen im Blut wurde Rhodamin 6G verwendet. Rhodamin 6G ist ein Fluoreszenz-Farbstoff zur Färbung von Nukleinsäuren und akkumuliert in Zellkernen und Mitochondrien (Mulisch et al. 2015). Rhodamin 6G wurde in der vorgestellten Arbeit als gefilterte Lösung verwendet (6 mg Rhodamin 6G auf 12 ml NaCl).

II.2.8.1.2 Versuchsaufbau für die Injektion

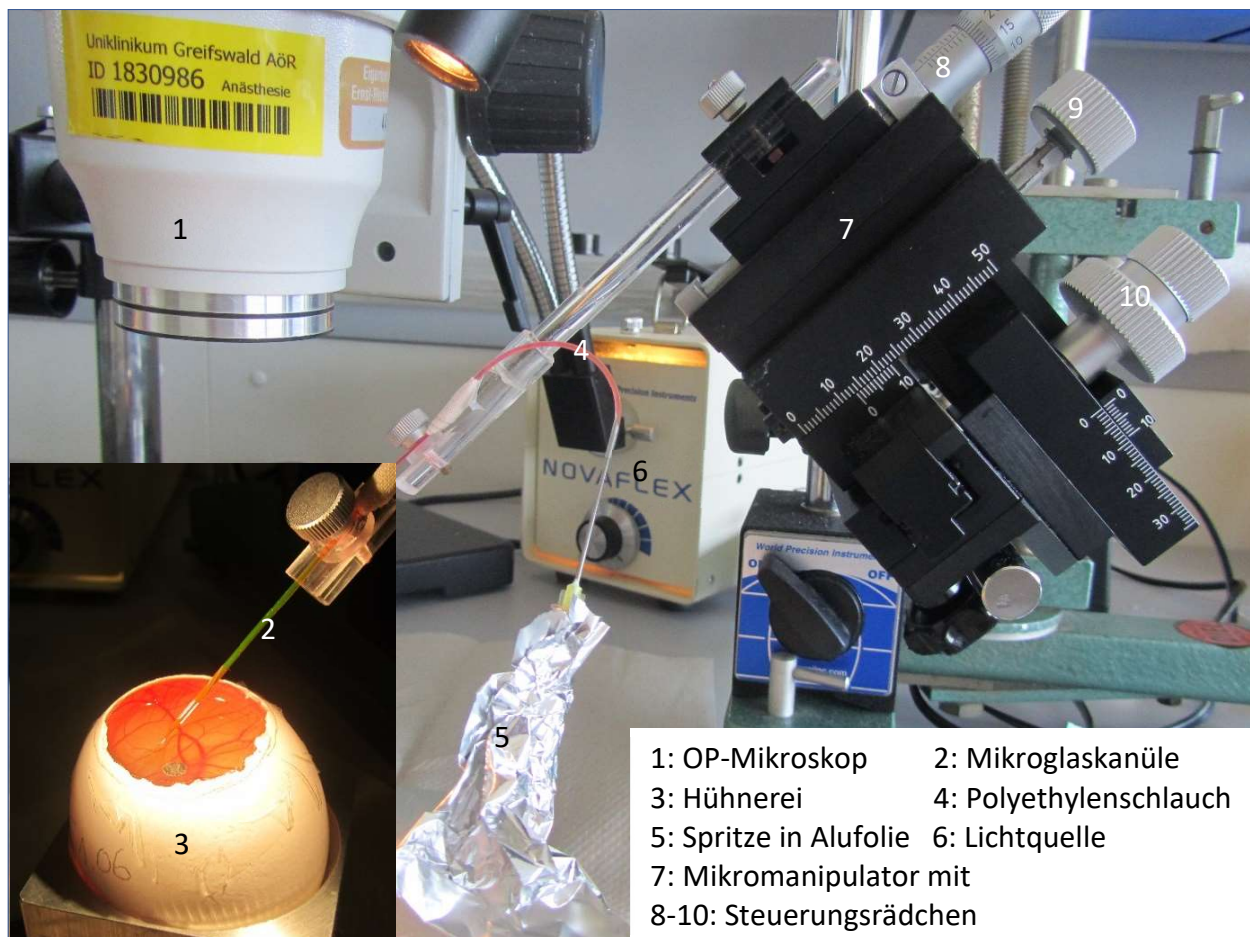


Abbildung 10: Mikromanipulator samt Injektionsvorrichtung

Nach 24 h Bebrütung wurde an Tag elf nach Bebrütungsbeginn die Tegadermabdeckung mit Hilfe einer Schere entfernt. Tote Eier oder Eier mit sichtbarer Stase in Hauptgefäßen wurden

ausgeschlossen (siehe Kapitel II.2.4 „Ein-/Ausschlusskriterien“). Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von 25 µl Rhodamin 6G in ein peripher gelegenes Blutgefäß. Hierzu kam ein in unserer Arbeitsgruppe entwickelter Injektionsaufbau zum Einsatz (siehe Abbildung 10). Nach erneuter Anfeuchtung der CAM mit 0,9 % NaCl zur Erleichterung der Punktion, erfolgte die Injektion von Rhodamin 6G mit einer Mikrogaskanüle (Innendurchmesser 10 µm, siehe Abbildung 11).

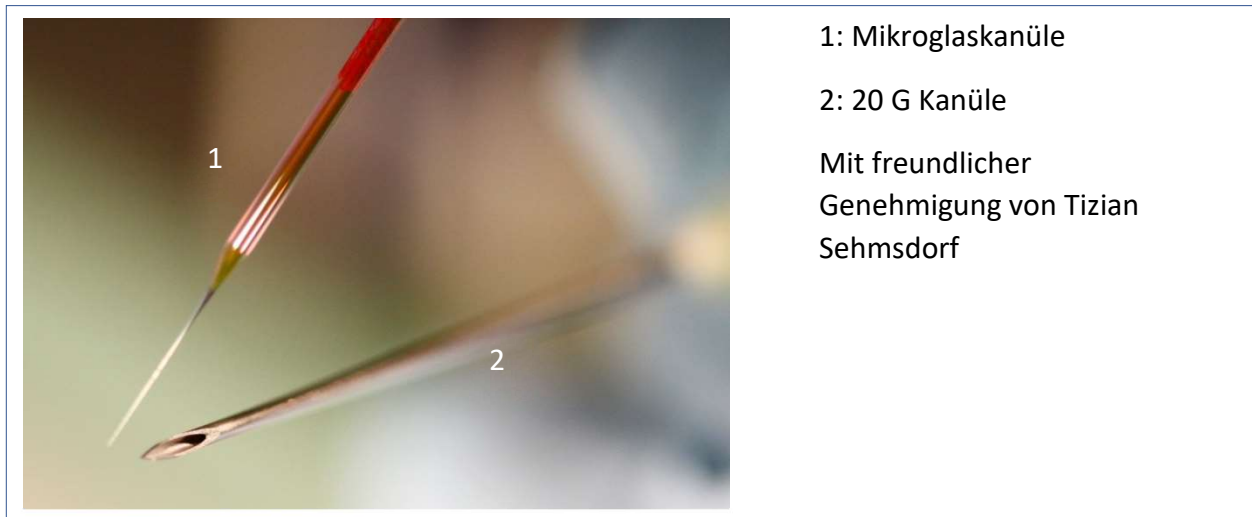


Abbildung 11: Mikrogaskanüle im Vergleich zu einer 20 G Kanüle

Diese Mikrogaskanülen werden üblicherweise in der *in vitro* Fertilisation verwendet und dienen dort der Punktion der Eizelle. Um eine Spritze mit der Mikrogaskanüle verbinden zu können, wurde ein Polyethylenschlauch zunächst mit einer 20 G-Kanüle vorgedehnt und anschließend über die Glaskanüle auf der einen und über eine 20 G-Kanüle auf der anderen Seite gestülpt. Die Verbindung mit der Glaskanüle wurde zusätzlich mit Leukoplast fixiert. Die Mikrogaskanüle wurde in einen Mikromanipulator gespannt. Die Insulinspritze mit der Rhodaminlösung wurde zum Schutz vor Lichteinstrahlung während der Versuche mit Alufolie umwickelt. Unter dem OP-Mikroskop konnte dann die Injektion von 25 µl Rhodaminlösung in ein peripheres Blutgefäß erfolgen. Nach jeder Injektion wurde das System gespült und zwischen den Versuchen in ein Becherglas mit destilliertem Wasser getaucht.

II.2.8.2 Intravitalmikroskopie

II.2.8.2.1 Einführung

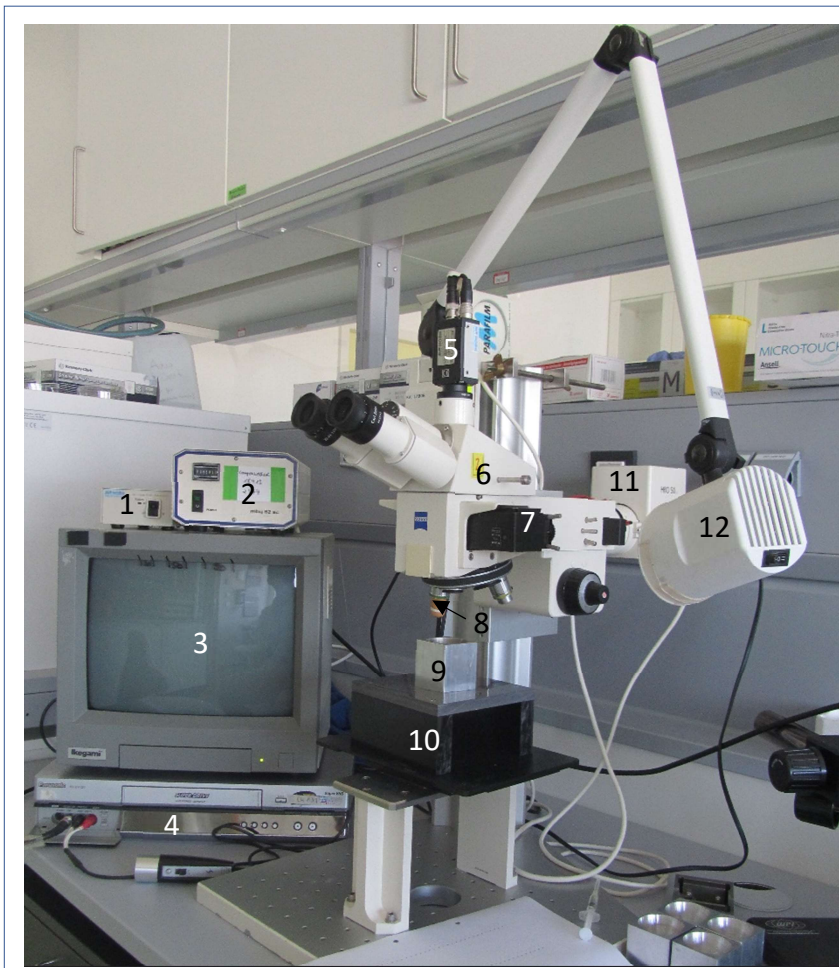
Die Anfänge der Intravitalmikroskopie reichen in das 17. Jahrhundert zurück. Marcello Malpighi studierte mit Hilfe der Intravitalmikroskopie den Blutkreislauf von Fröschen und Schildkröten u.a. an Lunge und Blase und konnte damit erstmals den funktionellen Nachweis des von Harvey 1628 postulierten geschlossenen Blutkreislaufes erbringen (Malpighi 1663, Harvey et al. 1910, Young 1929). Die erste detaillierte Beschreibung der Intravitalmikroskopie stammt aus dem 19. Jahrhundert (Menger et al. 1993). 1846 beschreibt Waller seine Beobachtung von roten flachen und farblosen runden Zellen in Kapillaren, sowie den „Ausbruch“ von farblosen Zellen aus den Kapillaren, den er in Zusammenhang mit der Eiterbildung bringt. Diese Beobachtungen entstanden bei der Mikroskopie der Froschzunge, eines lebendigen Frosches, die über eine Korkplatte mit einem Loch gespannt wurde (Waller 1846).

Inzwischen finden sich verschiedenste Modelle der Intravitalmikroskopie. Generell kann hier zwischen chronischen und akuten Modellen unterschieden werden. Hier genannt seien die Darstellung mit Hilfe eingebrachter „optischer Fenster“, u.a. Schädelfensterpräparation (Sckell et al. 2009, Dorand et al. 2014), die dorsale Hautkammer mit Anwendung an Ratten (Papenfuss et al. 1979) und Mäusen (Lehr et al. 1993) etc. sowie das „Brust-Fenster“ (Mammary Imaging Window) (Kedrin et al. 2008) und Methoden zur Darstellung des Ovariums der Maus (Bochner et al. 2015). Ebenso finden sich nicht invasive Methoden beispielsweise an der Gingiva von Hamstern (Miller et al. 1989) oder der Kornea von Mäusen (Wang et al. 2018).

Insgesamt ist die Intravitalmikroskopie eine international etablierte Methode zur Analyse komplexer biologischer Interaktionen und pathologischer Mechanismen, sowie Untersuchung prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen in der Tumor-/Transplantations- und Autoimmun-Forschung und ist geeignet eine Brücke zwischen Beobachtungen *in vitro* und deren Relevanz *in vivo* zu schlagen (Menger et al. 1993, Masedunskas et al. 2012).

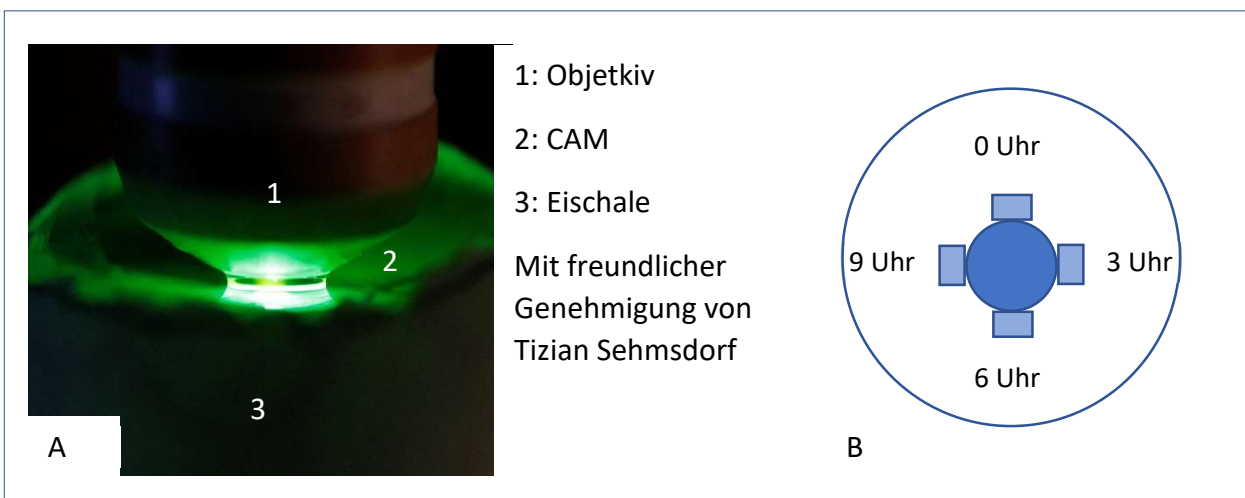
II.2.8.2.2 Versuchsaufbau Intravitalmikroskopie

Die intravitale Immersions-Auflichtmikroskopie erfolgte ebenfalls am elften Bebrütungstag unmittelbar nach der Rhodamin-6G-Injektion unter Videodokumentation mit einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera (Canon Macro lens, schwarz/weiß). Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 12 dargestellt. Als Immersionsflüssigkeit diente 0,9 % NaCl. In den hier vorgestellten Versuchen wurde das Deckglas zusammen mit dem Metallchip bereits 24 h vor der mikroskopischen Untersuchung auf die CAM aufgebracht (siehe Kapitel II.2.5 „Aufbringen der Implantate auf die CAM“). Für die bessere Aufnahmequalität wurde der Raum während der Mikroskopie abgedunkelt. Es wurden standardisiert jeweils vier Aufnahmen zentral in unmittelbarer Nähe des Implantates zur Analyse der Funktionellen Gefäßdichte (FGD s. Kapitel II.2.11.1 „Funktionelle Gefäßdichte (FGD)“) gemacht (jeweils um 90° versetzt 0 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr, siehe Abbildung 13 B). Des Weiteren erfolgten Aufnahmen von drei zentralen und drei peripheren Gefäßarealen mit venösen Gefäßen (siehe hierzu auch Abbildung 15). Es wurden venöse Gefäße ausgesucht, da die Migration der Leukozyten bevorzugt in postkapillären Venolen stattfindet (Lüllmann-Rauch 2009), zur weiteren Erläuterung siehe auch Kapitel II.2.11.2 „Einführung Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)“. Hierbei erfolgte jeweils eine Aufnahme unter Auflicht von 30 s zur späteren Analyse der FGD sowie eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme unter Rhodaminfilter von 30 s zur späteren Analyse der LEI, siehe Abbildung 13 A. Die Aufnahmen unter Rhodaminfilter wurden auf Grund der möglichen phototoxischen Effekte (Steinbauer et al. 2000) streng auf 30 s begrenzt (s. Kapitel IV.1.2.2 „Versuchszeitpunkt und Versuchsprotokoll“). Bei den Viedoaufnahmen kam es, teils durch den Herzschlag oder durch Bewegungen von Schnabel oder Füßen des Embryos gegen die CAM, zu Wackelartefakten. Bei Bewegungsunschärfe durch Wackelartefakte wurde das Areal von der Auswertung ausgeschlossen und entsprechend weitere Areale untersucht.



- 1: Netzgerät mit Ein/Aus-Schalter Videokamera
- 2: Grundgerät für die Quecksilberdampf-lampe
- 3: Monitor
- 4: Videorekorder
- 5: S/W-Video-Kamera
- 6: Mikroskop
- 7: Filterschieber
- 8: Achroplan-Objektiv
- 9: Eihalterung
- 10: Fuß mit Podest
- 11: Quecksilberdampf-lampe
- 12: Beleuchtung

Abbildung 12: Versuchsaufbau Intravitalmikroskopie



- 1: Objektiv
 - 2: CAM
 - 3: Eischale
- Mit freundlicher Genehmigung von Tizian Sehmsdorf

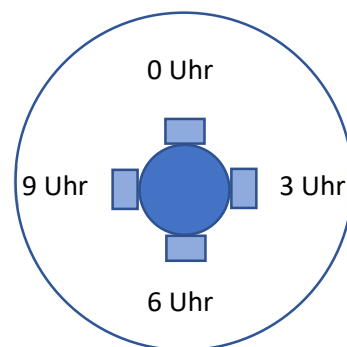


Abbildung 13: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Rhodaminfilter B: Schematische Darstellung der ROI in unmittelbarer Nähe des Chips.

II.2.9. Chronologischer Versuchsablauf

In Abbildung 14 ist der chronologische Versuchsablauf zusammenfassend dargestellt.

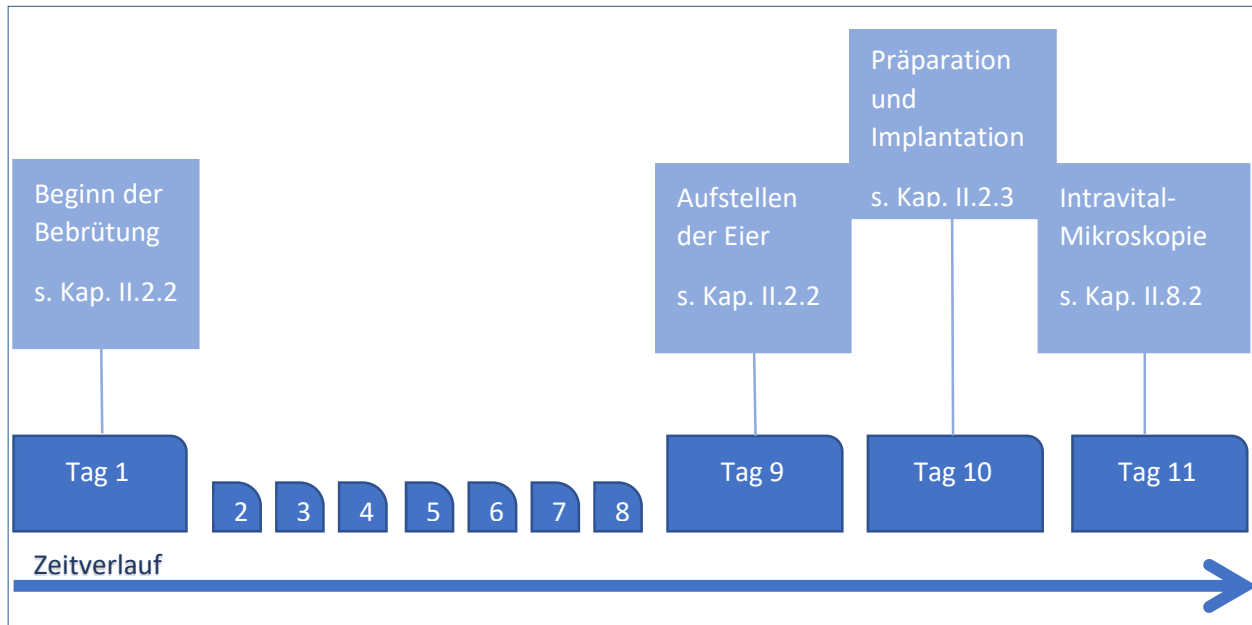


Abbildung 14: Chronologischer Versuchsablauf

II.2.10 Protokoll

In Tabelle 2 ist das Versuchsprotokoll zur besseren Veranschaulichung tabellarisch zusammengefasst. Nach erfolgter Implantation und Intravitalmikroskopie wurde der Versuch durch Destruktion der Eimembran, Durchtrennen der Hauptgefäße der CAM und Einfrieren der Eier bei -17 °C beendet, vergleiche hierzu Close et al. (Close et al. 1997). Die verwendeten Scheren und Pinzetten wurden zwischen den Behandlungstagen dampfautoklaviert und zwischen den einzelnen Präparationen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

Tag 0 Eierlieferung	Lagerung bei Raumtemperatur (aufrecht) mindestens 24 h, maximal 4 Tage nach Lieferungstag.		
Tag 1 Beginn der Bebrütung	Die Eier werden bei 37,8 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit im Wendemodus (2 h Wendephase, 1 h Ruhephase) bebrütet (Vorbrüter).		
Tag 9 Aufstellen	Die Eier werden mit dem stumpfen Pol nach oben aufgestellt und bei 37,8 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit ohne Wendefunktion weiter bebrütet (Schlupfbrüter).		
Tag 10 Präparation und Implantation	<p>Die Eischale wird zunächst mit Ethanol 70 % desinfiziert und danach eröffnet, sodass die Luftkammer freipräpariert ist. Die innere Eihaut wird befeuchtet (ca. 200 µl) und entfernt. Die nun sichtbare CAM wird nach Gefäßstatus beurteilt.</p> <p>Fotodokumentation 1</p> <table border="1"> <tr> <td>Die sterilen nativen Metallchip-Deckgläser werden direkt auf die CAM gelegt.</td> <td>Die sterilen Metallchips werden in der Plasmagruppe 2 min bei einem Gasfluss von 5 slm mit den kINPen® MED (INP Greifswald) behandelt und anschließend direkt auf die CAM gelegt.</td> </tr> </table> <p>Fotodokumentation 2</p> <p>Die Eiöffnung wird mit Tegaderm® verschlossen und danach wird das Ei wieder in den Brutschrank gestellt und für weitere 24 h bebrütet.</p>	Die sterilen nativen Metallchip-Deckgläser werden direkt auf die CAM gelegt.	Die sterilen Metallchips werden in der Plasmagruppe 2 min bei einem Gasfluss von 5 slm mit den kINPen® MED (INP Greifswald) behandelt und anschließend direkt auf die CAM gelegt.
Die sterilen nativen Metallchip-Deckgläser werden direkt auf die CAM gelegt.	Die sterilen Metallchips werden in der Plasmagruppe 2 min bei einem Gasfluss von 5 slm mit den kINPen® MED (INP Greifswald) behandelt und anschließend direkt auf die CAM gelegt.		
Tag 11 Intravitalmikroskopie	<p>Zunächst erfolgt die optische Begutachtung in Bezug auf Entzündung und Auffälligkeiten.</p> <p>Fotodokumentation 3</p> <p>Intravasale Injektion von 25 µl Rhodamin 6G</p> <p>IVM und Dokumentation auf Videokassette</p> <p>Terminierung der Versuche durch Durchtrennen der Hauptgefäße der CAM und Einfrieren der Eier bei -17 °C</p>		

Tabelle 2: Versuchsprotokoll

II.2.11 Auswertung

Die Auswertung der Videoaufzeichnung erfolgte verblindet und *off line* mit Hilfe des Computerprogramms CapImage (Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg). Die Darstellung erfolgte in einem Maßstab von 1:320.

II.2.11.1 Funktionelle Gefäßdichte (FGD)

Die Funktionelle Gefäßdichte (**FGD** [m/m²]) ist definiert als die Länge der durchbluteten Gefäße pro Fläche. Sie ist ein Maß für die stattgefundenene Angiogenese sowie die Gasaustauschfläche. Die Bestimmung der FGD erfolgte durch Messung der gesamten

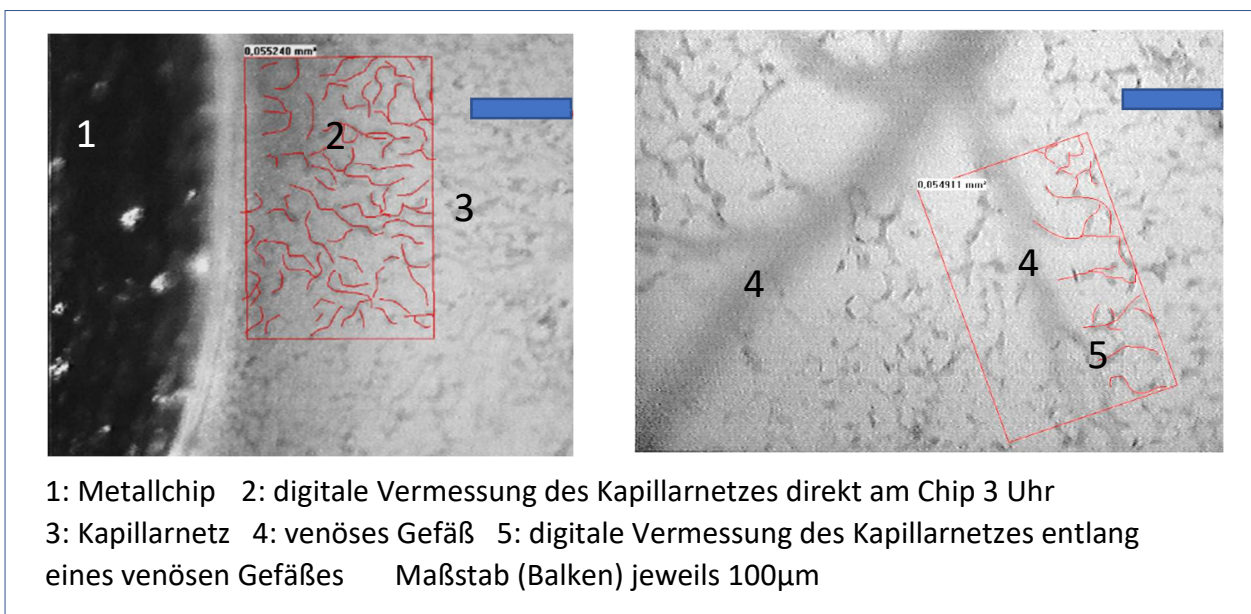


Abbildung 15: Messung der Funktionellen Gefäßdichte links direkt am Chip, rechts zentral

perfundierten Gefäßstrecke innerhalb eines festgelegten Areal ($0,0548754 \text{ mm}^2 (\pm 0,0004093 \text{ mm}^2)$). Dazu wurden die Aufnahmen ohne Rhodamin-Filter verwendet (Vergrößerung 1:320). Es wurden vier Areale in unmittelbarer Nähe zum Implantat (**FGDc**) untersucht (jeweils 0 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr, s. Abbildung 13 B) und der Mittelwert gebildet. Des Weiteren wurde die FGD in drei Arealen im Bereich des ersten Blickfeldes (**FGDz**), sowie in drei Arealen im Abstand von mindestens einem Blickfeld vom Implantat (**FGDp**) bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogramms CapImage wurden die perfundierten Gefäße innerhalb der vorher definierten Fläche nachgezeichnet, wie in Abbildung 15 dargestellt, und somit die Gesamtlänge bestimmt.

II.2.11.2 Einführung Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)

In diesem Abschnitt erfolgt eine allgemeine Übersicht über die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Die Begriffe „Roller“ und „Sticker“ werden erläutert. Die zu beachtenden Besonderheiten und Unterschiede der immunkompetenten Zellen des Vogels im Vergleich zu denen des Säugers werden in Kapitel IV.1.1.1 „Besonderheiten und Unterschiede der Blutzellen des Hühnerembryos im Vergleich zu Blutzellen des Säugers und mögliche Einschränkungen in Bezug auf die LEI“ näher ausgeführt.

Für die angeborene und adaptive Immunreaktion des Organismus ist es notwendig, dass immunkompetente Zellen das Blutgefäßsystem verlassen können, um Erreger im Extravasalraum bekämpfen zu können. Sowohl Phagozyten als auch Lymphozyten können an Endothelzellen binden und durch Migration in die Peripherie gelangen (Robert et al. 2013). Diese Migration der Leukozyten findet bevorzugt in den postkapillären Venolen statt und kann im Rahmen einer Entzündungsreaktion lokal gesteigert werden (Lüllmann-Rauch 2009). Endothelzellen werden im Rahmen der Entzündungsreaktion durch Zytokine aktiviert und exprimieren Adhäsionsmoleküle, Chemokine und chemische Lockstoffe (Ley et al. 2007). Butcher und Springer beschreiben die LEI und Diapedese in drei bzw. vier aufeinanderfolgenden und sich überlappenden Schritten: 1. Primäre Adhäsion/Rollen, 2. Aktivierung, 3. Aktivierungsabhängiges Haften (und 4. Diapedese) (Butcher 1993, Springer 1995).

Die primäre Adhäsion wird durch Selektine vermittelt: Erste lose Bindungen entstehen zwischen Selektinen der Endothelzellen und Selektin-Liganden der Leukozytenoberfläche. Da diese Bindungen durch den Blutstrom leicht gelöst werden, führt dieser Schritt zur Verlangsamung und somit zum sogenannten „Rollen“ der Leukozyten. Die Aktivierung der Leukozyten wird durch Chemokine vermittelt und führt zur Aktivierung von Integrinen an der Leukozytenoberfläche. Diese Integrine können im dritten Schritt an Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen binden. Diese Bindungen führen zum festen Haften oder „Sticken“ der Leukozyten (Butcher 1993, Ley et al. 2007, Lüllmann-Rauch 2009). Laut Ley et al. muss dieses klassische Modell um weitere Zwischenschritte ergänzt werden. Hierzu zählen, „langsames Rollen“, Verstärkung der Adhäsion, intravaskuläres Krabbeln („Crawling“), parazelluläre und

transzelluläre Migration sowie Basalmembran-Migration (siehe Abbildung 16). Des Weiteren scheinen Integrine ebenfalls an dem „Rollen“ der Leukozyten beteiligt zu sein (Ley et al. 2007).

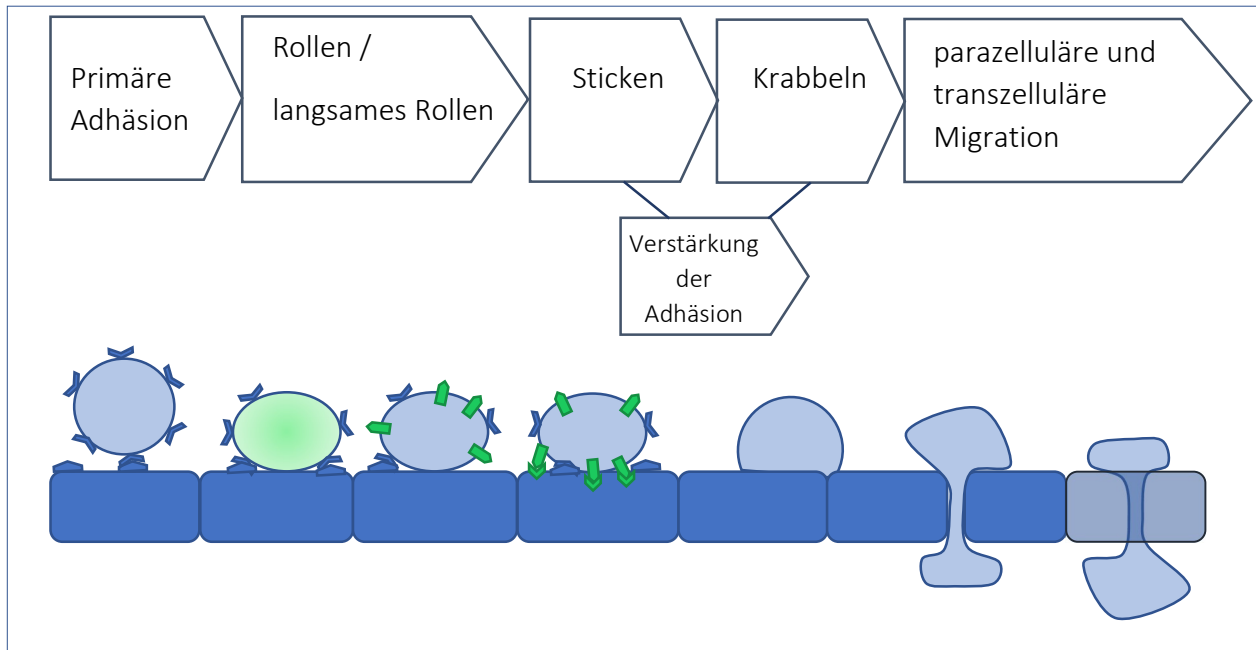


Abbildung 16: Schritte der Leukozyten-Endothel-Interaktion, modifiziert nach Ley et al. (Ley et al. 2007)

II.2.11.3 Gemessene Variablen der LEI

Zur Untersuchung der LEI wurden Videoaufnahmen mit Rhodamin-Filter verwendet. Jeweils drei venöse Gefäße im ersten Blickfeld um das Implantat (**z**), sowie drei Areale mit mindestens einem Blickfeld Abstand vom Implantat (**p**) wurden ausgewertet und anschließend jeweils je CAM gemittelt.

II.2.11.3.1 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßwände färbten sich durch Verwendung von Rhodamin ebenfalls schwach an, sodass eine präzise Messung der **Gefäßdurchmesser (d [μm])** mit Hilfe des Programms CapImage mit einer Genauigkeit von $\pm 0,8 \mu\text{m}$ möglich war (siehe Abbildung 17). Es wurden nur Gefäße mit einem Durchmesser von $25\text{-}50 \mu\text{m}$ zur Bestimmung der LEI einbezogen. Kampfrath et al.

konnten zeigen, dass aufgrund der geringeren Scherrate sich Gefäßdurchmesser um $40\ \mu\text{m}$ besonders zur quantitativen Bestimmung der LEI eignen (Kampfrath et al. 2009).

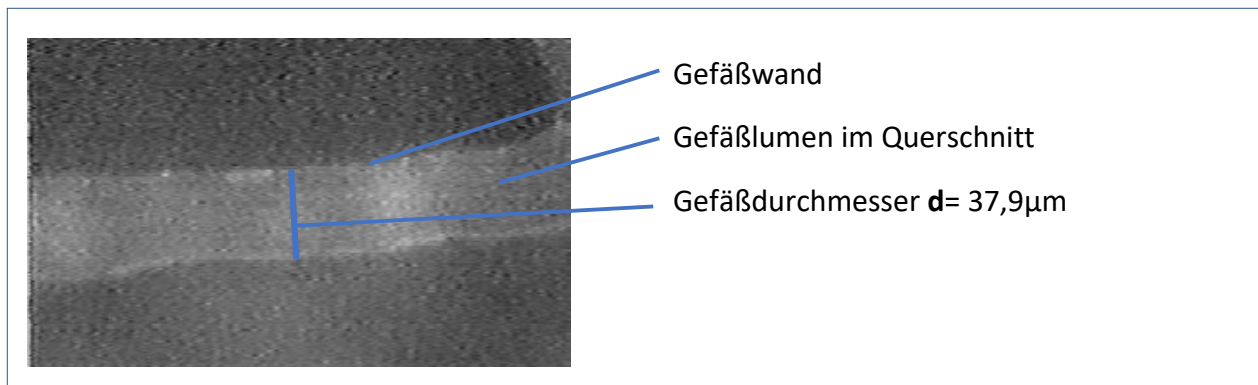


Abbildung 17: Messung Gefäßdurchmesser

II.2.11.3.2 Anzahl der Roller (n_{Roller}) und Gesamtzahl der Leukozyten ($n_{\text{WBCnon-sticking}}$) pro 30 s

Abbildung 19 zeigt die Aufnahme eines venösen Gefäßabschnittes unter Rhodaminfilter. Die durch Rhodamin 6G gefärbten Zellen des Blutstroms sind mit dünnen Pfeilen markiert. Die **Anzahl der Roller (n_{Roller})** und die **Gesamtzahl der Leukozyten ($n_{\text{WBCnon-sticking}}$)** pro 30 s wurde an einer vorher festgelegten Linie bei Überquerung direkt gezählt. Als Roller wurden „Leukozyten“ definiert, die eine deutlich verminderte Geschwindigkeit im Vergleich zur zentralen Fließgeschwindigkeit hatten (Lim et al. 2002, Zysk et al. 2003). Auch kurzzeitig haftende „Leukozyten“, die nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum (30 s) ortsständig waren, wurden zu den Rollern gezählt. In Abbildung 18 ist dies schematisch verdeutlicht. Es ist jeweils derselbe Gefäßabschnitt jedoch zu unterschiedlichen Zeitabschnitten (1.-6.) abgebildet. Bei Überqueren der eingezeichneten Linie wird die **Gesamtzahl der Leukozyten ($n_{\text{WBCnon-sticking}}$)** sowie die **Anzahl der Roller (n_{Roller})**, wie unter der jeweiligen Abbildung dargestellt, erfasst.

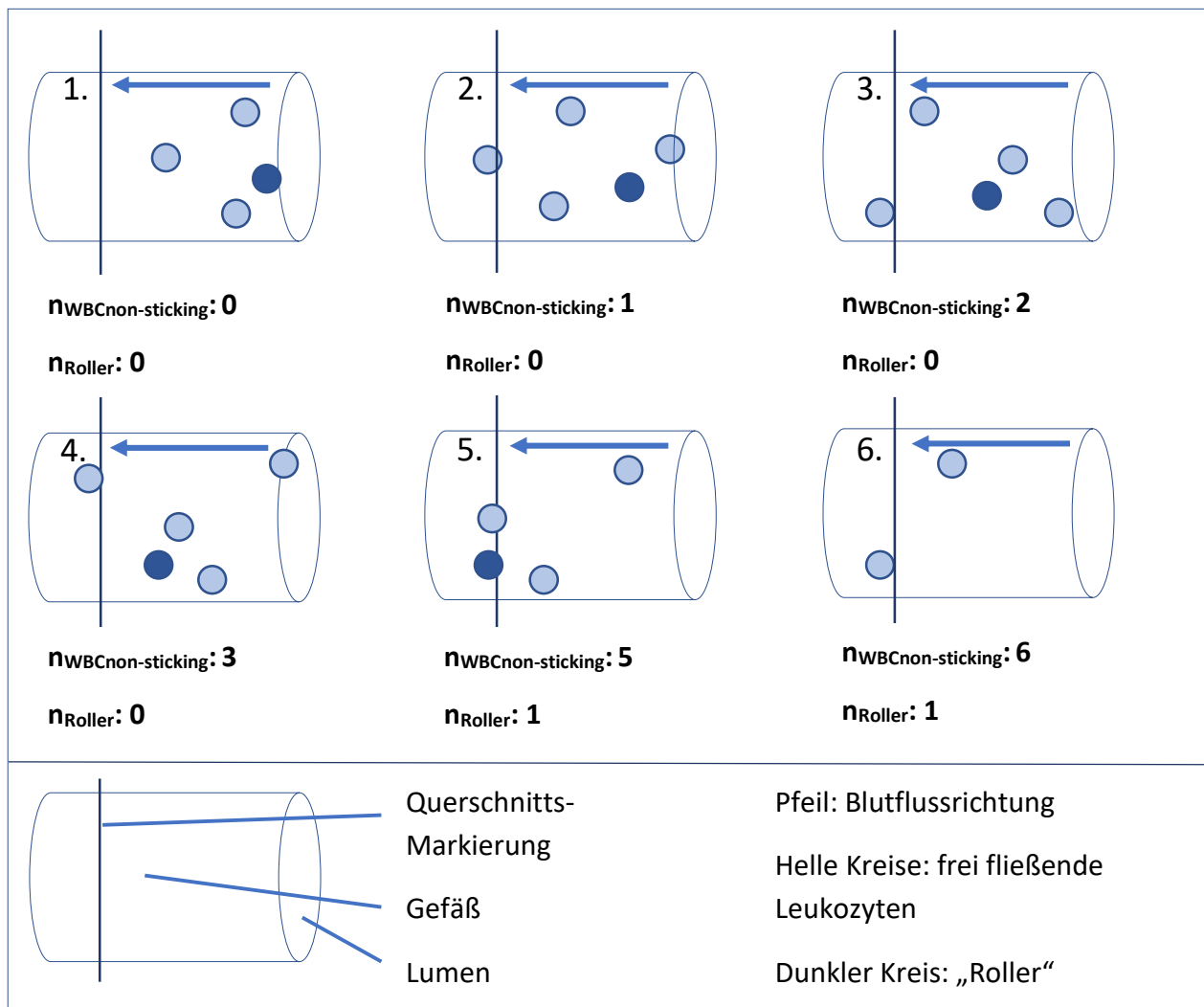


Abbildung 18: Schematische Darstellung Anzahl Leukozyten und Anzahl Roller.

II.2.11.3.3 Anzahl der Sticker

Die **Anzahl der Sticker** (n_{Sticker}), also die Anzahl an während des gesamten Beobachtungszeitraum von 30 s ortsständigen Leukozyten (Veihelmann et al. 1998, Kampfrath et al. 2009) wurde in einem Gefäßabschnitt von ca. 300 μm Länge dokumentiert. Zur Verwendung des Begriffs Leukozyten an dieser Stelle siehe auch IV.1.1.1 „Besonderheiten und Unterschiede der Blutzellen des Hühnerembryos im Vergleich zu Blutzellen des Säugers und mögliche Einschränkungen in Bezug auf die LEI“.

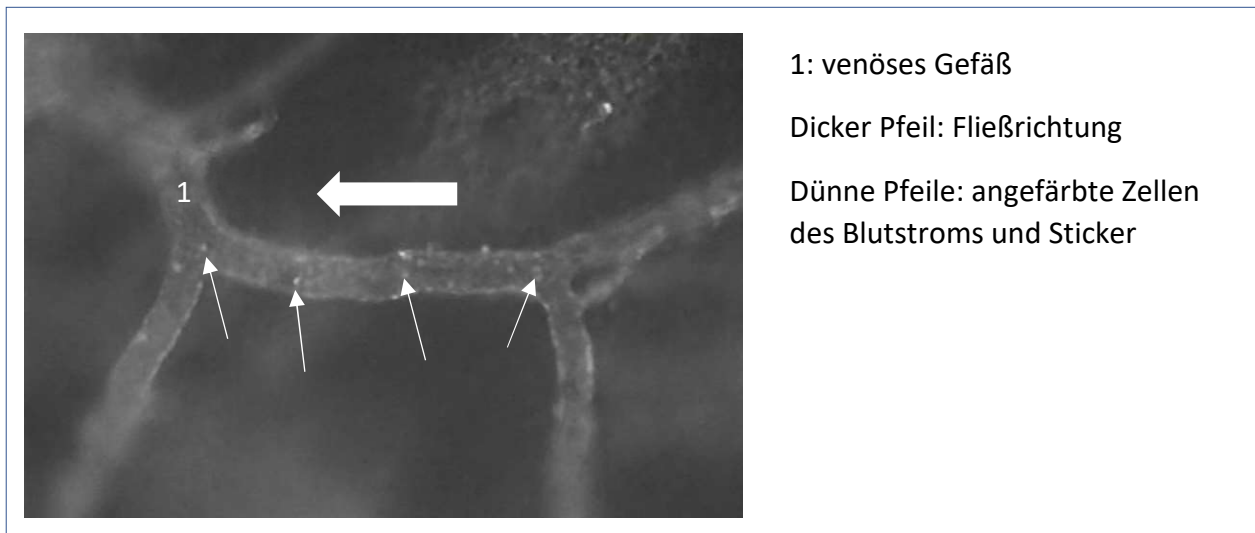


Abbildung 19: Aufnahme mit Rhodamin-Filter, venöses Gefäß mit angefärbten Zellen des Blutstroms und Stickern

II.2.11.3.4 Zentrale Fließgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]

Nach Cokelet kann das harmonische Mittel der axialen Geschwindigkeit in einer Ebene als Näherung für die tatsächliche axiale Geschwindigkeit verwendet werden (Cokelet 1974, Kuhnle et al. 1995).

Für die Berechnung der zentralen Fließgeschwindigkeit wurde die von markierten Leukozyten parallel zum Gefäßverlauf zurückgelegte Strecke (s [μm]) in CapImage durch Bild-zu-Bild-Analyse gemessen. Die hierfür benötigte Zeit (t [s]) wurde per Zeitmessung am S-VHS-Recorder ermittelt (Einzelbilddauer 1/200 s). Hierbei wurde die zurückgelegte Strecke von jeweils drei bis fünf Leukozyten im zentralen Blutstrom gemessen. Dabei wurden nur gerade Wegstrecken mit Längen über 150 μm für die Messung verwendet. Da für die Geschwindigkeitsmessungen demnach verschiedene Streckenlängen verwendet wurden, wurde die zentrale Fließgeschwindigkeit \bar{v}_{Blut} mit Hilfe des nach Strecke gewichteten harmonischen Mittels der axialen Geschwindigkeit der Leukozyten berechnet.

$$\bar{v}_{\text{Blut}} = \frac{\sum_{i=1}^n s_i}{\sum_{i=1}^n \frac{s_i}{v_i}} = \frac{\sum_{i=1}^n s_i}{\sum_{i=1}^n t_i}$$

II.2.11.4 Errechnete Variablen

Aus den in Kapitel II.2.11.2 „Einführung Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)“ beschriebenen Variablen, wurden die im folgenden erläuterten Variablen errechnet. Die im folgende Abschnitt verwendeten Formeln orientieren sich an Sckell et al. (Sckell et al. 1998) und Kuhnle et al. (Kuhnle et al. 1995):

II.2.11.4.1 Anteil Roller (Rolling Count) [%]

Anteil der Roller an der Gesamtheit der nicht-haftenden Leukozyten:

$$\mathbf{rc} = \frac{n_{\text{Roller}}}{n_{\text{WBCnon-sticking}}} \cdot 100$$

II.2.11.4.2 Zelldichte der Sticker [Zellen/mm²]

Näherungsweise wurde der beobachtete Gefäßabschnitt als Zylinder betrachtet und die Zelldichte als Anzahl der Sticker (n_{Sticker}) pro Mantelfläche $A_{\text{Mantel}} = \pi \cdot d \cdot l$ definiert. Mit der Gefäßabschnittslänge l (hier 300 μm) und dem Gefäßdurchmesser d [μm] ergibt sich:

$$\mathbf{dens}_{\text{Sticker}} = \frac{n_{\text{Sticker}}}{\pi \cdot d \cdot l} \cdot 10^6$$

II.2.11.4.3 Leukozyten Flux [Zellen/(mm²·s)]

Der Leukozyten Flux ist definiert als die Anzahl der Leukozyten, die pro Zeiteinheit einen bestimmten Gefäßdurchmesser passieren. Bei dem hier idealerweise als zylinderförmig angenommenem Gefäß, mit dem Gefäßdurchmesser (d [μm]) und dem kreisförmigen Querschnitt $A_{\text{Kreis}} = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2$ und Beobachtungszeitraum t (hier 30 s) gilt demnach:

$$\mathbf{Flux} = \frac{n_{\text{WBCnon-sticking}}}{\pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot t} \cdot 10^6$$

II.2.11.4.4 Blutfluss [pl/s]

Der Blutfluss ist definiert als das Volumen, welches einen Gefäßquerschnitt pro Zeiteinheit passiert. Als Maß für die zentrale Fließgeschwindigkeit (v_{Blut} [$\mu\text{m/s}$]) wurde vereinfacht die gemessene Fließgeschwindigkeit der frei fließenden Leukozyten verwendet, mit $A_{\text{Kreis}} = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2$ gilt:

$$\mathbf{Flow} = v_{\text{Blut}} \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot \pi \cdot 10^{-3}$$

II.2.11.4.5 Scherrate [1/s]

Abgeleitet von Poiseuilles Gesetz für newtonsche Flüssigkeiten ergibt sich nach Kuhnle et al. für die Berechnung der Scherrate (Kuhnle et al. 1995) mit dem Gefäßdurchmesser (d [μm]) und der Fließgeschwindigkeit (v_{Blut} [$\mu\text{m/s}$]):

$$\mathbf{sr} = 8 \cdot \frac{v_{\text{Blut}}}{d}$$

II.2.12 Statistik

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat für Windows (Version 2.03; SPSS AG, Zürich, Schweiz). Aufgrund der geringen Gruppengrößen wurden statistische Methoden zur Berechnung nicht normalverteilter Variablen verwendet. Der statistische Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit der Kruskal-Wallis ANOVA nach Rängen, ein Test zum Vergleich von drei und mehr Gruppen (Kruskal et al. 1952). Diese ANOVA wurde ergänzt durch den paarweisen Vergleich nach der Dunn's Methode (Dunn 1964). Im direkten Paarvergleich wurde der Mann-Whitney Rangsummentest verwendet, ein modifizierter U-Test für nicht normalverteilte Variablen (Mann 1947). Wenn im Text nicht anders gekennzeichnet, sind die Ergebnisse im Folgenden als Mediane in Klammern angegeben.

III Ergebnisse

III.1 Vorversuche

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit wurden Versuche zur Implantationsmethode der Metallchips durchgeführt (siehe auch II.2.5 „Aufbringen der Implantate auf die CAM“). Metallchips ohne Fixation an Deckgläsern zeigten sich als zu schwer im Vergleich zu ihrer Auflagefläche. So kam es bei alleinigem Aufbringen der Metallchips mit der konvexen Seite nach unten entweder zum sofortigen oder späteren Versinken der Chips, wobei die CAM von den Metallchips nach unten, in Richtung des Hühnerembryos gezogen wurde. Zudem war die Lage der Chips sehr empfindlich gegenüber Bewegungen. Da die CAM durch das Eigengewicht der Metallchips nach unten gezogen wurde und somit die Gefäße nicht parallel zur Optik verliefen, war das direkt am Chip anliegende Gefäßnetz mit der IVM nicht fokussierbar. Eine Immersionsmikroskopie ohne Deckglas war ebenfalls nicht möglich, da die CAM an dem Objektiv adhärierte.

Deshalb wurden die Metallchips in weiteren Versuchen an kreisförmige Deckgläser mit einem Durchmesser von 15 mm oder 20 mm befestigt (s. Kapitel II.2.5 „Aufbringen der Implantate auf die CAM“). Dies ergab zum einen eine größere Auflagefläche, zum anderen war durch die Anlagerung der CAM an das Deckglas das Gefäßnetz direkt am Chip mit dem Mikroskop darstellbar (s. auch Abbildung 8). Die Fixation der Chips an Deckgläsern mit einem Durchmesser von 20 mm bot viel Platz für die Intravitalmikroskopie, jedoch wurde dadurch die Anzahl der geeigneten peripheren Punktionsstellen verringert (s. auch II.2.4 „Ein-/Ausschlusskriterien“). Bei Deckgläsern mit einem Durchmesser von 15 mm war dagegen sowohl ausreichend Möglichkeit für die Punktion als auch die Intravitalmikroskopie, sodass in den folgenden Hauptversuchen Deckgläser mit einem Durchmesser von 15 mm verwendet wurden.

III.2 Versuche zur Modellanwendung

III.2.1 Funktionelle Gefäßdichte Titan nativ, Nickel nativ und Kontrolle

24 h nach der Implantation wurde die funktionelle Gefäßdichte (FGD) bei **Titan nativ**, **Nickel nativ** und **Kontrolle** verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der FGD zwischen den CAM, denen Nickel-Metallchips oder Titan-Metallchips implantiert worden waren: Die untersuchten Areale direkt am Metallchip (0 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr, **FGDc**) zeigten bei **Nickel nativ** ($158,4 \text{ m/m}^2$) signifikant geringere Werte der FGD sowohl gegenüber der **Titan nativ** ($419,3 \text{ m/m}^2$) als auch gegenüber der **Kontrolle** ($401,7 \text{ m/m}^2$). Im ersten Blickfeld um das Implantat (**FGDz**) zeigten sich bei **Nickel nativ** ($165,8 \text{ m/m}^2$) ebenfalls signifikant geringere Werte der FGD sowohl gegenüber **Titan nativ** ($440,1 \text{ m/m}^2$) als auch gegenüber der **Kontrolle** ($401,7 \text{ m/m}^2$). Die je CAM gemittelten Werte sind jeweils als Einzelwerte in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt.

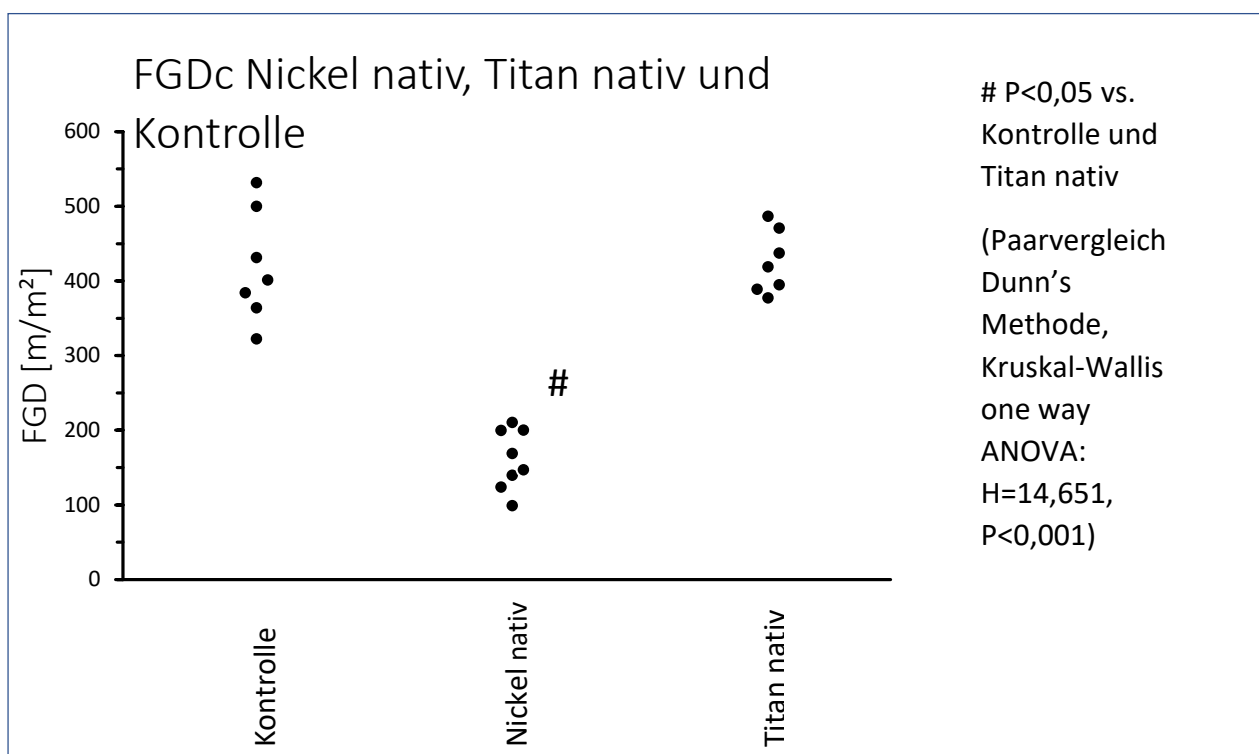


Abbildung 20: FGD direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle.

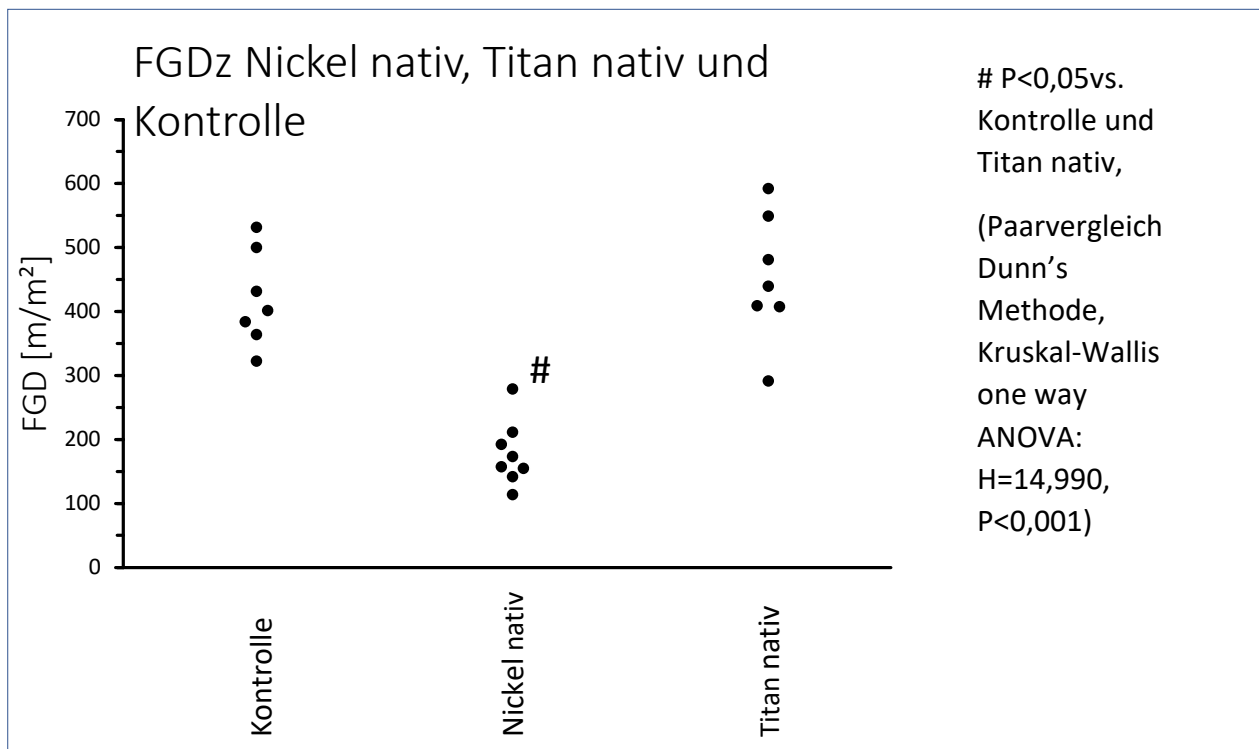


Abbildung 21: Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle

III.2.2 Funktionelle Gefäßdichte in verschiedenen Abständen zum Chip

Im internen Gruppenvergleich wurden die verschiedenen Areale bezogen auf die Entfernung zum Metallchip untereinander verglichen. Hier fanden sich bei **Titan nativ** (FGDc 434,0 m/m², FGDz 423,4 m/m², FGDp 441,4 m/m²) und **Nickel nativ** (FGDc 158,4 m/m², FGDz 165,8 m/m², FGDp 201,0 m/m²) keine signifikanten Unterschiede. Die je CAM gemittelten Werte sind jeweils als Einzelwerte in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.

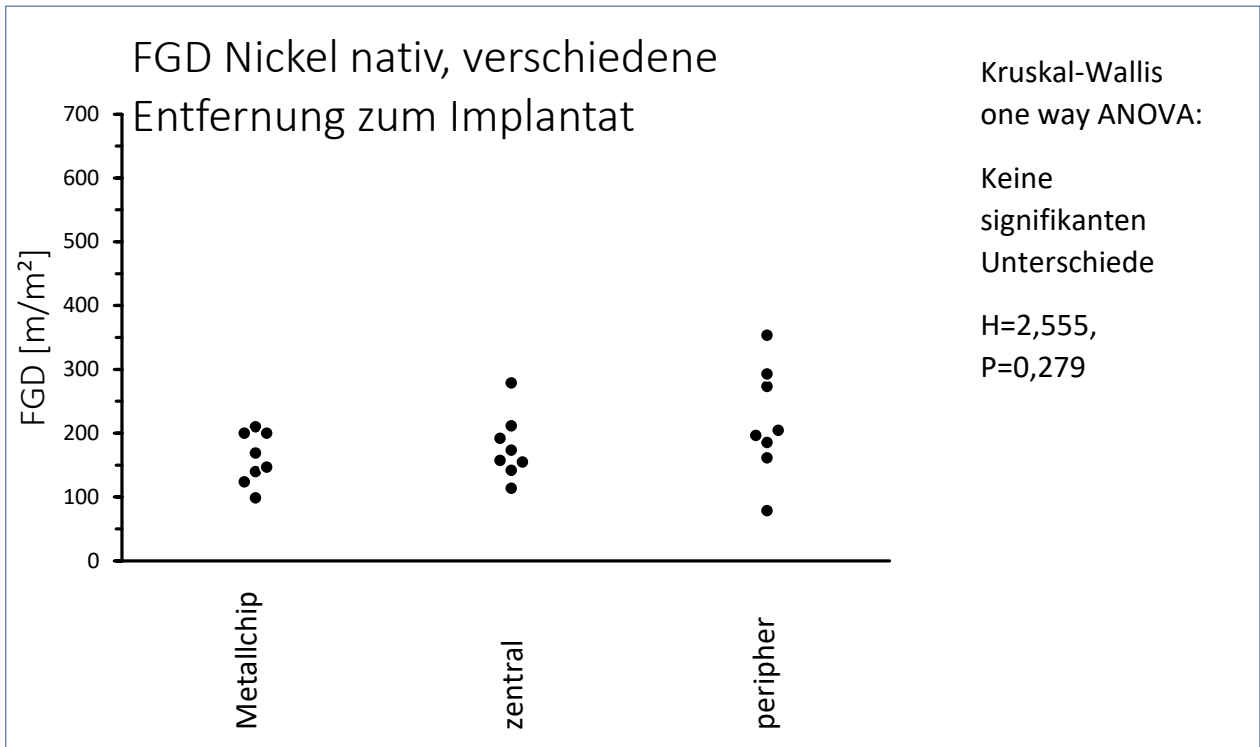


Abbildung 22: Funktionelle Gefäßdichte Nickel nativ, Einzelwertdarstellung, verschiedene Entfernungen zum Metallchip

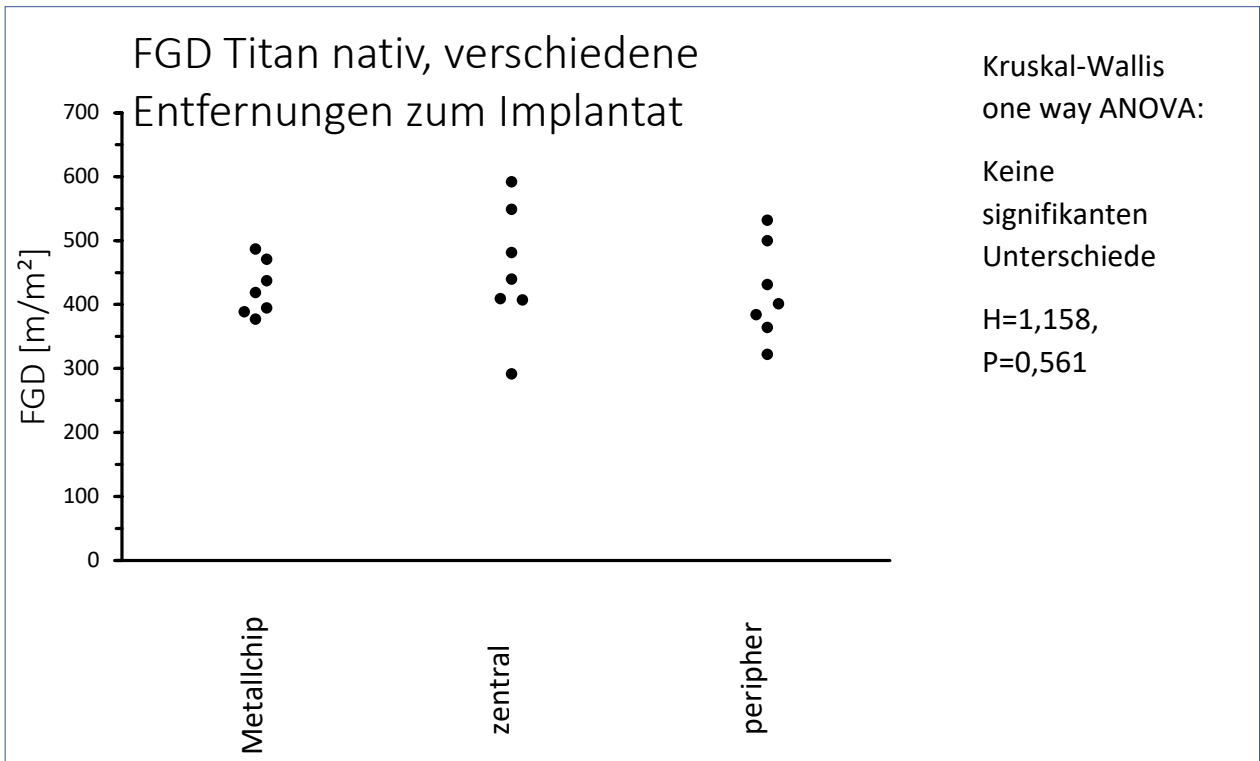


Abbildung 23: Funktionelle Gefäßdichte Titan nativ, Einzelwertdarstellung, verschiedene Entfernungen zum Metallchip

III.2.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion Titan nativ, Nickel nativ und Kontrolle

Die folgenden Werte 24 h nach Implantation der Metallchips wurden in Bezug auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion zwischen den Gruppen **Titan nativ**, **Nickel nativ** und **Kontrolle** mit Hilfe der Kruskal-Wallis one way ANOVA verglichen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der rheologischen Variablen Durchmesser, Flux, zentraler Fließgeschwindigkeit und Scherrate. Eine Übersicht der Mediane, samt 25 %-/75 %-Perzentile (in eckigen Klammern) sind in Tabelle 3 aufgeführt.

	Durchmesser [μm]	Flux [Zellen/($\text{mm}^2 \cdot \text{s}$)]	Zentrale Fließ- geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]	Blutfluss [pl/s]	Scherrate [$1/\text{s}$]
Nickel nativ zentral	41,1 [39,2;44,2]	1726,0 [1372,8;2055,0]	780,1 [655,7;906,0]	937,6 [814,0;1241,3]	161,6 [131,8;180,8]
Titan nativ zentral	42,4 [39,6;43,9]	1719,2 [1589,6;2073,0]	849,9 [764,0;936,4]	1231,2 [1070,0;1386,5]	159,0 [146,3;178,8]
Kontrolle	38,6 [35,8;42,4]	2094,5 [1589,4;2236,1]	857,5 [793,7;900,2]	995,9 [857,2;1287,5]	172,5 [167,8;188,5]
H:/P:	2,075/0,354	0,549/0,760	1,682/0,431	2,024/0,364	3,304/0,192
Keine signifikanten Unterschiede, Kruskal-Wallis one way ANOVA. Angegeben sind Median und [25-Perzentile; 75-Perzentile]					

Tabelle 3: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologische Variablen Nickel nativ, Titan nativ und Kontrolle

Der Anteil der Roller war in der Gruppe **Nickel nativ** (3,78 %) signifikant gegenüber **Kontrolle** (1,73 %) erhöht (Kruskal-Wallis one way ANOVA: $P=0,012$; Dunn's Methode: $P<0,05$). Die je CAM gemittelten Werte sind in Abbildung 24 als Einzelwerte dargestellt. Die Zelldichte der Sticker war bei **Nickel nativ** ($48,9 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$) signifikant höher als bei der **Kontrolle** ($8,8 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$). Die je CAM gemittelten Werte sind in der Abbildung 25 als Einzelwerte dargestellt.

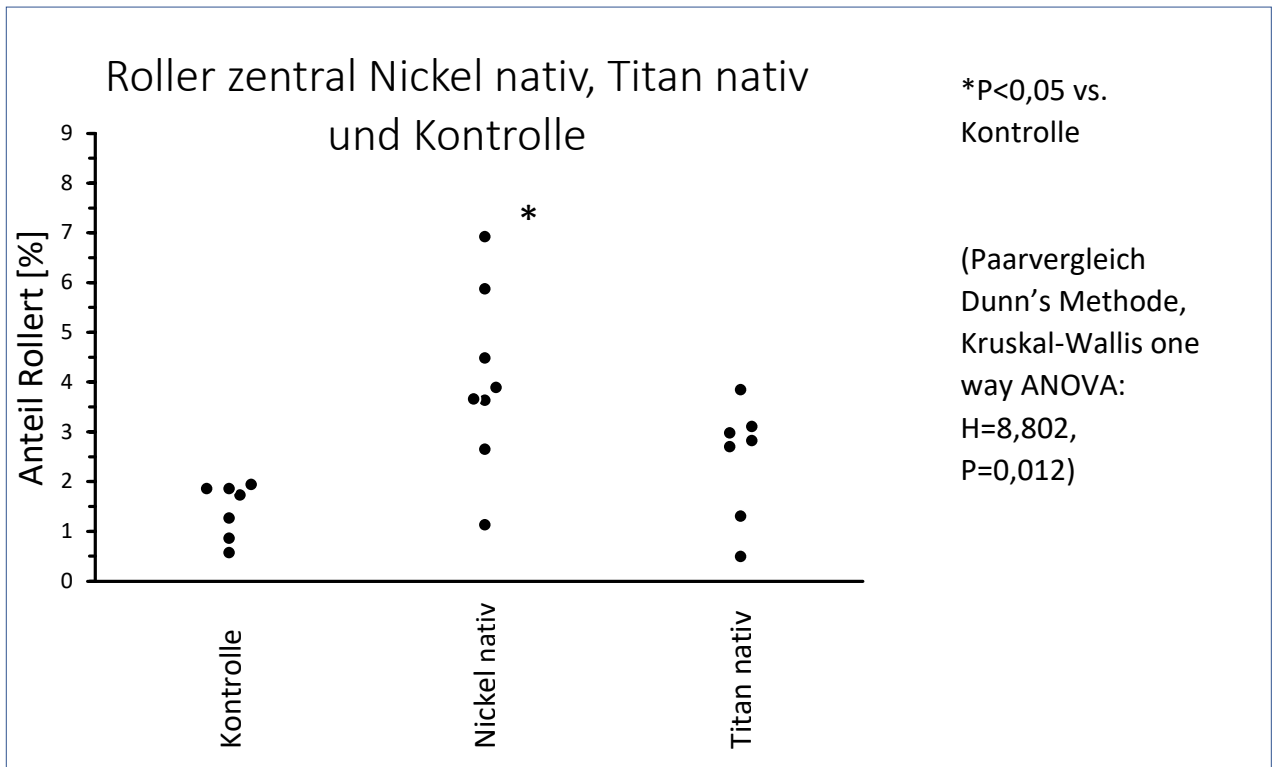


Abbildung 24: Anteil Roller, Einzelwertdarstellung, Nickel, Titan nativ und Kontrolle

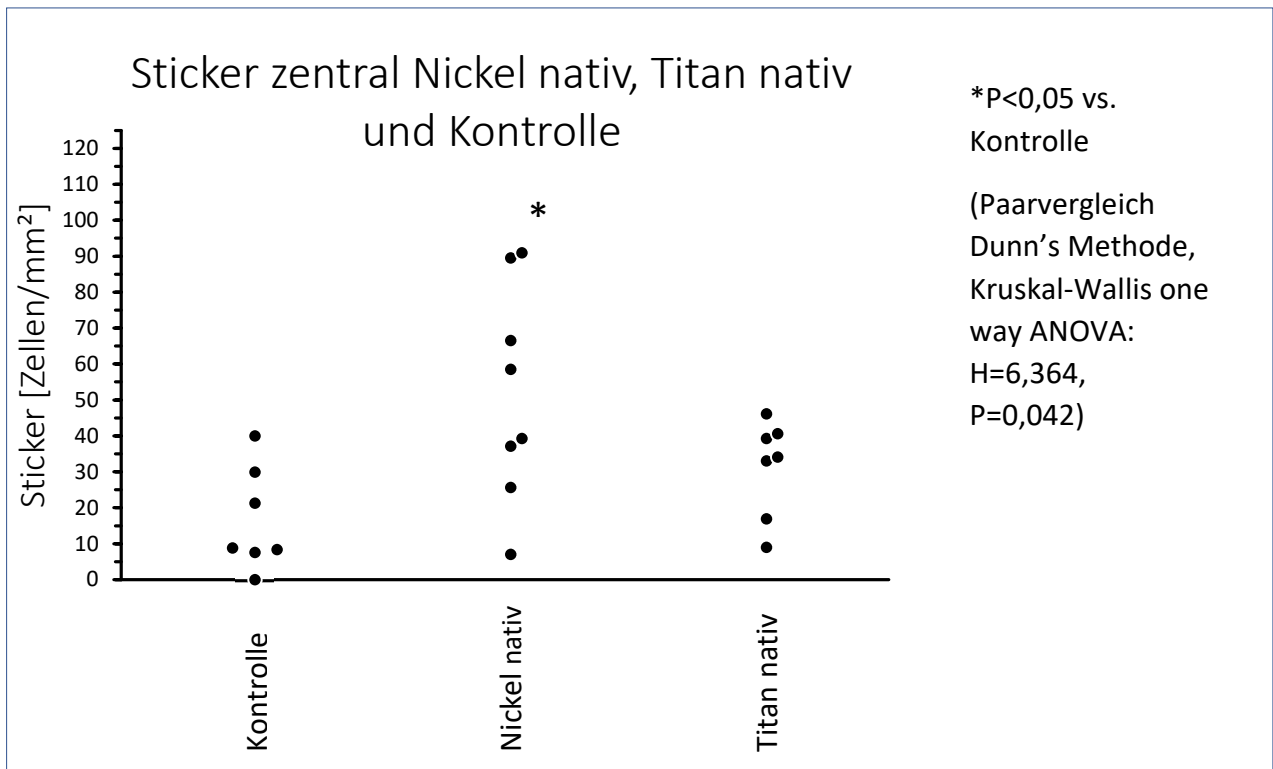


Abbildung 25: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel, Titan nativ und Kontrolle

III.3 Etablierung des Modells unter Anwendung von CAP

III.3.1. Funktionelle Gefäßdichte Nickel nativ und Nickel-CAP

Die Gruppen **Nickel-CAP** und **Nickel nativ** wurden jeweils paarweise mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. 24 h nach der Implantation zeigten sich signifikante Unterschiede der FGD. Die CAM, auf denen mit CAP behandelten Nickel-Metallchips implantiert wurden, zeigten gegenüber den CAM mit nativen Nickel-Metallchips eine signifikant höhere FGD. Dies galt für die Areale direkt am Nickel-Metallchip (**FGDc Nickel nativ** 158,4 m/m², **FGDc Nickel-CAP** 284,6 m/m², Mann-Whitney-Test: P<0,001) und für zentrale Areale im ersten Blickfeld um den Nickel-Metallchip (**FGDz Nickel nativ** 165,8 m/m², **FGDz Nickel-CAP** 268,6 m/m², Mann-Whitney-Test: P=0,020). Die je CAM gemittelten Werte sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 als Einzelwerte dargestellt.

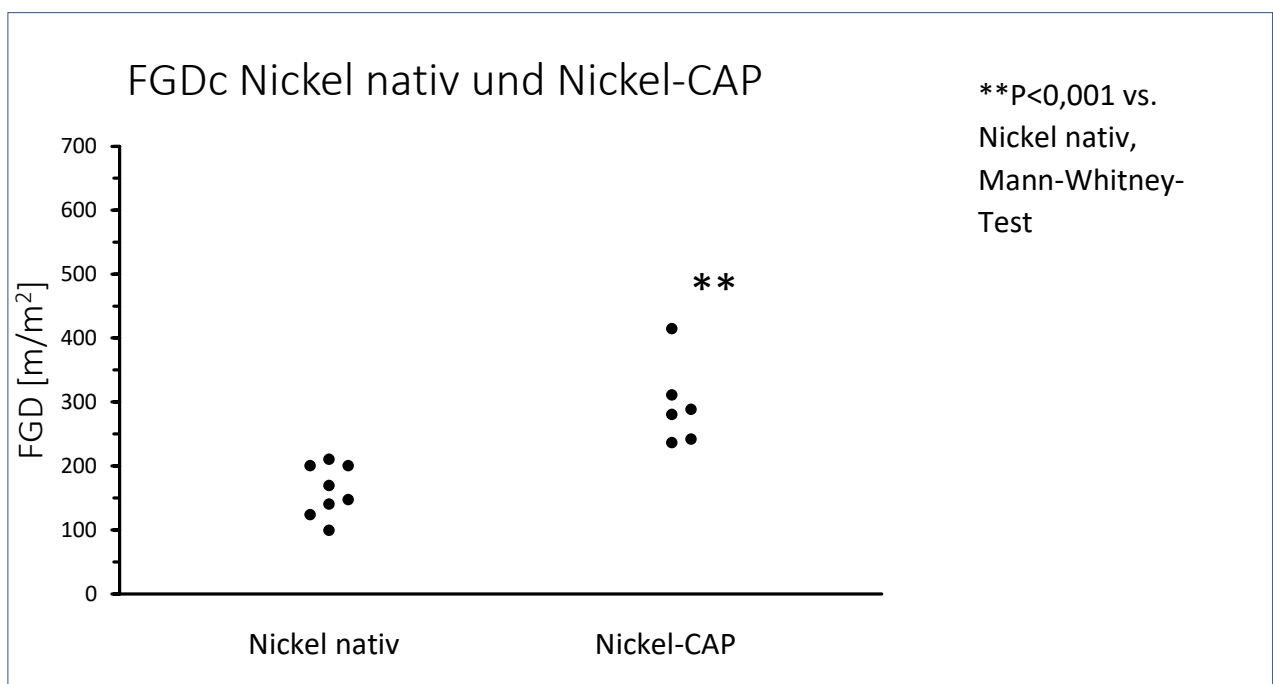


Abbildung 26: Funktionelle Gefäßdichte direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP

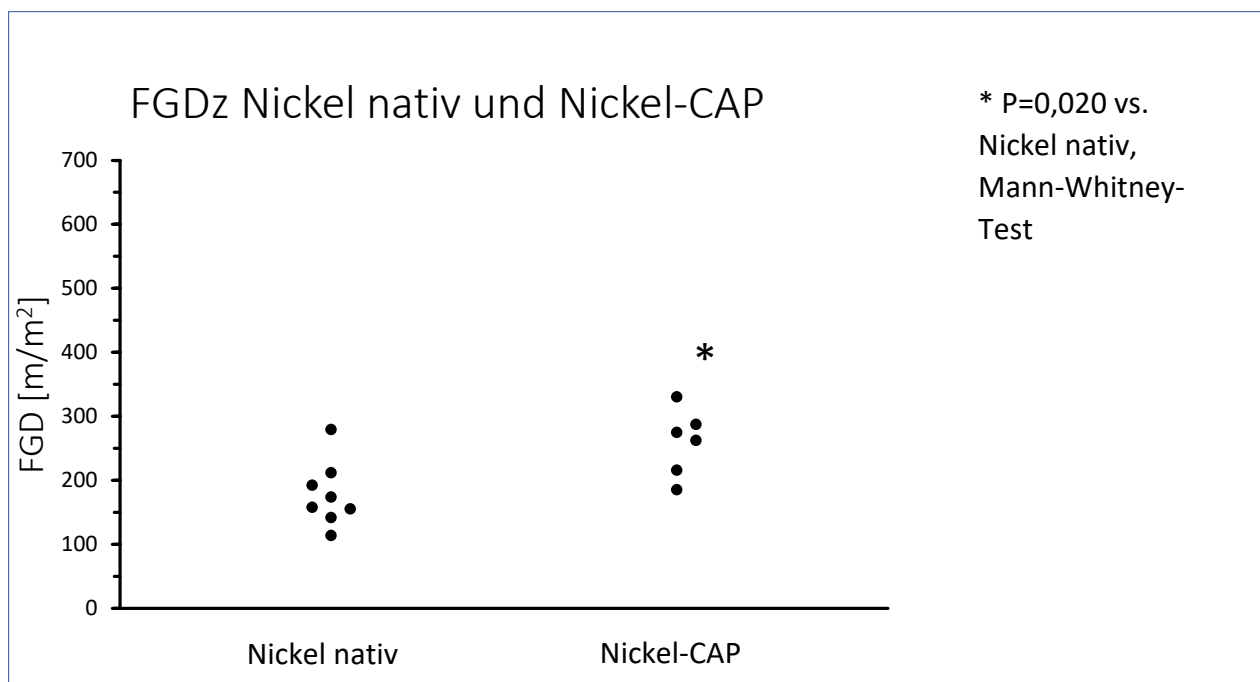


Abbildung 27: Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP

III.3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion Nickel nativ und Nickel-CAP

	Durchmesser [μm]	Flux [Zellen/($\text{mm}^2 \cdot \text{s}$)]	Zentrale Fließ- geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]	Blutfluss [pl/s]	Scherrate [1/s]
Nickel nativ zentral	41,1 [39,2;44,2]	1726,0 [1372,8;2055,0]	780,1 [655,7;906,0]	937,6 [814,0;1241,3]	161,6 [131,8;180,8]
Nickel-CAP zentral	40,43 [36,4;44,9]	1841,64 [1489,0;2346,6]	935,95 [824,5;968,9]	1221,77 [971,1;1407,6]	190 [164,5;206,2]
P:	0,852	0,7555	0,081	0,414	0,142
Keine signifikanten Unterschiede, Mann-Whitney-Test. Angegeben sind Median und [25-Perzentile; 75-Perzentile] und P-Werte.					

Tabelle 4: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologischer Variablen, Nickel nativ und Nickel-CAP

Zwischen den Gruppen **Nickel nativ** und **Nickel-CAP** fanden sich im paarweisen Vergleich mittels Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die rheologischen Variablen Durchmesser, Flux, zentrale Fließgeschwindigkeit, Blutfluss und Scherrate. Eine Auflistung der jeweiligen Mediane und der 25 %-/75 %-Perzentile (in eckigen Klammern) finden sich in Tabelle 4.

24 h nach Implantation der Metallchips zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anteile der Roller, zwischen den Gruppen **Nickel nativ** (3,8 %) und **Nickel-CAP** (2,6 %). Auch bei der Zelldichte der Sticker zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen **Nickel nativ** (48,9 Zellen/mm²) und **Nickel-CAP** (65,1 Zellen/mm²). Die je CAM gemittelten Werte sind in Abbildung 28 und 29 als Einzelwerte dargestellt.

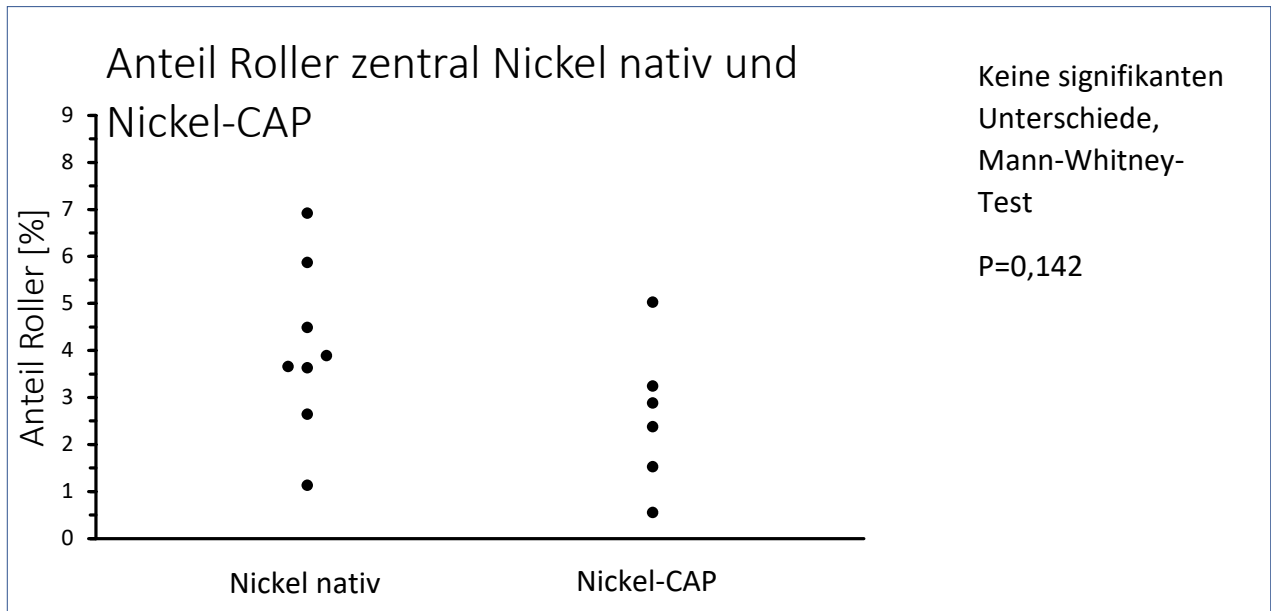


Abbildung 28: Anteil Roller zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP

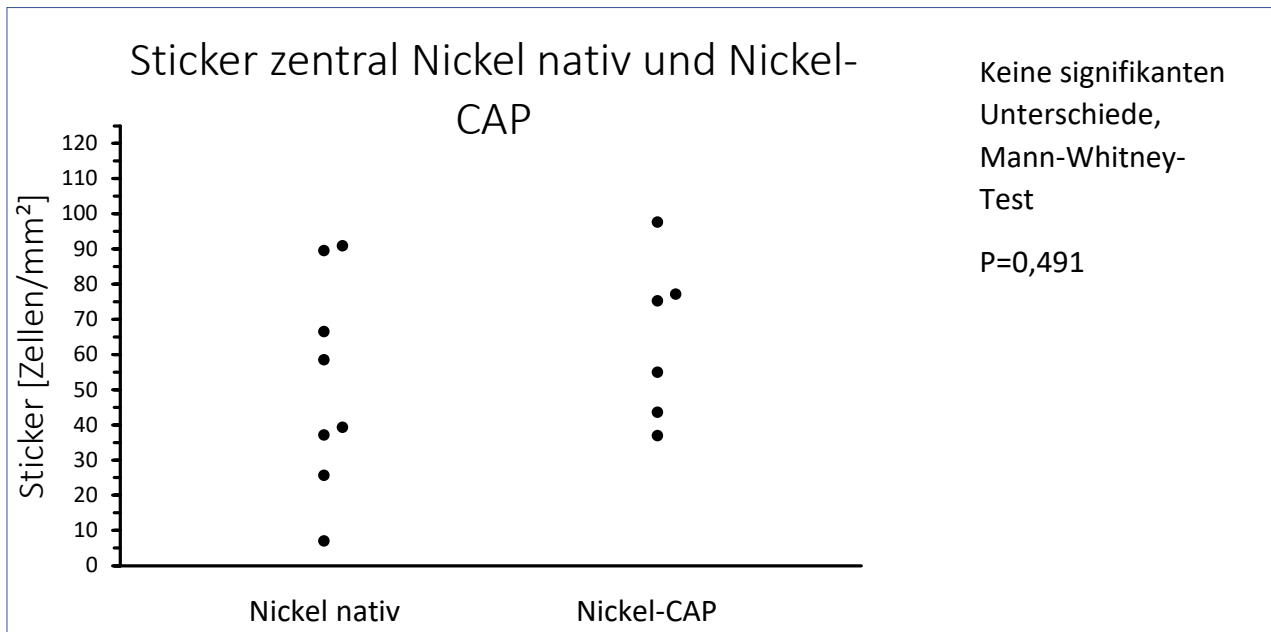


Abbildung 29: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Nickel nativ und Nickel-CAP

III.3.3 Funktionelle Gefäßdichte Titan nativ und Titan-CAP

Die Gruppen **Titan-CAP** und **Titan nativ** wurden paarweise mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. 24 h nach Implantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der FGD.

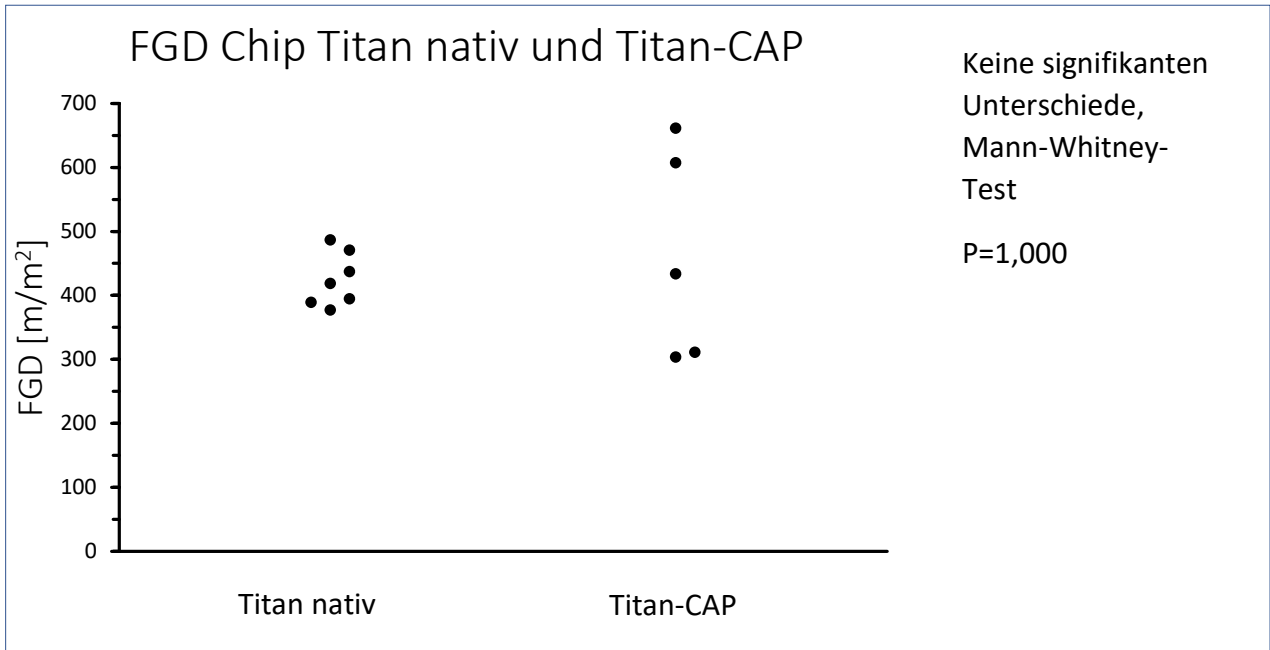


Abbildung 30: Funktionelle Gefäßdichte direkt am Metallchip, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP

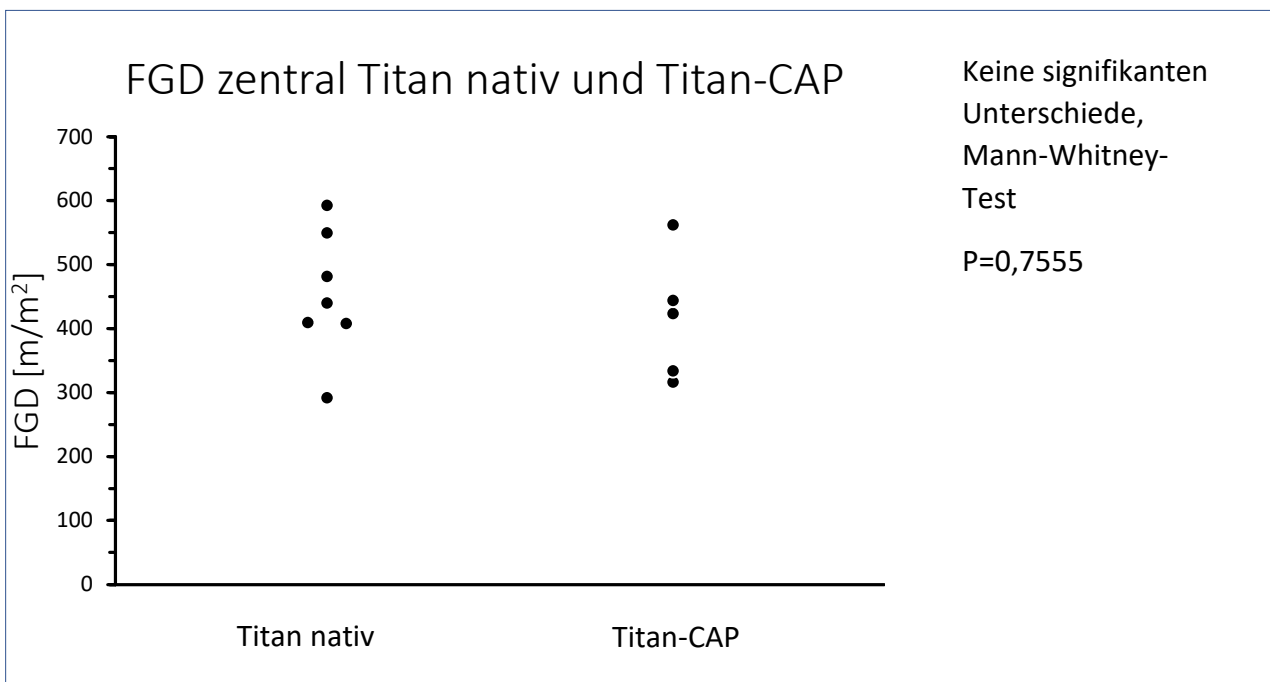


Abbildung 31 Funktionelle Gefäßdichte zentral, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP behandelt

Dies galt für die Areale direkt am Titan-Implantatchip (**FGDc Titan nativ** 419,3 m/m², **FGDc Titan-CAP** 434,0 m/m²) und für zentrale Areale im ersten Blickfeld um den Metallchip (**FGDz Titan nativ** 440,1 m/m², **FGDz Titan-CAP** 423,4 m/m²). Die je CAM gemittelten Werte sind in Abbildung 30 und 31 als Einzelwerte dargestellt.

III.3.4 Leukozyten-Endothel-Interaktion Titan nativ und Titan-CAP

Zwischen den Gruppen **Titan nativ** und **Titan-CAP** fanden sich im paarweisen Vergleich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die rheologischen Variablen Durchmesser, Flux, zentrale Fließgeschwindigkeit, Blutfluss und Scherrate. Die Mediane und 25%/75%-Perzentile (in eckigen Klammern) sind in Tabelle 5 aufgeführt.

	Durchmesser [μm]	Flux [Zellen/(mm ² ·s)]	Zentrale Fließ- geschwindigkeit [μm/s]	Blutfluss [pl/s]	Scherrate [1/s]
Titan nativ zentral	42,4 [39,6;43,9]	1719,2 [1589,6;2073,0]	849,9 [764,0;936,4]	1231,2 [1070,0;1386,5]	159,0 [146,3;178,8]
Titan-CAP zentral	38,9 [37,6;41,8]	1561,6 [1039,3;1954,5]	946,7 [748,1;993,9]	1130,2 [1046,2;1207,7]	195,29 [155,6;204,7]
P:	0,343	0,530	0,639	0,432	0,268
Keine signifikanten Unterschiede, Mann-Whitney-Test. Angegeben sind Median und [25%-Perzentil; 75%-Perzentil]					

Tabelle 5: Leukozyten-Endothel-Interaktion, Auflistung rheologischer Variablen, Titan nativ und Titan-CAP

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anteile der Roller zwischen den Gruppen **Titan nativ** (2,8 %) und **Titan-CAP** (0,6 %). Ebenso ließ sich bei der Zelldichte der Sticker zwischen den Gruppen **Titan nativ** (34,1 Zellen/mm²) und **Titan-CAP** (44,5 Zellen/mm²) jeweils 24 h nach Implantation kein signifikanter Unterschied nachweisen. Die je CAM gemittelten Werte sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 als Einzelwerte dargestellt.

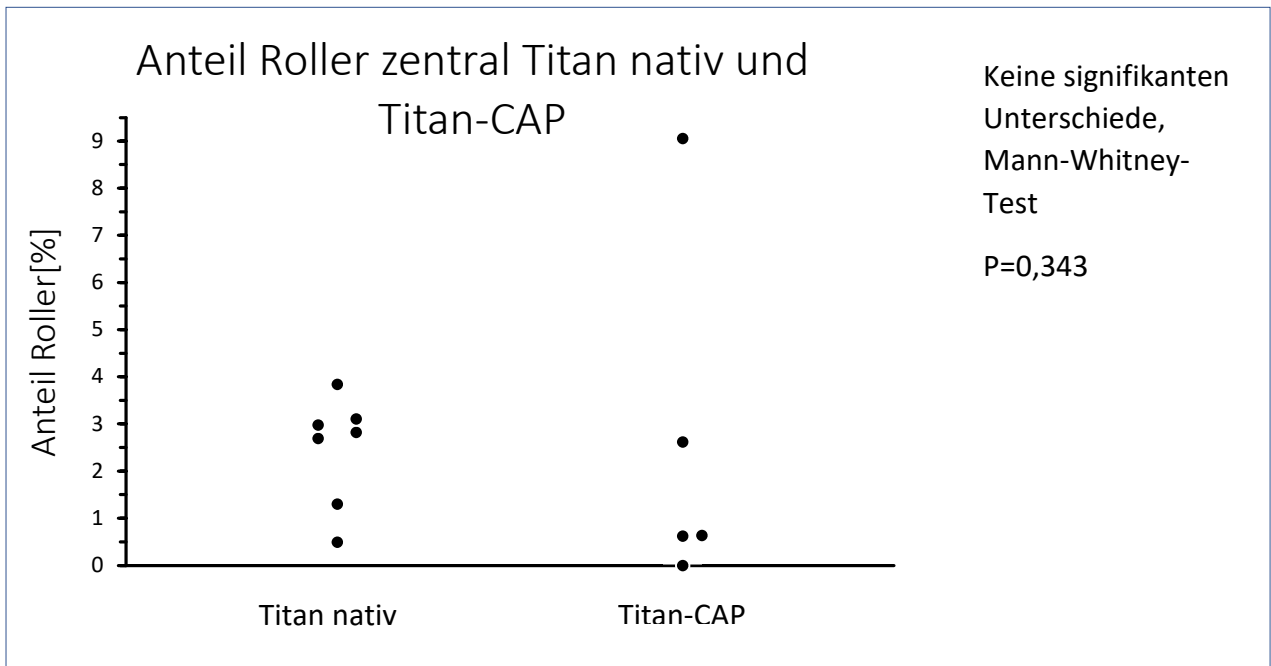


Abbildung 32: Anteil Roller zentral, Einzelwertdarstellung Titan nativ und Titan-CAP

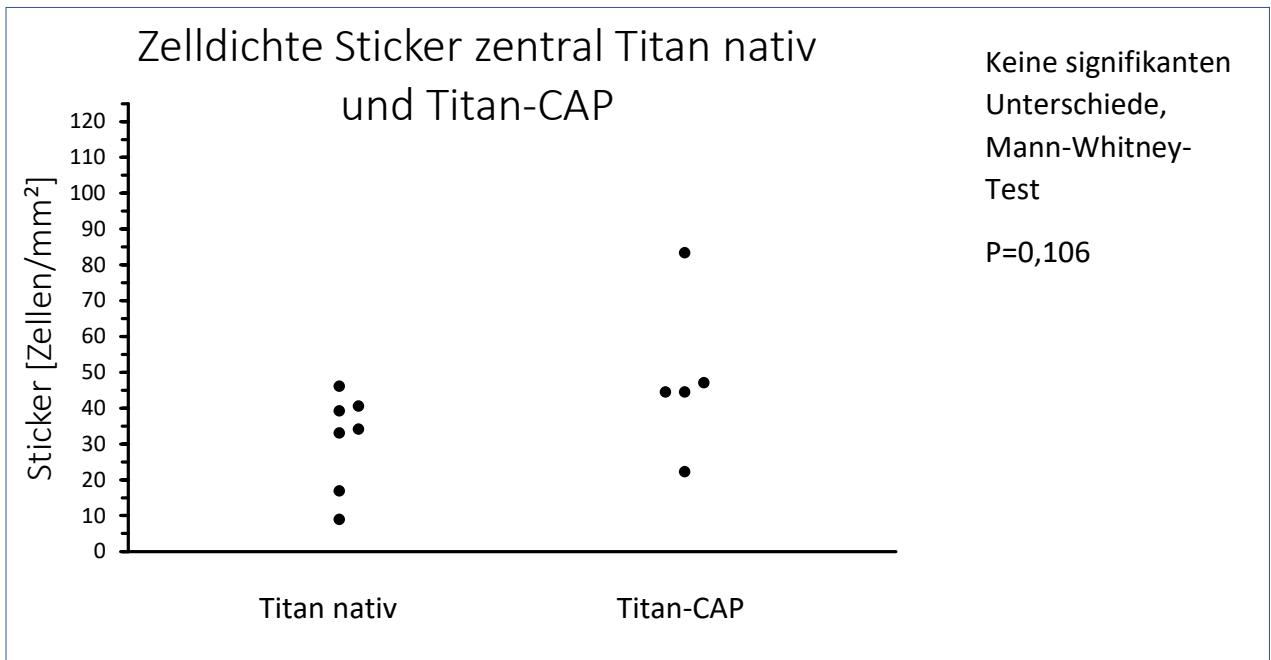


Abbildung 33: Zelldichte der Sticker zentral, Einzelwertdarstellung, Titan nativ und Titan-CAP

IV Diskussion

IV.1 Methode

IV.1.1 Eignung des Modells

Wie in Kapitel II.2.1 „Einführung“ erläutert, ist das in dieser Arbeit vorgestellte Modell eine eigene Weiterentwicklung des bereits in der internationalen Literatur etablierten HET-CAM-Modells.

Ein Modell am lebenden Hühnerembryo stellt einen Zwischenschritt zwischen *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten dar (Kemper et al. 1986). Bereits seit den 1980er Jahren ist der Hühner-Embryonen-Test als kostengünstiges und relativ schnell durchzuführendes Testverfahren bekannt (Luepke 1985). Die HET-CAM Methode bietet eine leicht zugängliche hoch vaskularisierte extraembryonale Membran zur Untersuchung der Mikrozirkulation (Djonov et al. 2000). Testreagenzien können entweder direkt auf die CAM gegeben, intravasal oder intra-allantoin injiziert werden (Staton et al. 2009). Der HET-CAM ist bereits ein weit verbreitetes Verfahren zur Untersuchung der Angiogenese und Antiangiogenese; so wurden beispielsweise zwischen 2000-2009 mehr als 700 Studien zu diesem Thema mit Hilfe des HET-CAM durchgeführt (Ribatti 2010).

Nach §14 der „Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 394 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist“, sind Versuche an lebenden Hühnerembryonen, nur dann im Sinne der oben genannten Verordnung zu behandeln, wenn sie „in einem Entwicklungsstadium vor der Geburt oder dem Schlupf verwendet werden oder verwendet werden sollen, wenn die Tiere über dieses Entwicklungsstadium hinaus weiterleben sollen und nach der Geburt oder dem Schlupf infolge der Verwendung voraussichtlich Schmerzen oder Leiden empfinden oder Schäden erleiden werden“. Somit handelt es sich bei dem vorgestellten Modell rechtlich nicht um einen Tierversuch. Die CAM, welche in dem hier vorgestellten Modell als Implantatlager dient, ist eine schmerzunempfindliche extraembryonale Membran (Luepke 1992). Zudem wird angenommen, dass die Hühnerembryonen selbst bis zum 15. Bebrütungstag keine Schmerzen empfinden können (Ribatti 2016).

Ein CAM-Modell bietet ein verlässliches, reproduzierbares und im Vergleich zu Tiermodellen relativ einfaches und kostengünstiges Testverfahren zur Untersuchung der Angiogenese (Ribatti 2010). Dennoch können äußere Einflüsse wie Transportbedingungen, mechanischer Stress, Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen zu einem Absterben der Hühnerembryonen führen oder die Entwicklung der CAM beeinflussen. Änderungen der Sauerstoffbedingungen und des pH-Wertes können ebenfalls einen Einfluss auf die CAM haben (Auerbach et al. 1991). Schwankungen der Brütertemperatur sowie der Luftfeuchtigkeit können durch die hier verwendete computergesteuerte klimatisierte Bebrütungssysteme vermieden werden. Während der Präparation der Eier wurde durch Verwendung einer Wärmeplatte für konstante Versuchsbedingungen bezüglich der Temperatur gesorgt und ein Auskühlen der Eier verhindert. Zum Schutz vor Austrocknung oder Infektion der CAM wurden die eröffneten Eier zwischen der Präparation und den eigentlichen Versuchen mit Hilfe von Tegaderm® verschlossen. Um Infektionen vorzubeugen, erfolgte die Wischdesinfektion vor dem Eröffnen der Hühnereier mit Ethanol 70 % und die Brutschränke wurden nach jedem Durchgang mit Terralin® wischdesinfiziert. Auf eine Wischdesinfektion der Eier mit kommerziell erhältlichen Fertigprodukten wie beispielsweise Sterillium® zum Zeitpunkt der Lieferung, vor Beginn der Bebrütung wurde verzichtet, da Kluge et al. hierbei hohe Letalitätsraten beobachteten, die vermutlich auf Mecetroniumetilsulfat zurückzuführen waren (Kluge 2015). Bei den in dieser Studie verwendeten Kohorten lag der Anteil der durch den Transport beschädigten Eier bei 4,3 % und der nicht belegten Eier bei 6,1 %. Die Anzahl der zum Versuchszeitpunkt nicht vitalen Eier lag bei 13,5 %. Demnach waren 23,9 % der gelieferten Eier vor der Präparation nicht für die geplanten Versuche geeignet. Nach der Präparation mussten aufgrund der Ausschlusskriterien in Bezug auf die Gefäßarchitektur oder Verletzung der CAM bei der Präparation weitere 35,2 % der Eier ausgeschlossen werden. 24 h nach der Implantation lag die Letalitätsrate der Versuchseier nach erfolgter Implantation bei 37,7 %. Hierbei wurden auch Eier mit Stase in den Hauptgefäßen hinzugezählt. Bender et al. untersuchten die direkte Anwendung von CAP mit Hilfe des HET-CAM. Sie berichteten 24 h nach Präparation von einer gruppenunabhängigen Letalitätsrate von 26,3 %. Ein Erklärungsansatz könnte die Entfernung der Eischale und die damit verbundene Änderung des Mikromilieus mit Auswirkungen auf den Metabolismus sein (Bender et al. 2010). Zusätzlich scheint die Entfernung der inneren Eimembran zu höheren Mortalitätsraten zu führen. So zeigten die Kontrollgruppen bei Kluge et al. drei Tage nach der Präparation (am elften

Bebrütungstag), bei der zunächst nur die Eischale nicht aber die innere Eimembran entfernt wurde, Vitalitätsraten von 100 % (Kluge 2015).

IV.1.1.1 Besonderheiten und Unterschiede der Blutzellen des Hühnerembryos im Vergleich zu Blutzellen des Säugers und mögliche Einschränkungen in Bezug auf die LEI

IV.1.1.1.1 Kernhaltige Zellen/Kritik der Verwendung des Begriffs „Leukozyten-Endothel-Interaktion“

Im Gegensatz zu den zirkulierenden Blutzellen des gesunden adulten Menschen sind beim Hühnerembryo neben den Lymphozyten auch Erythrozyten und Thrombozyten des Hühnerembryos kernhaltig (Lucas a) et al. 1961, Lucas b) et al. 1961). Im Blut eines mit Plasmodium Gallinaceum infizierten Hühnerembryos wurden heterophile Granulozyten, heterophile Myelozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten beobachtet (Zuckerman 1946). Generell scheint der Anteil der Heterophilen von Individuum zu Individuum sehr unterschiedlich zu sein (Lucas b) et al. 1961). Granulozyten sind ab der zweiten Embryonalwoche im Blut des Hühnerembryos nachweisbar, die Präsenz von Makrophagen im Blut des Embryos scheint am zehnten Embryonaltag besonders hoch zu sein (Lucas a) et al. 1961). Neben Erythrozyten und Thrombozyten können sich demnach auch heterophile Granulozyten und Myelozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten im Blut von Hühnerembryonen befinden (Zuckerman 1946, Lucas a) et al. 1961, Lucas b) et al. 1961). Die heterophilen Granulozyten der Vögel erfüllen trotz mangelnder Myeloperoxidase ähnliche Aufgaben wie die neutrophilen Granulozyten in Säugetieren (Montali 1988). All diese Zellen des Blutstroms besitzen einen Zellkern (Lucas a) et al. 1961, Lucas b) et al. 1961) und können theoretisch durch Rhodamin 6G angefärbt werden, da Rhodamin 6G ein Farbstoff zur Markierung von Nukleinsäuren ist (s. Kapitel II.2.8.1 „Zellmarkierung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes“). Die Abbildungsqualität des vorgestellten Versuchsaufbaus ist nicht ausreichend, um morphologische Unterschiede zwischen z.B. Erythrozyten und Leukozyten detektieren zu können. Daher können mit der hier vorgestellten Methode bisher keine exakten Rückschlüsse auf die Art und Herkunft der markierten und immunologisch aktivierten Zellen (Roller/Sticker) gemacht werden. Diesbezüglich wären weitere Analysen unter Verwendung spezifischerer Marker oder gleichzeitiger Blutentnahme mit Differential-Blutbild denkbar. Aus den oben genannten Gründen kann daher der Begriff „Leukozyten-Endothel-

Interaktion“ wie er in der Literatur verwendet wird nicht eins zu eins in Bezug auf die intravitalmikroskopische Untersuchung am Hühnerei übernommen werden. Da es sich hier am ehesten um Interaktionen der immunkompetenten Zellen mit dem Endothel handelt. Der Verständlichkeit halber wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch weiterhin der Begriff „Leukozyten-Endothel-Interaktion“ verwendet.

IV.1.1.1.2 Phagozytose-Eigenschaften der Blutzellen von Hühnerembryonen

Die Blutzellen des Hühnerembryos weisen weitere Besonderheiten auf. So finden sich in der Fachliteratur Hinweise, dass neben den Leukozyten auch Erythrozyten und Thrombozyten phagozytoseaktiv und damit an der unspezifischen Immunreaktion beteiligt sein können: Laut Oláh et al. haben Thrombozyten bei Vögeln neben der Blutstillung auch die Funktion der Phagozytose (Oláh et al. 2014). Für Hühnerembryonen zwischen dem vierten bis neunten Bebrütungstag konnte die Aufnahme von Tuschepartikeln sowie am zehnten Bebrütungstag die Aufnahme von Armin-Partikeln durch wenige Erythrozyten oder „erythrozytengleiche Zellen“ beobachtet werden (Heine 1936). In einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Tuscheinjektion an zwei bis vier Tage alten Embryonen konnte Steinmüller zeigen, dass „eine große Anzahl Erythrozyten in den Gefäßen phagozytiert haben“ (Steinmüller 1937). Während der Ontogenese finden sich verschiedene Entwicklungsstadien der Erythrozyten im Blutkreislauf: Während am dritten und vierten Bebrütungstag Proerythrozyten I dominieren (> 85%), finden sich am zehnten und elften Bebrütungstag vor allem Proerythrozyten II (> 90%) und Erythrozyten I, jedoch keine Proerythrozyten I im Blut des Hühnerembryos (Dawson 1936). Möglicherweise lassen sich hierdurch die unterschiedlichen Mengen der von Heine und Steinmüller gefundenen Erythrozyten mit phagozytotischen Eigenschaften erklären. Wu et al. konnten die Aufnahme und intrazelluläre Digestion von Proteinen und Peptiden aus dem Serum durch Blutzellen des Hühnerembryos nachweisen, die ab dem fünften Bebrütungstag abnahm. Da es sich nicht um eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme handelte, postulierten sie, dass diese Zellen vor der definitiven Erythropoese Teil des angeborenen Immunsystems sein könnten (Wu et al. 2009).

Die Frage der Phagozytose-Eigenschaften der Blutzellen am zehnten und elften Bebrütungstag ist noch nicht hinreichend geklärt. Ebenso ist unklar, in wie weit die verschiedenen Zellarten an der unspezifischen Immunantwort des Hühnerembryos beteiligt sind. Es ist demnach nicht eindeutig geklärt, ob die beobachteten aktivierten Zellen (Roller und Sticker) ausschließlich

zur Gruppe der Leukozyten gehören. Alle scheinen jedoch an der Immunreaktion beteiligt zu sein.

IV.1.1.2 Immunkompetenz des Hühnerembryos

Ein vollständig ausgereiftes Immunsystem findet sich bei Hühnern erst Tage nach dem Schlüpfen (Mast et al. 1999). Zur Immunkompetenz des Hühnerembryos finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben:

Hühnerembryonen erhalten ebenso wie Säugetierembryonen maternale Antikörper. Diese über den Eidotter aufgenommenen Antikörper übernehmen bis zur ausreichenden Reife des eigenen Immunsystems die antigen-spezifische Immunantwort (Hamal et al. 2006, Fella et al. 2014).

Hämatopoetische Stammzellen besiedeln sehr früh die Milz (3.-4. Bebrütungstag), das Knochenmark ab dem 10. Bebrütungstag und den Thymus in drei Phasen: am 7.-8., 12.-14. und 18.-21. Bebrütungstag (Fella et al. 2014). Präbursale Stammzellen besiedeln die Bursa Fabricius zwischen dem 8.-14. Bebrütungstag (Davison 2014). Die Zellen, die in der Bursa Fabricius heranreifen, werden zu B-Zellen und sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich, während die Zellen des Thymus sich zu T-Zellen entwickeln und wichtig für die zelluläre Immunantwort sind (Warner a) et al. 1962, Warner b) et al. 1962, Fella et al. 2014). Jankovic nutzte für seine Versuche zur Immunkompetenz des Hühnerembryos Embryonen am zwölften Bebrütungstag, die er mit Zellen von lymphatischen Organen von 14, 16, 19 und 21 Tage alten Hühnerembryonen beimpfte. Er konnte damit zeigen, dass Zellen des Thymus, der Milz und des peripheren Blutes von 14 Tage alten Embryonen in der Lage waren, eine Graft-Versus-Host-Reaktion in Form von Lymphozyten-Pocken („L-pocks“) hervorzurufen. Zellen von Thymus und Bursa von 14 Tage alten Embryonen waren zudem in der Lage, eine Splenomegalie beim Rezipienten zu verursachen. Die Beimpfung mit Zellmaterial von lymphatischen Organen des 12 Tage alten oder jüngeren Embryonen wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es wurde jedoch gezeigt, dass am zwölften Bebrütungstag der Thymus verglichen mit den anderen lymphatischen Organen am stärksten mit Lymphozyten besiedelt ist (Jankovic et al. 1975).

Ein weiterer Aspekt der Immunkompetenz ist die Möglichkeit zur Mobilisierung von Immunzellen. Normalerweise befinden sich nach Lucas et al. bis zum Schlüpfen des Kükens

nur Erythrozyten und Thrombozyten im Blutkreislauf des Hühnerembryos (zu besonderen Eigenschaften dieser Zellen siehe IV.1.1.1.2 „Phagozytose-Eigenschaften der Blutzellen“). Sie halten es jedoch für möglich, dass der Embryo auf Stimulationen, wie Infektionen oder Manipulation, beispielweise durch die Präparation, mit der Freisetzung von Granulozyten aus Granulozytenspeichern reagieren kann (Lucas a) et al. 1961). Als Beispiel führen Lucas et al. die von Zuckerman nach Infektion mit Plasmodium gallinaceum beobachtete dramatische Erhöhung der Heterophilen, sowie die Präsenz von Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten an (Zuckerman 1946, Lucas a) et al. 1961).

Unabhängig davon wird das embryonierte Hühnerei aufgrund der bis zur zweiten Entwicklungswoche bestehenden eingeschränkten Immunfunktion und der damit einhergehenden Akzeptanz von diversen auch artfremden Transplantatmaterialien im Bereich der Krebsforschung eingesetzt (Jankovic et al. 1975, Cimpean et al. 2008, Ribatti 2014). Auch hier ist der zeitliche Rahmen durch die ab dem 15. Bebrütungstag einsetzende nicht spezifische Immunantwort begrenzt (Ribatti 2016). Verschiedene Tumorversuchsprotokolle wie zum Beispiel das TUM-CAM Modell (Tumor-Chorio-Allantois-Membran Modell) beginnen daher bereits am siebten Bebrütungstag mit der Tumorbeimpfung (Durupt et al. 2012, Partecke et al. 2012).

Eine andere Anwendung, die sich die initiale Immuninsuffizienz des Hühnerembryos zunutze macht, ist die Anzüchtung von Viren (Goodpasture et al. 1931).

Der Hühnerembryo scheint also in der Lage, wenn auch eingeschränkt, auf Stimuli in der Umgebung mit einer Aktivierung des Immunsystems zu reagieren. Sei es durch Mobilisation von immunologisch-aktiven Zellen oder mit Hilfe der weiter oben erläuterten phagozytotisch aktiven Blutzellen. Allerdings scheint diese Fähigkeit zum Versuchszeitpunkt noch nicht ausreichend, um Viren oder allogene/xenogene Tumorzellen suffizient bekämpfen zu können.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte eine Aktivierung der Immunzellen im Sinne einer gesteigerten LEI am 11. Bebrütungstag nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich mit denen, die Lehmann et al. nach der direkten Applikation von CAP auf die CAM am neunten Bebrütungstag machen konnten: Während die CAMs der unbehandelte Kontrolleier keine LEI zeigten, war diese bei den direkt mit CAP behandelten CAMs signifikant erhöht (Lehmann et al. 2013).

IV.1.1.3 Zusammenfassung Eignung des Modells

Trotz der vorhergehend bereits aufgelisteten Unterschiede zwischen Vögeln und Säugetieren, wie dem Menschen, eignet sich das vorgestellte Modell zu einer Prognose über die potentielle Reaktion des menschlichen Organismus auf die getesteten Implantatmaterialien. Im Hühnereimodell können immunologische Reaktionen beobachtet werden (siehe IV.1.1.2 „Immunkompetenz des Hühnerembryos“) und die Auswirkung auf das umliegende Gewebe und die Mikrozirkulation in einem 3-Kompartimenten Modell untersucht werden. Im direkten Vergleich zum Draize-Test am Kaninchenauge erzielte der HET-CAM als Vorläufer des hier vorgestellten Modells eine Spezifität von 96 %-98 %, bei niedriger Sensivität (48 %-65 %) bei der Analyse des Augen-Irritations-Potentials (Scheel et al. 2011).

Das Modell scheint sich zum relativ einfachen Screening von neuen Implantatmaterialien und deren Oberflächenmodifikationen zu eignen. Implantatmaterialien, die in dem vorgestellten Modell bezüglich der FGD und LEI positive Eigenschaften zeigen, können anschließend im Tiermodell weiter analysiert werden. Ungeeignete Materialien können demgegenüber frühzeitig ausgeschlossen werden. So können nicht zuletzt im Sinne der 3R (Russell et al. 1959) Tierversuche reduziert und Kosten für aufwändigere Tierversuche vermieden werden.

IV.1.2 Versuchsprotokoll

IV.1.2.1 Ablauf vor dem Bebrütungsstart

Es finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben über die für den Beginn der embryonalen Entwicklung/Bebrütung nötige Mindesttemperatur auch „physiological zero“ (physiologisch Null) genannt. So nannte Edwards eine Mindesttemperatur von 21 °C (Edwards 1902) während Funk und Biellier unterhalb von 27 °C keine nennenswerte Blastoderm-Entwicklung konstatierten (Funk et al. 1944). Fasnko prägte den Begriff embryonale Diapause, da zelluläre metabolische Prozesse auch in Abwesenheit mikroskopisch sichtbarer Embryonalentwicklung fortgeführt werden könnten. Er erklärte die Differenz der Mindesttemperaturangaben durch möglicherweise von Gewebe zu Gewebe abweichender Mindesttemperaturen (Fasnko 2007). Abhängig von der Lagerungstemperatur hat es sich bewährt, die Hühnereier vor dem tatsächlichen Bebrütungsbeginn bei einer Raumtemperatur

von 23 °C für ca. 18 h aufzubewahren (Proudfoot 1990). Der Bruterfolg und die Entwicklung des Hühnerembryos ist dabei abhängig von der Lagerungsdauer, wobei sich eine Lagerung von über acht Tagen negativ auszuwirken scheint (Tona et al. 2003, Fassenko 2007). Für die hier beschriebenen Versuchsreihen wurden die Eier nach der Lieferung zunächst wie vom Hersteller empfohlen bei Raumtemperatur gelagert. Erst am Folgetag oder maximal am vierten Tag nach der Lieferung wurde mit der Bebrütung der Hühnereier begonnen (s. Kapitel II.2.2 „Bebrütung der Eier“).

IV.1.2.2 Versuchszeitpunkt und Versuchsprotokoll

Nach Ausprunk et al. sind die Endothelzellen der CAM bis zum elften Tag der Bebrütung noch nicht ausgereift. Bis zu diesem Zeitpunkt zeichnen sich die Gefäße der CAM durch ein schnelles Wachstum mit mitotischer Teilung der Endothelzellen aus (Ausprunk et al. 1974). Die Proliferationsaktivität der Endothelzellen der CAM nimmt zwischen dem zehnten bis zwölften Bebrütungstag deutlich ab (Kurz et al. 1995). Ab dem zwölften Bebrütungstag scheint die CAM ihr Wachstum abgeschlossen zu haben und weniger empfindlich gegenüber Fremdmaterialien zu sein (Wilting et al. 1991). Bei einer Implantation der Implantate am zehnten Bebrütungstag und intravitalmikroskopischer Untersuchung am elften Bebrütungstag ist die CAM ausreichend ausgebildet und noch im Wachstum. Somit scheint sie zu diesem Zeitpunkt empfindlicher auf pro- oder antiangiogenetische Faktoren reagieren zu können als zu einem späteren Versuchszeitpunkt. Mit Hinblick auf die angenommene Schmerzfreiheit der Embryonen bis zum 15. Bebrütungstag (Ribatti 2016), ist auch aus ethischen Gründen ein Versuchsablauf vom zehnten bis elften Bebrütungstag sinnvoll.

In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau waren nach 24 h signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen zu beobachten. Außerdem war in dieser Studie die erste und unmittelbare Phase der Integration von Interesse. Ein Beobachtungszeitraum von 48 h scheint ebenso möglich. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Präparation an der Luftblase trotz Verschluss durch Tegaderm® zum leichten Austrocknen der CAM außerhalb des Deckglases führen kann. Diese Effekte verstärken sich eventuell bei längerer Versuchszeit.

Um die tatsächliche Entwicklung, Angiogenese und Immunreaktion im Individuum vergleichen zu können, wäre eine zweizeitige Analyse der FGD und LEI jeweils im selben Hühnerei ideal. Dies ist mit dem vorgestellten Modell jedoch höchstwahrscheinlich nicht möglich, da die

„Manipulation“ durch die Intravitalmikroskopie (IVM) zu groß wäre. Hierzu gehört sowohl die mechanische Belastung als auch die Injektion und die Auswirkung der IVM mit Rhodamin 6G auf den Organismus. Bei längerer intravitalmikroskopischer Untersuchung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G kann es zu phototoxischen Effekten wie beispielsweise Vasospasmus, Erhöhung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und Reduktion der funktionellen Gefäßdichte kommen, sodass die Untersuchungszeit auf ein Minimum beschränkt werden sollte (Steinbauer et al. 2000). Neben der Empfindlichkeit der Hühnereier gegenüber mechanischem Stress durch die Handhabung, müssen auch die Änderungen der Luftfeuchtigkeit während der Untersuchung außerhalb des Brutschrankes in Betracht gezogen werden.

IV.1.3 Verwendete Metalle

Zur Etablierung des Modells wurden bewusst sehr unterschiedliche Metalle verwendet. Selbstverständlich war es nicht das Ziel dieser Arbeit, reines Nickel als zukünftiges Implantatmaterial zu etablieren. Hiergegen sprechen potentiell kanzerogene Effekte sowie das allergene Potential von Nickel (McGregor et al. 2000, Kasprzak et al. 2003). Es ging vielmehr darum, die maximale Differenzierungsbreite des Modells untersuchen zu können. Nach den ersten Versuchen zur Anwendung des Modells erfolgte anschließend eine erste Etablierung des Modells durch die vorherige Behandlung der Implantate mit CAP. Sowohl Titan als auch Nickel wurden vor der Implantation mit CAP behandelt. Auch hier ging es in der Nickel-Versuchsgruppe nicht um den möglichen medizinischen Einsatz, sondern um die Untersuchung der Wirkung von CAP unter vermutlich eher ungünstigen Bedingungen, um das Reaktionsspektrum des Modells aufzeigen zu können.

IV.1.4 Implantation der Metallchips

Es wurde bereits gezeigt, dass sich der HET zum Aufbringen von Geweben und Filterpapier eignet (Staton et al. 2009, Ribatti 2016). Bisher wurden zur Untersuchung der Wirkung von Metallen auf die CAM jedoch nur Lösungen von Metallen (Ardlin et al. 2005) und keine Implantate wie die hier untersuchten Metallchips direkt auf der CAM verwendet.

In Vorversuchen hatte sich die Fixierung der Implantate an Deckgläsern mit einem Durchmesser von 15 mm als optimal erwiesen (s. Kapitel III.1 „Vorversuche“). Durch die

Deckgläser und die konvexe Form der Metallchips legt sich die CAM innerhalb von 24 h direkt an Chip und Deckglas an, wie es in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Dadurch ist es möglich, das kapillare Gefäßnetz in unmittelbarer Nähe zum Metallchip zu untersuchen. Zudem kann zum Zeitpunkt der Untersuchung auf weitere Manipulation des Implantatlagers durch Aufbringen eines Deckglases verzichtet werden. Die Position des Metallchips wird durch das Deckglas fixiert, das Gewicht der Metallchips auf eine größere Fläche übertragen und so der mechanische Stress auf die CAM reduziert. Außerdem schützt das Deckglas die CAM in der „Region of Interest“ während der weiteren 24 h Bebrütung vor dem Austrocknen. Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch in der möglichen hypoxischen Wirkung durch die Glasabdeckung, da dieses abgedeckte Areal dem Gasaustausch nicht zur Verfügung steht. Hypoxie selbst induziert Angiogenese (Winning 2009). Durch die interne Kontrollgruppe wurde sowohl das Chipgewicht, als auch die hypoxische Wirkung des Glases berücksichtigt. Es würde sich demnach um einen systemischen Fehler handeln, der gegebenenfalls in allen Gruppen aufgetreten wäre.

Auf Grund der deutlich unterschiedlichen Färbung der verwendeten Metalle war es nicht möglich, die Metalle verblindet zu implantieren. Die Auswertung der Videoaufnahmen (s. Kapitel IV.1.6 „Auswertung“) hingegen erfolgte verblindet, da auf den Schwarz-Weiß-Aufnahmen kein Unterschied der Metalle zu erkennen war.

IV.1.5 Leukozyten-Färbung

Weitere Besonderheiten der Blutzellen des Huhns und der damit verbunden Anfärbbarkeit wurden in Kapitel IV.1.1.1 „Besonderheiten und Unterschiede der Blutzellen des Hühnerembryos im Vergleich zu Blutzellen des Säugers und mögliche Einschränkungen in Bezug auf die LEI“ diskutiert.

IV.1.6 Auswertung

Die Auswertung erfolgte verblindet und *off line* mit Hilfe des Computerprogramms CapImage (Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg) durch Videobild-Analysen.

Wie schon Kuhnle et al. beschrieben haben, ist die Bestimmung des Durchmessers des untersuchten Gefäßsegments entscheidend für die Analyse der Flussparameter. Bei der

Bestimmung des Durchmessers ergeben sich jedoch folgende Herausforderungen: nicht alle Gefäßabschnitte sind ideale Zylinder, der Durchmesser innerhalb eines Gefäßabschnittes kann variieren und es ist nur möglich den Durchmesser in einer Ebene parallel zur Oberfläche zu messen (Kuhnle et al. 1995). Grundsätzlich handelt es sich bei der IVM um eine etablierte Methode zur Analyse der LEI (Menger et al. 1993). Bei der CAM handelt es sich um eine dünne durchsichtige Membran mit einer Gefäßschicht, sodass es nur zu geringen Überlagerungsartefakten kommt. Die kapillären Gefäße der CAM liegen parallel zur Oberfläche. Somit eignet sich die CAM ideal für die IVM.

IV.2 Ergebnisse

IV.2.1 Ergebnisse der FGD

Ziel der ersten Modellanwendung war es eine möglichst maximale Reaktionsbreite zwischen Nickel als „Negativ-Kontrolle“ und Titan als „Ideal-Implantat“ zu detektieren. Wie postuliert, war die funktionelle Gefäßdichte 24 h nach der Implantation von nativen Nickelmetallchips (**Nickel nativ**) signifikant niedriger als nach Implantation von nativen Titanmetallchips (**Titan nativ**) und der **Kontrollgruppe**. Dies galt sowohl für die Areale direkt am Metallchip als auch für die Areale im ersten Blickfeld um den Metallchip (s. Abbildung 20 und Abbildung 21). Da die funktionelle Gefäßdichte ein Maß für die stattgefundenene Angiogenese bei der sich in Entwicklung befindlichen CAM ist, scheint Nickel demnach anti-angiogen zu wirken. Ebenso sind auch toxische destruierende Effekte auf bereits entwickelte Gefäße als Erklärung für die reduzierte FGD denkbar.

Die Effekte von Nickelimplantaten auf das sie umgebende Weichteilgewebe und mögliche Wirkungsmechanismen wurde bereits in anderen Modellen untersucht: So beschrieben McNamara et al. nach intramuskulärer Implantation von Nickelimplantaten bei Ratten toxische Effekte auf Zellen mit direktem Kontakt zum Implantat. Des Weiteren berichteten sie von einer gesteigerten inflammatorischen Antwort und postulierten, dass es durch die gesteigerte Sekretion von Enzymen zu erhöhter Korrosion und Toxizität kommen könnte (McNamara et al. 1981). In einer anderen Studie an Kaninchen konnten Laing et al. zeigen, dass die Intensität der Umgebungsreaktion abhängig von der Konzentration der durch Korrosion freigesetzten Metallionen ist (Laing et al. 1967). Unter anderem können

Metallionen durch Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies Apoptose induzieren (Pulido et al. 2003). Nickel-Ionen führten zu einer solchen Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies und führen in höherer Konzentration zu typischen oxidativen DNA-Schäden (Dally et al. 1997). Eine Zellorganelle, die besonders anfällig auf reaktive Sauerstoffspezies reagiert, ist das Mitochondrium. Eine Störung des Membranpotentials kann dabei zur Einleitung der Apoptose führen (Petit et al. 1996, Chen et al. 2001). Außerdem können die durch Nickelkontakt induzierten reaktiven Sauerstoffspezies NF- κ B aktivieren und so Apoptose induzieren (Pulido et al. 2003). Es scheint wahrscheinlich, dass die zum Zeitpunkt der Untersuchung im Wachstum befindlichen Endothelzellen empfindlich auf oxidativen Stress reagieren. Inwieweit diese oben beschriebenen Effekte bereits innerhalb der ersten 24 h und in dem vorliegenden Modell von entscheidender Bedeutung sind, könnte in zukünftigen Studien zum Beispiel durch Messung der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies im Blut des Hühnerembryos untersucht werden. In jedem Fall konnte nach der Implantation von Nickel (**Nickel nativ**) ein signifikanter Abfall der FGD im Vergleich zu Titan (**Titan nativ**) in diesem Modell beobachtet werden.

Der Negativeffekt durch Nickelimplantate (**Nickel nativ**) auf die FGD konnte durch die vorherige Oberflächenmodifikation von Nickel mit CAP (**Nickel-CAP**) signifikant reduziert werden (s. Abbildung 26 und Abbildung 27). Zwischen den Gruppen **Titan nativ** und **Titan-CAP** ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der FGD (s. Abbildung 30 und Abbildung 31). In dem beobachteten Zeitraum von 24 h zeigte sich demnach durch die Applikation von CAP bei Titanchips kein zusätzlicher Effekt auf die FGD.

In der hier vorgestellten Studie konnten positive Effekte durch die vorherige CAP-Behandlung für die FGD von Nickelmetallchips nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich ebenfalls zahlreiche Hinweise auf positive Effekte der CAP-Behandlung der Implantate auf das Implantatlager. In einer klinischen Studie mit insgesamt 18 Patienten (sechs pro Gruppe) konnten Canullo et al. für mit Niederdruck-Argonplasma gereinigte Titan-Implantate eine erhöhte Adhäsion der Fibroblasten nach einwöchiger Implantation zeigen (Canullo et al. 2014). In einer weiteren, ähnlichen Studie mit 15 Patienten ließ sich jedoch ein damit verbundener positiver Effekt auf das Heilungsverhalten histologisch nicht nachweisen (Canullo et al. 2016). Neben positiven Effekten der Oberflächenmodifikation mit Plasma auf das Weichteilgewebe konnten auch positive Effekte auf Osteoblasten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden: Duske et al. konnten *in vitro* eine Steigerung der Ausbreitung

humaner Osteoblasten auf Titanoberflächen nach Oberflächenbehandlung mit CAP mit dem kINPen® MED nachweisen. Die Oberflächenausbreitung der Osteoblasten wurde dabei durch CAP-Behandlung (Argonplasma mit 1 % Sauerstoffanteil) verschiedener Titanoberfläche um über 57 % signifikant gesteigert (Duske et al. 2012). In einer *in vivo* Studie am Hund konnte drei Wochen nach Implantation von mit CAP (kINPen® MED) behandelten „Titan-Heilungskammern“ eine verbesserte Osteointegration im Sinne eines gesteigerten Knochen-zu-Implantat-Kontaktes (BIC- bone-to-implant-contact) gezeigt werden (Coelho et al. 2012). Die Behandlung von Titanoberflächen mit verschiedenen Plasmen erhöht deren Oberflächenenergie und Benetzbarkeit (wettability) (Coelho et al. 2012) und führt zu einer besseren Zelladhäsion (Baier et al. 1984). Hallab et al. fanden einen linearen Zusammenhang zwischen der Oberflächenenergie und der Adhäsionskraft von Fibroblasten (Hallab et al. 2001). Insgesamt stellt die Oberflächenenergie wahrscheinlich durch Beeinflussung der Expression von adhäsionsassoziierten Molekülen einen wichtigen Faktor der Zelladhäsion und damit zur Osteointegration dar (Lai et al. 2010). Die Oberflächenenergie beeinflusst wiederum die Hydrophilie (Benetzbarkeit) der Oberfläche (Kilpadi et al. 1994). Eine Erhöhung der Hydrophilie durch Plasmabehandlung mit dem kINPen® MED konnte von Duske et al. ebenfalls nachgewiesen werden. Hierbei konnten unabhängig von der Titanoberflächenstruktur die Wasserkontaktwinkel (s. Kapitel II.1.3 „Einführung zu den Begriffen Plasma, Plasmamedizin und Plasmaquelle“) von 70-120 ° auf 0-10 ° reduziert werden (Duske et al. 2012). Chen et al. konnten diesen Effekt der Plasmabehandlung mit CAP auf den Wasserkontaktwinkel auch bei anderen Oberflächen wie Dentin nachweisen (Chen et al. 2013). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass durch die Behandlung der Implantate mit dem kINPen® MED eine Erhöhung der Oberflächenenergie und Hydrophilie der verwendeten Implantate erreicht wird. Im Fall von Nickel führte dies möglicherweise zur Abmilderung von anti-angiogenen Effekten auf des Gefäßnetz der CAM. Dies zeigte sich in einer gegenüber der unbehandelten Nickel-nativ-Gruppe signifikant erhöhten FGD bei Nickel-CAP. Ein zusätzlicher Effekt der CAP-Behandlung auf das umgebende Gewebe und Gefäßnetz bei Titanimplantaten trat in dem vorgestellten Modell nicht auf.

Das hier vorgestellte Modell scheint demnach geeignet, negative Effekte von Implantatmaterialien auf die Angiogenese innerhalb von 24 h zu detektieren. Damit stellt es ein Screeningverfahren dar, welches die Bewertung von (anti-) angiogenen Eigenschaften von neuen Implantatmaterialien ermöglicht. Die Oberflächenmodifikation durch Plasma scheint

geeignet, die Angiogenese durch angioprotektive Effekte zu fördern oder negative Effekte abzumildern.

IV.2.2 Ergebnisse der LEI

Im Vergleich der Gruppen **Nickel nativ**, **Titan nativ** und **Kontrolle** konnte für **Nickel nativ** eine signifikante Erhöhung der LEI gegenüber der **Kontrolle** nachgewiesen werden. Diese zeigte sich in einer signifikanten Erhöhung sowohl der Sticker als auch der Roller gegenüber der **Kontrolle** (s. Abbildung 24 und Abbildung 25). Da sowohl das Rollen als auch das Sticken einen wichtigen Schritt der extravasalen Migration von Immunzellen und damit einen zentralen Punkt der Immunreaktion darstellt (Ley et al. 2007), wird die signifikante lokale Erhöhung der Roller und Sticker als erhöhte inflammatorische Antwort des Organismus nach Kontakt mit dem Nickelimplantat gewertet. Dabei muss von Rezeptor-vermittelten Effekten ausgegangen werden, da sich die rheologischen Messgrößen, die ebenfalls Auswirkungen auf das Fließverhalten von Zellen im Blut haben könnten, zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheiden (s. Tabelle 3).

Diese signifikant erhöhte lokale Rezeptor-vermittelte inflammatorische Reaktion ist vereinbar mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Ninomiya (2013): Diese konnten nach Kontakt mit gelösten Co^{2+} und Cr^{3+} Ionen eine Aktivierung der Endothelzellen (Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC)) sowie ein erhöhtes Adhärenzverhalten von Lymphozyten *in vitro* nachweisen. Hierbei kam es bei Co^{2+} bereits 6 h nach Zugabe der Lösung zu einer erhöhten Sekretion der Chemokine Interleukin 8 (IL-8) und Monozyten chemotaktisches Protein 1 (MCP1) sowie dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Ninomiya et al. 2013). Bei *in vitro* Studien mit Nickel (Ni(II), 500 μM) führte der Kontakt damit zu einer erhöhten Freisetzung von IL-8 durch humane neutrophile Granulozyten (Freitas et al. 2010). Für THP-1-Zellen konnte bereits nach einstündigem Kontakt mit 200 μM NiCl_2 eine Erhöhung der IL-8 Gene als auch ein zeitlich verzögerter Anstieg von IL-8-Protein nach 12 h Exposition gezeigt werden (Lin et al. 2016). IL-8, das u.a. durch Endothelzellen der postkapillaren Venolen sezerniert werden kann, spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung, der lokalen Akkumulation und Emigration von Neutrophilen und ist damit ein bedeutender Faktor der lokalen Inflammationsreaktion (Baggiolini et al. 1989, Huber et al. 1991, Baggiolini et al. 1992).

Zu weiteren generellen Erläuterungen der LEI siehe II.2.11.2 „Einführung Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)“.

Auch *in vivo* finden sich erhöhte LEI-Werte als Reaktion auf Mikropartikel: Zysk et al. konnten nach intraartikulärer Injektion von Polystyrol-Partikel in das Kniegelenk von Mäusen unabhängig von der Partikelgröße eine erhöhte LEI im Synovialgewebe nachweisen (Zysk et al. 2003, Zysk et al. 2005).

Das vorgestellte Modell scheint geeignet, eine erhöhte lokale Rezeptor-vermittelte inflammatorische Antwort auf 24 h langen Kontakt mit Nickelimplantaten in einem 3-Kompartimentenmodell zu detektieren. Wie weiter oben erläutert, lässt das Modell bisher jedoch keine Rückschlüsse auf die Art und Herkunft der aktivierten Zellen zu (siehe Kapitel IV.1.1.1 „Besonderheiten und Unterschiede der Blutzellen des Hühnerembryos im Vergleich zu Blutzellen des Säugers und mögliche Einschränkungen in Bezug auf die LEI“).

Die Oberflächenmodifikation mit CAP führte in den Gruppen **Nickel-CAP** und **Titan-CAP** zu keiner signifikanten Erhöhung der Roller oder Sticker im Vergleich zu **Nickel nativ** bzw. **Titan nativ** (s. Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 32 und Abbildung 33). Die Behandlungsdauer orientierte sich an Versuchen von Duske et al. (Duske et al. 2012), wobei anders als bei Duske et al. hier 99,9 % Argongas verwendet wurde. Der Anteil an Sauerstoff im Trägergas oder die Luftfeuchtigkeit beeinflussen zum Beispiel die Menge an freigesetztem Stickstoffmonoxid (Pipa et al. 2012). Es ist demnach denkbar, dass durch veränderte Zusammensetzung des Trägergases, beispielsweise durch Veränderung des Sauerstoffanteils, andere Effekte der Plasmabehandlung auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion detektierbar wären. Reaktive Spezies (RS) entstehen bei CAP-Applikation auch ohne Zugabe von Sauerstoff zum Trägergas an der Grenzfläche zwischen Plasma und umgebener Luft (Graves 2012).

Lehmann et. al konnten eine erhöhte LEI nach Plasmaapplikation auf die CAM detektieren, was als Rezeptor-vermittelte immunologische Antwort gewertet wurde (Lehmann et al. 2013). Es bleibt jedoch unklar inwieweit dieser Effekt bei indirekter Anwendung von CAP durch die Oberflächenmodifikation von Implantaten, wie in der hier vorgestellten Arbeit, bei zu beachtender kurzer Halbwertszeit der RS und Interaktion dieser mit der Metalloberfläche zur Geltung kommen kann.

Wie in Kapitel II.1.3.2.2 „Plasma zur Oberflächenmodifikation im medizinischen Bereich“ bereits ausgeführt, wird die Oberflächenenergie von Titanimplantaten mittels Oberflächenmodifikation mit CAP erhöht und der WKW reduziert. Milleret et al. untersuchten die Thrombusbildung an Titanoberflächen sowie die Aktivierung des Komplementsystems bei Kontakt mit humanem Blut. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass Titanoberflächen mit einer nach Oberflächenmodifikation mittels Alkalibehandlung niedrigeren WKW eine deutlich organisierte Thrombusbildung mit einer signifikant höheren Anzahl kernhaltiger Zellen aufwiesen (Milleret et al. 2011). Die Aktivierung des Komplement-/Gerinnungssystems und die darauffolgende Rekrutierung von Makrophagen etc. spielt eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung und ist damit ein vielversprechender Ansatz zur Förderung der Osteointegration (Stanford 2010).

IV.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem vorgestellten 3-Kompartimenten-Modell ist es möglich, die Effekte von Implantaten bzw. deren Oberflächeneigenschaften auf die Funktionelle Gefäßdicke (FGD) und die Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) innerhalb der ersten 24 h nach Implantation zu detektieren. Damit lassen sich möglicherweise Aussagen über Materialeigenschaften bezüglich der Biokompatibilität von Implantaten treffen.

Für Nickel wurde, wie anfangs postuliert, ein negativer Effekt auf das umgebende Kapillarnetz und die Mikrozirkulation nachgewiesen. Der Kontakt mit Nickel führte außerdem zur Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer erhöhten Aktivierung immunkompetenter Zellen und deren Migration. Für Titan zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die FGD und LEI.

Durch die vorherige Behandlung der Nickelimplantate mit kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) konnte der Negativeffekt auf die FGD signifikant reduziert werden. Für Titanimplantate konnte bezogen auf die FGD kein zusätzlicher Effekt durch die CAP-Anwendung nachgewiesen werden. Bei Nickel- und Titanimplantaten führte die CAP-Oberflächenmodifikation zu keiner signifikanten Erhöhung der LEI.

Die Oberflächenbehandlung mit CAP scheint demnach als eine mögliche therapeutische Anwendung eine vielversprechende integrationsfördernde Option in der initialen Phase zu sein. Es sind derzeit sehr viele verschiedene Plasmaquellen (Corona-Entladung, dielektrisch behinderte Entladung, Plasmajet, diverse Niederdruckplasmageneratoren, etc.) zur Oberflächenmodifikation verfügbar. Verschiedene Ablationsverfahren in Bezug auf Dauer und Zusammensetzung der Oberflächenbehandlung mit Plasma müssten auf ihre Eigenschaften und Wirkungen auf zellulärer und klinischer Ebene untersucht werden. Es ergibt sich ein weites und ebenso spannendes Feld der Materialbehandlung, welches sich seit der Einführung von Plasmaapplikationsformen unter Atmosphärendruck und gewebeverträglichen Temperaturen um das mögliche Anwendungsgebiet direkt am Patienten erweitert hat.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Oberflächenmodifikation mit CAP untersucht. Grundsätzlich sollten auch andere Oberflächenmodifikationen mit dem vorgestellten Modell analysiert werden können. Weitere zu untersuchende Aspekte könnten beispielsweise auch die Therapie von Biofilmen auf Implantatmaterialien einbeziehen.

Das vorgestellte Modell scheint sich als Screeningmodell zu eignen, um quantitative und qualitative Aussagen über die Effekte von Implantatmaterialien und deren Oberflächenmodifikationen auf die Mikrozirkulation und LEI zu liefern. Vermutlich ungeeignete Implantate mit antiangiogenen bzw. inflammatorischen Effekten ließen sich bereits vor dem Einsatz in Tierversuchen schnell und kostengünstig detektieren. Im Sinne der 3R könnten somit Tierversuche reduziert werden.

V Zusammenfassung

Die initiale Integration von Implantaten ist von hoher Bedeutung für die spätere Stabilität und Standzeit von beispielsweise Endoprothesen im Körper. Mit Hinblick auf die steigende Zahl von Patienten, die ein Implantat benötigen, ist es von großer Bedeutung unterschiedliche Implantatmaterialien und Oberflächenmodifizierungen bezüglich ihrer Eigenschaften und Interaktionen mit dem Implantatlager zu untersuchen, um diese verbessern zu können.

Ziel der vorgestellten Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines Screeningmodells zur Analyse der Auswirkung von verschiedenen Metallimplantaten auf die Mikrozirkulation in unmittelbarer Nähe des Implantats.

Dazu wurde ein neues *in vivo* Modell an der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos entwickelt, angewendet und etabliert. Dieses stellt eine Modifikation des seit Jahrzehnten etablierten HET-CAM (Hühnereitest an der Chorioallantoismembran) dar und ermöglicht quantitative und qualitative intravitalmikroskopische Aussagen über die Funktionelle Gefäßdichte (FGD) und die Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI).

Zunächst wurden im Zuge der Modellanwendung Nickel- und Titan-Implantate verglichen, um die mögliche Reaktionsbreite des Modells zu untersuchen. Es folgte eine Etablierung des Modells, indem die Oberfläche der Implantate kurz vor der Applikation mit kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) behandelt wurde. Die intravitalmikroskopische Untersuchung erfolgte jeweils 24 h nach Applikation.

Die Chorioallantoismembran der mit Nickel-Implantaten behandelten Hühnerembryonen zeigte im Vergleich zur Titan- und der internen Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der FGD sowie eine signifikante Erhöhung der LEI gegenüber der Kontrollgruppe. Durch Vorbehandlung der Nickel-Implantate mit CAP konnte der Negativeffekt auf das Gefäßsystem signifikant reduziert werden. Für Titanimplantate konnte mit Hinblick auf die FGD kein zusätzlicher Effekt nach der Behandlung mit CAP detektiert werden.

Die vorgestellte Arbeit zeigt, dass sich das neue Modell als Screeningmodell dazu eignet, neue Implantatmaterialien und Oberflächenmodifikationen an der Schwelle zwischen *in vitro* Zellkultur und *in vivo* Tiermodellen zu untersuchen. Somit könnte es dabei helfen, Tierversuche gezielter einzusetzen. Vorteile und Einschränkungen des Modells werden diskutiert.

VI Literaturverzeichnis

Ardlin, B. I., J. E. Dahl and J. E. Tibballs (2005). "Static immersion and irritation tests of dental metal-ceramic alloys." Eur J Oral Sci **113**(1): 83-89.

Aronsson, B. O., J. Lausmaa and B. Kasemo (1997). "Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials." J Biomed Mater Res **35**(1): 49-73.

Auerbach, R., W. Auerbach and I. Polakowski (1991). "Assays for angiogenesis: A review." Pharmacology & Therapeutics **51**(1): 1-11.

Ausprunk, D. H., D. R. Knighton and J. Folkman (1974). "Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study." Dev Biol **38**(2): 237-248.

Awad, N. K., S. L. Edwards and Y. S. Morsi (2017). "A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants." Materials Science and Engineering: C **76**: 1401-1412.

Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.

Baggiolini, M., A. Walz and S. L. Kunkel (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." J Clin Invest **84**(4): 1045-1049.

Baier, R. E., A. E. Meyer, J. R. Natiella, R. R. Natiella and J. M. Carter (1984). "Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results." Journal of Biomedical Materials Research **18**(4): 337-355.

Bekeschus, S., A. Schmidt, K.-D. Weltmann and T. von Woedtke (2016). "The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing." Clinical Plasma Medicine **4**(1): 19-28.

Bellairs, R. and O. Mark (2014). Extra-Embryonic Membranes. Atlas of Chick Development, Amsterdam, Boston: Academic Press: 128-129.

Bender, C., R. Matthes, E. Kindel, A. Kramer, J. Lademann, K.-D. Weltmann, W. Eisenbeiß and N.-O. Hübner (2010). "The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM." Plasma Processes and Polymers **7**(3-4): 318-326.

Bender, C., L. I. Partecke, E. Kindel, F. Doring, J. Lademann, C. D. Heidecke, A. Kramer and N. O. Hubner (2011). "The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma." Toxicol In Vitro **25**(2): 530-537.

Bender, C. P. (2012). „Untersuchungen zur Reiz- und Inflammationswirkung von atmosphärischem Niedertemperaturplasma auf die Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereis [Dissertation].“ Greifswald: Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Bochner, F., L. Fellus-Alyagor, V. Kalchenko, S. Shinar and M. Neeman (2015). "A Novel Intravital Imaging Window for Longitudinal Microscopy of the Mouse Ovary." Sci Rep **5**: Article ID 12446, 7 pages.

Butcher, E. C. (1993). "Specificity of leukocyte-endothelial interactions and diapedesis: physiologic and therapeutic implications of an active decision process." Res Immunol **144**(9): 695-698.

Canullo, L., J. F. Dehner, D. Penarrocha, V. Checchi, A. Mazzoni and L. Breschi (2016). "Soft Tissue Response to Titanium Abutments with Different Surface Treatment: Preliminary Histologic Report of a Randomized Controlled Trial." Biomed Res Int **2016**: Article ID 2952530, 7 pages.

Canullo, L., D. Peñarrocha-Oltra, S. Marchionni, L. Bagán, M. A. Peñarrocha-Diago, M. A. Peñarrocha-Diago and C. Micarelli (2014) "Soft tissue cell adhesion to titanium abutments after different cleaning procedures: preliminary results of a randomized clinical trial." Medicina oral, patología oral y cirugía bucal **19** (2), e177-183

Chen, F., V. Vallyathan, V. Castranova and X. Shi (2001). "Cell apoptosis induced by carcinogenic metals." Molecular and Cellular Biochemistry **222**(1): 183-188.

Chen, M., Y. Zhang, M. Sky Driver, A. N. Caruso, Q. Yu and Y. Wang (2013). "Surface modification of several dental substrates by non-thermal, atmospheric plasma brush." Dent Mater **29**(8): 871-880.

Cheng, K., B. Naccarato, K. W. Kim and A. Kumar (2016). "Theoretical consideration of contact angle hysteresis using surface-energy-minimization methods." International Journal of Heat and Mass Transfer **102**: 154-161.

Cimpean, A. M., D. Ribatti and M. Raica (2008). "The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis." Angiogenesis **11**(4): 311-319.

Close, B., K. Banister, V. Baumans, E.-M. Bernoth, N. Bromage, W. Erhardt, P. Flecknell, N. Gregory, H. Hackbarth, D. Morton and C. Warwick (1997). "Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2." Laboratory Animals, SAGE Publications. **31**: 1-32.

Coelho, P. G., G. Giro, H. S. Teixeira, C. Marin, L. Witek, V. P. Thompson, N. Tovar and N. R. Silva (2012). "Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces." J Biomed Mater Res A **100**(7): 1901-1906.

Cokelet, G. R. (1974). "Experimental determination of the average hematocrit of blood flowing in a vessel." Microvasc Res **7**(3): 382-384.

Cools, P., N. De Geyter, E. Vanderleyden, P. Dubruel and R. Morent (2014). "Surface Analysis of Titanium Cleaning and Activation Processes: Non-thermal Plasma Versus Other Techniques." Plasma Chemistry and Plasma Processing **34**(4): 917-932.

Daeschlein, G., M. Napp, S. v. Podewils, S. Lutze, S. Emmert, A. Lange, I. Klare, H. Haase, D. Gumbel, T. v. Woedtke and M. Jünger (2014). "In Vitro Susceptibility of Multidrug Resistant Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD)." Plasma Processes and Polymers **11**(2): 175-183.

Dally, H. and A. Hartwig (1997). "Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells." Carcinogenesis **18**(5): 1021-1026.

Davison, F. (2014). "The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features". K.A. Schat, B. Kaspars, P. Kaiser. Avian Immunology (Second Edition). Boston: Academic Press: 1-9.

Dawson, A. B. (1936). "Some observations on the primitive and definitive erythrocytes of the developing chick." Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie **24**(2): 256-268.

Djonov, V. G., A. B. Galli and P. H. Burri (2000). "Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane." Anatomy and Embryology **202**(5): 347-357.

Dorand, R. D., D. S. Barkauskas, T. A. Evans, A. Petrosiute and A. Y. Huang (2014). "Comparison of intravital thinned skull and cranial window approaches to study CNS immunobiology in the mouse cortex." Intravital **3**(2).

Draize, J. H., G. Woodard and H. O. Calvery (1944). "Methods for the Studys of irritation and toxicity of substancec applied topically to the skin and mucous membrane." J Pharmacol Exp Ther **82**: 377-390.

Dunn, O. J. (1964). "Multiple Comparisons Using Rank Sums." Technometrics **6**(3): 241-252.

Durupt, F., D. Koppers-Lalic, B. Balme, L. Budel, O. Terrier, B. Lina, L. Thomas, R. C. Hoeben and M. Rosa-Calatrava (2012). "The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses." Cancer Gene Ther **19**(1): 58-68.

Duske, K., L. Jablonowski, I. Koban, R. Matthes, B. Holtfreter, A. Sckell, J. B. Nebe, T. von Woedtke, K. D. Weltmann and T. Kocher (2015). "Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs." Biomaterials **52**: 327-334.

Duske, K., I. Koban, E. Kindel, K. Schroder, B. Nebe, B. Holtfreter, L. Jablonowski, K. D. Weltmann and T. Kocher (2012). "Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals." J Clin Periodontol **39**(4): 400-407.

Edwards, C. L. (1902). "The physiological zero and the index of developement for the egg of the domestic fowl (gallus domesticus)- a contribution to the subject of the influence of temperature on growth." Am. J. Physiol. **6**(6): 351-397.

Emmert, S., F. Brehmer, H. Hänßle, A. Helmke, N. Mertens, R. Ahmed, D. Simon, D. Wandke, W. Maus-Friedrichs, G. Däschlein, M. P. Schön and W. Viöl (2013). "Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more." Clinical Plasma Medicine **1**(1): 24-29.

Fasenko, G. M. (2007). "Egg storage and the embryo." Poult Sci **86**(5): 1020-1024.

Favia, P. and R. d'Agostino (1998). "Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications." Surface and Coatings Technology **98**(1): 1102-1106.

Fellah, J. S., T. Jaffredo, N. Nagy and D. Dunon (2014). "Development of the Avian Immune System" K.A. Schat, B. Kaspars, P. Kaiser. Avian Immunology (Second Edition). Boston: Academic Press: 45-63.

Fluhr, J. W., S. Sassning, O. Lademann, M. E. Darvin, S. Schanzer, A. Kramer, H. Richter, W. Sterry and J. Lademann (2012). "In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum." Exp Dermatol **21**(2): 130-134.

Freitas, M., A. Gomes, G. Porto and E. Fernandes (2010). "Nickel induces oxidative burst, NF- κ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils." JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry **15**(8): 1275-1283.

Fricke, K., I. Koban, H. Tresp, L. Jablonowski, K. Schröder, A. Kramer, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke and T. Kocher (2012). "Atmospheric Pressure Plasma: A High-Performance Tool for the Efficient Removal of Biofilms." PLOS ONE **7**(8): e42539, 1-8.

Funk, E. M. and H. V. Biellier (1944). "The Minimum Temperature for Embryonic Development in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*)1." Poultry Science **23**(6): 538-540.

Gerling a), T. and K.-D. Weltmann (2016). "Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen- Biomedizinische Anwendungsfelder." H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 5-6.

Gerling b), T. and K.-D. Weltmann (2016). "Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen-Herausforderungen und Lösungen." H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 9-10.

Goodpasture, E. W., A. M. Woodruff and G. J. Buddingh (1931). "The Cultivation of Vaccine and Other Viruses in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos." Science **74**(1919): 371-372.

Guastaldi, F. P., D. Yoo, C. Marin, R. Jimbo, N. Tovar, D. Zanetta-Barbosa and P. G. Coelho (2013). "Plasma treatment maintains surface energy of the implant surface and enhances osseointegration." Int J Biomater **2013**: Article ID 354125, 6 pages.

Hallab, N. J., K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses and J. J. Jacobs (2001). "Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion." Tissue Eng **7**(1): 55-71.

Hamal, K. R., S. C. Burgess, I. Y. Pevzner and G. F. Erf (2006). "Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens." Poult Sci **85**(8): 1364-1372.

Harvey, W., R. Töply and R. Colombo (1910). Die Bewegung des Herzens und des Blutes (orig. 1628). Leipzig, J.A. Barth.

Heine, F. (1936). "Phagozytoseversuche am Hühnerembryo." Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen **134**(2): 283-293.

Huber, A., S. Kunkel, R. Todd and S. Weiss (1991). "Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8." Science **254**(5028): 99-102.

Ingham, E. and J. Fisher (2005). "The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement." Biomaterials **26**(11): 1271-1286.

Jablonowski, L., K. Fricke, R. Matthes, B. Holtfreter, R. Schlüter, T. Woedtke, K. D. Weltmann and T. Kocher (2017). "Removal of naturally grown human biofilm with an atmospheric pressure plasma jet: An in-vitro study." Journal of Biophotonics **10**(5): 718-726.

Jankovic, B. D., K. Isakovic, M. L. Lukic, N. L. Vujanovic, S. Petrovic and B. M. Markovic (1975). "Immunological capacity of the chicken embryo. - Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo." Immunology **29**(3): 497-508.

Jones, B. (1870). "His earlier Scientific education." The Life and Letters of Faraday, Philadelphia: J.B. Lippincott and Co **1**: 216-217.

Kalghatgi, S., G. Friedman, A. Fridman and A. M. Clyne (2010). "Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release." Ann Biomed Eng **38**(3): 748-757.

Kalweit, S., R. Besoke, I. Gerner and H. Spielmann (1990). "A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test." Toxicol In Vitro **4**(4-5): 702-706.

Kampfrath, T., J. A. Deiuliis, S. D. Moffatt-Bruce, J. Anderson, Q. Sun, K. Wood, M. C. Ostrowski and S. Rajagopalan (2009). "A mouse model of yellow fluorescent protein (YFP) expression in hematopoietic cells to assess leukocyte-endothelial interactions in the microcirculation." Microvasc Res **78**(3): 294-300.

Kärrholm, J., M. Mohaddes, D. Odin, J. Vinblad, C. Rogmark and O. Rolfson (2018). "Swedish Hip Arthroplasty Register" Ola Rolfson. Annual Report 2017: 108.

Kasprzak, K. S., F. W. Sunderman, Jr. and K. Salnikow (2003). "Nickel carcinogenesis." Mutat Res **533**(1-2): 67-97.

Kedrin, D., B. Gligorijevic, J. Wyckoff, V. V. Verkhusha, J. Condeelis, J. E. Segall and J. van Rheenen (2008). "Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window." Nat Methods **5**(12): 1019-1021.

Kemper, F. H. and N. P. Luepke (1986). "Toxicity testing by the Hen's Egg Test (HET)." Fd Chem. Toxic. **24**(6/7): 647-648.

Kilpadi, D. V. and J. E. Lemons (1994). "Surface energy characterization of unalloyed titanium implants." J Biomed Mater Res **28**(12): 1419-1425.

Kluge, S. (2015). „Genotoxizitätsuntersuchung von atmosphärischem Niedertemperaturplasma anhand des Micronucleustests am angebrüteten Hühnerei [Dissertation]“, Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität.

Kluge, S., S. Bekeschus, C. Bender, H. Benkhail, A. Sckell, H. Below, M. B. Stope and A. Kramer (2016). "Investigating the Mutagenicity of a Cold Argon-Plasma Jet in an HET-MN Model." PLoS One **11**(9): e0160667, 15 pages.

Kramer, A., N. Hübner, O. Assadian, H. Below, C. Bender, H. Benkhail, B. Bröker, A. Ekkernkamp, W. Eisenbeiß, A. Hammann, B. Hartmann, C. Heidecke, P. Hinz, I. Koban, S. Koch, T. Kocher, J. Lademann, O. Lademann, M. Lerch, S. Maier, R. Matthes, G. Müller, I. Partecke, C. Rändler, K. Weltmann and M. Zygmunt (2009). "Chancen und Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasmas, TTP)." GMS *Krankenhaushyg Interdiszip.* **4(2)**: Doc10

Kramer, A., J. Lademann, C. Bender, A. Sckell, B. Hartmann, S. Münch, P. Hinz, A. Ekkernkamp, R. Matthes, I. Koban, I. Partecke, C. D. Heidecke, K. Masur, S. Reuter, K. D. Weltmann, S. Koch and O. Assadian (2013). "Suitability of tissue tolerable plasmas (TTP) for the management of chronic wounds." *Clinical Plasma Medicine* **1(1)**: 11-18.

Kramer, A., R. Matthes, S. Bekeschus, C. Bender, M. Napp, O. Lademann, J. Lademann and K. D. Weltmann (2016). "Aktueller und perspektivischer Einsatz kalter Plasmen aus hygienischer Indikation." H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. *Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 139-149.

Kruskal, W. H. and W. A. Wallis (1952). "Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis." *Journal of the American Statistical Association* **47(260)**: 583-621.

Kühnel, W. (1961). "Morphologische und experimentelle Untersuchungen an der Allantois des Hühnchens." *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **54(6)**: 807-830.

Kuhnle, G. E., W. M. Kuebler, J. Groh and A. E. Goetz (1995). "Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels." *Am J Respir Crit Care Med* **152(4)**: 1221-1228.

Kurz, H., S. Ambrosy, J. Wilting, D. Marme and B. Christ (1995). "Proliferation pattern of capillary endothelial cells in chorioallantoic membrane development indicates local growth control, which is counteracted by vascular endothelial growth factor application." *Dev Dyn* **203(2)**: 174-186.

Lackmann, J. W., S. Schneider, E. Edengeiser, F. Jarzina, S. Brinckmann, E. Steinborn, M. Havenith, J. Benedikt and J. E. Bandow (2013). "Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically." *J R Soc Interface* **10(89)**: 20130591, 12 pages.

Lai, H. C., L. F. Zhuang, X. Liu, M. Wieland, Z. Y. Zhang and Z. Y. Zhang (2010). "The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates." *J Biomed Mater Res A* **93(1)**: 289-296.

Laing, P. G., A. B. Ferguson and E. S. Hodge (1967). "Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants." Journal of Biomedical Materials Research **1**(1): 135-149.

Lang, N. P., G. E. Salvi, G. Huynh-Ba, S. Ivanovski, N. Donos and D. D. Bosshardt (2011). "Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans." Clin Oral Implants Res **22**(4): 349-356.

Langmuir, I. (1928). "Oscillations in Ionized Gases." Proc Natl Acad Sci U S A **14**(8): 627-637.

Laroussi, M. (2005). "Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art." Plasma Processes and Polymers **2**(5): 391-400.

Lehmann, I., C. Bender, D. Pavlovic, A. Wegner, P. Hinz, K. A. A. Ekkernkamp and A. Sckell (2013). "Gewebeverträgliches Niedertemperaturplasma führt zu einer lokalen Erhöhung der Leukozyten-Endothel-Interaktion – eine experimentelle Studie mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie" Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2013) Berlin: German Medical Science GMS Publishing House: DocGR18-1035.

Lehr, H. A., M. Leunig, M. D. Menger, D. Nolte and K. Messmer (1993). "Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice." Am J Pathol **143**(4): 1055-1062.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Lim, L. H., B. S. Bochner and E. M. Wagner (2002). "Leukocyte recruitment in the airways: an intravital microscopic study of rat tracheal microcirculation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L959-967.

Lin, C. H., C. A. Chung, J. H. Wong, B. K. Chen, S. J. Chiu, S. Klahan, Y. C. Lee and W. C. Chang (2016). "Involvement of L-type Ca²⁺ channel and toll-like receptor-4 in nickel-induced interleukin-8 gene expression." Environmental Toxicology **31**(1): 5-12.

Liu, X., P. Chu and C. Ding (2004). "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications." Materials Science and Engineering: R: Reports **47**(3-4): 49-121.

Long, M. and H. J. Rack (1998). "Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective." Biomaterials **19**(18): 1621-1639.

Lucas a), A. M. and C. Jamroz (1961). "Circulating blood of the embryo. " . A. M. Lucas and C. Jamroz. Atlas of avian hematology. Washington: U.S. Dept. of Agriculture: 104-140.

Lucas b), A. M. and C. Jamroz (1961). "Blood cells from hematopoietic organs of the embryo. "A. M. Lucas and C. Jamroz . Atlas of avian hematology. Washington: U.S. Dept. of Agriculture: 141-180.

Luepke, N.-P. (1992). Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerei. Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen. H. Schöffl, R. Schulte-Hermann and H. A. Tritthart. Vienna, Springer Vienna: 37-49.

Luepke, N. P. (1985). "Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential." Food Chem Toxicol **23**(2): 287-291.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). "12.1.3 Leukozyten. " R. Lüllmann-Rauch. Histologie (3. Ausgabe). Stuttgart: Georg Thieme Verlag: 271-277.

M. Moisan , J. B., S. Moreau , J. Pelletier , M. Tabrizian , and L. H. Yahia (2001). "Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms." International Journal of Pharmaceutics **226**: 1-21.

Malpighi, M. (1663). "De pulmonibus observationibus anatomicæ. " De pulmonum substantia & Motu diatribæ. T. Bartholin. Kopenhagen (Hafniæ): Matthias Godiche: 43-102.

Mann, H. B. W., Donald R (1947). "On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other." Annals of Mathematical Statistics **18**(1): 50-60.

Masedunskas, A., O. Milberg, N. Porat-Shliom, M. Sramkova, T. Wigand, P. Amornphimoltham and R. Weigert (2012). "Intravital microscopy: a practical guide on imaging intracellular structures in live animals." Bioarchitecture **2**(5): 143-157.

Mast, J. and B. M. Goddeeris (1999). "Development of immunocompetence of broiler chickens." Veterinary Immunology and Immunopathology **70**(3–4): 245-256.

Matthes, R., O. Assadian and A. Kramer (2014). "Repeated applications of cold atmospheric pressure plasma does not induce resistance in *Staphylococcus aureus* embedded in biofilms." GMS Hyg Infect Control **9**(3): Doc17, 5 pages.

McGregor, D. B., R. A. Baan, C. Partensky, J. M. Rice and J. D. Wilbourn (2000). "Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies - a report of an IARC Monographs Programme Meeting. International Agency for Research on Cancer." Eur J Cancer **36**(3): 307-313.

McNamara, A. and D. F. Williams (1981). "The response to the intramuscular implantation of pure metals." Biomaterials **2**(1): 33-40.

McNamara, A. and D. F. Williams (1982). "Scanning electron microscopy of the metal-tissue interface. II. Observations with lead, copper, nickel, aluminium, and cobalt." Biomaterials **3**(3): 165-176.

Menger, M. D. and H. A. Lehr (1993). "Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo." Immunol Today **14**(11): 519-522.

Metelmann, H.-R., D. S. Nedrelov, C. Seebauer, M. Schuster, T. von Woedtke, K.-D. Weltmann, S. Kindler, P. H. Metelmann, S. E. Finkelstein, D. D. Von Hoff and F. Podmelle (2015). "Head and neck cancer treatment and physical plasma." Clinical Plasma Medicine **3**(1): 17-23.

Miller, F. N., J. G. Collins and P. A. Feldhoff (1989). "Non-invasive intravital fluorescent microscopy of the hamster gingiva." J Periodontal Res **24**(4): 261-266.

Milleret, V., S. Tugulu, F. Schlottig and H. Hall (2011). "Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clot formation." Eur Cell Mater **21**: 430-444; discussion 444.

Monetta, T., A. Scala, C. Malmo and F. Bellucci (2011). "Antibacterial Activity of Cold Plasma-Treated Titanium Alloy." Plasma Medicine **1**(3-4): 205-214.

Mulisch, M. and B. Nixdorf-Bergweiler (2015). "Fluoreszenzfärbungen." M. Mulisch and U. Welsch. Romeis - Mikroskopische Technik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: 283-298.

Nebe, B., B. Finke, R. Hippler, J. Meichsner, A. Podbielski, M. Schlosser and R. Bader (2013). "Physical plasma processes for surface functionalization of implants in orthopedic surgery." Hyg Med **38**(5): 192–197.

Ninomiya, J. T., S. A. Kuzma, T. J. Schnettler, J. G. Krolikowski, J. A. Struve and D. Weihrauch (2013). "Metal ions activate vascular endothelial cells and increase lymphocyte chemotaxis and binding." J Orthop Res **31**(9): 1484-1491.

Oláh, I., N. Nagy and L. Vervelde (2014). "Structure of the Avian Lymphoid System K.A. Schat, B. Kaspars, P. Kaiser. Avian Immunology (Second Edition). B. Kaspars and P. Kaiser. Boston, Academic Press: 11-44.

Packard, M. J. (1994). "Mobilization of shell calcium by the chick chorioallantoic membrane in vitro." J Exp Biol **190**: 141-153.

Papenfuss, H. D., J. F. Gross, M. Intaglietta and F. A. Treese (1979). "A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold." Microvasc Res **18**(3): 311-318.

Partecke, L. I., K. Evert, J. Haugk, F. Doering, L. Normann, S. Diedrich, F. U. Weiss, M. Evert, N. O. Huebner, C. Guenther, C. D. Heidecke, A. Kramer, R. Bussiahn, K. D. Weltmann, O. Pati, C. Bender and W. von Bernstorff (2012). "Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*." BMC Cancer **12**: 473.

Partecke, L. I., Liedtke, Kim R. (2016). "Kaltes Atmosphärendruckplasma im Einsatz in der Chirurgie - Einsatzmöglichkeiten in der Tumorchirurgie." H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: 93.

Petit, P. X., S.-A. Susin, N. Zamzami, B. Mignotte and G. Kroemer (1996). "Mitochondria and programmed cell death: back to the future." FEBS Letters **396**(1): 7-13.

Piel, A. (2010). "Introduction." A. Piel. Plasma Physics - An Introduction to Laboratory, Space, and Fusion Plasmas. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media: 1-25.

Pipa, A. V., S. Reuter, R. Foest and K. D. Weltmann (2012). "Controlling the NO production of an atmospheric pressure plasma jet." Journal of Physics D: Applied Physics **45**(8): 085201, 7 pages.

Poole, K. (2012). "Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance." J Antimicrob Chemother **67**(9): 2069-2089.

Proudfoot, F. G., Hamilton, R. M. G (1990). Care of hatching eggs before incubation. Agricultural Canada Publication. A. C. 1573/E. Canada, Ottawa.

Pulido, M. D. and A. R. Parrish (2003). "Metal-induced apoptosis: mechanisms." Mutat Res **533**(1-2): 227-241.

Rahn, H., C. V. Paganelli and A. Ar (1974). "The avian egg: air-cell gas tension, metabolism and incubation time." Respir Physiol **22**(3): 297-309.

Reuter, S., K. Masur, T. Von Woedtke and K. D. Weltmann (2014). "Kalte Plasmen in der Medizin." Physik Journal **13 (10)**: 39-44.

Ribatti, D. (2010). "Introduction. " D. Ribatti. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis : The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis., Heidelberg, London, New York: Springer Science+Business Media B.V.: IX-X.

Ribatti, D. (2014). "The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology." Experimental Cell Research **328**(2): 314-324.

Ribatti, D. (2016). "The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay." Reprod Toxicol. 5 pages.

Robert, P., D. Touchard, P. Bongrand and A. Pierres (2013). "Biophysical description of multiple events contributing blood leukocyte arrest on endothelium." Front Immunol **4**: 108, 9 pages.

Romanoff, A. L. (1952). "Membrane growth and function." Ann N Y Acad Sci **55**(2): 288-301.

Rous, P., Murphy, J.B. (1911). "Tumor implantations in the developing embryo." Journal of the American Medical Association **LVI**(10): 741-742.

Russell, W. M. S. and R. L. Burch (1959). "The Sources, Incidence, and Removal of Inhumanity-The Removal of Inhumanity: The Three R's." The principles of humane experimental technique. London, Methuen: **Johns Hopkins University** <http://altweb.jhsph.edu>

(Thematische Recherche: Publications - Books- The Principles of Humane Experimental-Chapter 4) Abrufdatum: 20.05.2017.

Sargeant, A. and T. Goswami (2006). "Hip implants: Paper V. Physiological effects." Materials & Design **27**(4): 287-307.

Scheel, J., M. Kleber, J. Kreutz, E. Lehringer, A. Mehling, K. Reisinger and W. Steiling (2011). "Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals (GHS)." Regul Toxicol Pharmacol **59**(3): 471-492.

Schmidt, A., T. V. Woedtke, J. Stenzel, T. Lindner, S. Polei, B. Vollmar and S. Bekeschus (2017). "One Year Follow-Up Risk Assessment in SKH-1 Mice and Wounds Treated with an Argon Plasma Jet." Int J Mol Sci **18**(4):18 pages.

Schönebeck, R. (2016). "kINPen MED". Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 214-216.

Schwarz, F., M. Wieland, Z. Schwartz, G. Zhao, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, A. Schedle, N. Broggin, M. M. Bornstein, D. Buser, S. J. Ferguson, J. Becker, B. D. Boyan and D. L. Cochran (2009). "Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **88**(2): 544-557.

Sckell, A. and F. M. Klenke (2009). "The cranial bone window model: studying angiogenesis of primary and secondary bone tumors by intravital microscopy." Methods Mol Biol **467**: 343-355.

Seebauer, C., H. Tanaka, M. Hori and H. R. Metelmann (2016). "Palliative Plasmabehandlung von Kopf-Hals-Tumoren und kurative Konzepte." H.-R. Metelmann, T. v. Woedtke and K.-D. Weltmann. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 100-107.

Søballe, K., E. S. Hansen, H. B. Rasmussen, P. H. Joergensen and C. Bunger (1992). "Tissue Ingrowth into Titanium and Hydroxyapatite-Coated Implants During Stable and Unstable Mechanical Conditions." Journal of Orthopaedic Research **10**: 285-299.

Spatschek, K.-H. (1990). "1.1 Definitionen." K.-H. Spatschek. Theoretische Plasmaphysik -Eine Einführung. Stuttgart, B.G. Teubner: 7-13.

Spielmann, H., I. Gerner, S. Kalweit, R. Moog, T. Wirnsberger, K. Krauser, R. Kreiling, H. Kreuzer, N. P. Lupke, H. G. Miltenburger, N. Muller, P. Murmann, W. Pape, B. Siegemund, J. Spengler, W. Steiling and F. J. Wiebel (1991). "Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany." Toxicol In Vitro **5**(5-6): 539-542.

Spielmann, H., S. Kalweit, M. Liebsch, T. Wirnsberger, I. Gerner, E. Bertram-Neis, K. Krauser, R. Kreiling, H. G. Miltenburger, W. Pape and W. Steiling (1993). "Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals." Toxicol In Vitro **7**(4): 505-510.

Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol **57**: 827-872.

Stanford, C. M. (2010). "Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation." Int J Mol Sci **11**(1): 354-369.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019). "Krankenhäuser Die 20 häufigsten Operationen insgesamt (OPS 5) - Vollstationär behandelte Patientinnen und Patienten in Krankenhäuser 2018." www.destatis.de (Thematische Recherche: Gesellschaft- Umwelt-Gesundheit- Krankenhaeuser- Tabellen- DRG-Operationen-insgesamt, Dokumentart: Tabelle) Retrieved 15.02.2020.

Staton, C. A., M. W. Reed and N. J. Brown (2009). "A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays." Int J Exp Pathol **90**(3): 195-221.

Steinbauer, M., A. G. Harris, C. Abels and K. Messmer (2000). "Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model." Langenbecks Arch Surg **385**(4): 290-298.

Steinmüller, O. (1937). "Phagozytoseversuche am lebenden Hühnerembryo." Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen **137**(1): 18.

Terepka, A. R., M. E. Stewart and N. Merkel (1969). "Transport functions of the chick chorio-allantoic membrane. II. Active calcium transport, *in vitro*." Exp Cell Res **58**(1): 107-117.

Tona, K., F. Bamelis, B. De Ketelaere, V. Bruggeman, V. M. Moraes, J. Buyse, O. Onagbesan and E. Decuypere (2003). "Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth." Poult Sci **82**(5): 736-741.

Tuan, R. S. (1980). "Calcium transport and related functions in the chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos." Dev Biol **74**(1): 196-204.

Veihelmann, A., G. Szczesny, D. Nolte, F. Krombach, H. J. Refior and K. Messmer (1998). "A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo." Res Exp Med (Berl) **198**(1): 43-54.

Vinardell, M. P. and M. Macian (1994). "Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential." Toxicol In Vitro **8**(3): 467-470.

von Woedtke, T., H. R. Metelmann and K. D. Weltmann (2014). "Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma." Contributions to Plasma Physics **54**(2): 104-117.

Waller, A. (1846). "Microscopic examination of some of the principal tissues of the animal frame, as observed in the tongue of the living Frog, Toad, &c." Philosophical Magazine Series 3 **29**(194): 271-287.

Walschus, U., A. Hoene, A. Kochanowski, B. Neukirch, M. Patrzyk, L. Wilhelm, K. Schroder and M. Schlosser (2011). "Quantitative immunohistochemical examination of the local cellular reactions following implantation of biomaterials." J Microsc **242**(1): 94-99.

Wang, Y., Y. Jin, B. Laviña and L. Jakobsson (2018). "Characterization of multi-cellular dynamics of angiogenesis and vascular remodelling by intravital imaging of the wounded mouse cornea." Scientific Reports **8**(1): 10672.

Warner a), N. L. and A. Szenberg (1962). "Effect of Neonatal Thymectomy on the Immune Response in the Chicken." Nature **196**(4856): 784-785.

Warner b), N. L., A. Szenberg and F. M. Burnet (1962). "The immunological role of different lymphoid organs in the chicken." Aust J Exp Biol Med **40**(5): 373-388.

Williams, D. F. (2008). "On the mechanisms of biocompatibility." Biomaterials **29**(20): 2941-2953 (2951).

Wilting, J., B. Christ and M. Bokeloh (1991). "A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors." Anatomy and Embryology **183**(3): 259-271.

Winning, S. (2009). „Die Bedeutung von Hypoxie und Endotoxintoleranz für die Funktion von Monozyten und Makrophagen sowie für die Wechselwirkung von Monozyten und Endothel [Dissertation].“Duisburg-Essen: Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen.

Wolf, T. and N. P. Luepke (1997). "Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity." Mutat Res **394**(1-3): 163-175.

Wu, G. and Z. Li (2009). "Rapid clearance of circulating protein by early chicken embryo blood cells." J Exp Biol **212**(14): 2176-2182.

Young, J. (1929). "Malpighi's 'De Pulmonibus'." Proc R Soc Med **23**(1): 1-11.

Zhao, G., Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran and B. D. Boyan (2005). "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure." J Biomed Mater Res A **74**(1): 49-58.

Zimmermann, J. L., T. Shimizu, H. U. Schmidt, Y. F. Li, G. E. Morfill and G. Isbary (2012). "Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment." New Journal of Physics **14**(7): 073037, 16 pages.

Zuckerman, A. (1946). "Infections with Plasmodium gallinaceum in chick embryos induced by exoerythrocytic and blood stages." J Infect Dis **79**: 1-11.

Zysk, S. P., H. H. Gebhard, T. Kalteis, M. Schmitt-Sody, V. Jansson, K. Messmer and A. Veihelmann (2005). "Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo." Clin Orthop Relat Res (433): 258-264.

Zysk, S. P., H. H. Gebhard, C. Pellengahr, H. J. Refior, W. Plitz, K. Meßmer and A. Veihelmann (2003). "Inflammatorische Reaktion auf Abriebpartikel von Endoprothesen *in vivo*- Ein experimentelles Modell an der Maus." Orthopäde **32**(4): 305–311.

VII Anhang

Avian Adeno Viruses, group 1	AGP	N
Avian Encephalomyelitis virus	ELISA	N
Avian Infectious Bronchitis virus	ELISA	N
Avian Infectious Laryngotracheitis Virus	ELISA	N
Avian Leukosis Viruses/antibodies subtypes A,B,J	ELISA	N
Avian Leukosis Viruses – P27 antigen	ELISA	N
Avian Nephritis Virus	ELISA	N
Avian Orthoreoviruses	ELISA	N
Avian Reticuloendotheliosis Virus	ELISA	N
Avibacterium paragallinarum	CO/PM	N
Chicken Anemia Virus (CAV)	ELISA	N
Egg Drop Syndrome Virus	HI	N
Fowlpox Virus	CO/PM	N
Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Serotype 1	ELISA	N
Serotype 2	VN	
Influenza A Virus	AGP	N
Marek's Disease Virus	AGP	N
Mycobacterium avium	CO/PM	N
Mycoplasma gallisepticum	SPA	N
Mycoplasma synoviae	SPA	N
Newcastle Disease Virus	HI	N
Salmonella pullorum	SPA	N
Salmonella spp.	BE	N
Turkey Rhinotracheitis Virus	ELISA	N
<p>HI= Hemagglutination-Inhibition Test, AGP= Agar-Gel-Precipitation Test, SPA= Serum Plate Agglutination, BE= Bacteriological Examination, CO= Clinical Observation, PM= Post Mortem, VN= Virus Neutralization Test, ELISA= Enzyme linked Immunosorbent Assay, N= Negativ</p>		

Tabelle 6: Angaben über Keimfreiheit der gelieferten Hühnereier (Valo BioMedia)

VIII Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. h.c. Axel Ekkernkamp für die Unterstützung und Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und Rehabilitative Medizin durchzuführen. Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas von Woedtke möchte ich für die Vorlesungen über und die Begeisterung für die Plasma-Medizin danken. Dem INP Greifswald gebührt mein Dank für die Leihgabe und die technische Unterstützung des kINPen® MED. Frau Dr. rer. nat. Claudia Bender und Ines Lehmann danke ich für die ausführliche Anleitung und Tizian Sehmsdorf für die kollegiale Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. habil. Axel Sckell für das Vertrauen, die Unterstützung und unerschöpfliche Motivation.