

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROFESSOR DR. DR. T.E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Bakterizide und antiadhäsive Wirkung von Kupferbeschichtungen auf  
Silikonbrustimplantaten**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Schedel

2011

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROFESSOR DR. DR. T.E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Bakterizide und antiadhäsive Wirkung von Kupferbeschichtungen auf  
Silikonbrustimplantaten**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Schedel

2011

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Torsten E. Reichert  
1. Berichterstatter: PD. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lukas Prantl  
Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2012

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis:	Seitenzahl
1. Einleitung	1
1. 1. Historie der Silikonbrustimplantate	1
1.1.1. Silikon	3
1. 2. Verwendung von Silikonbrustimplantaten	5
1.2.1. Implantatcharakteristika	7
1. 3. Komplikationen bei der Verwendung von Silikonimplantaten	10
1.3.1. Ätiologie der Kapselfibrose bei Brustimplantaten	12
1. 4. Komplikationsursachen bei der Verwendung von Silikonimplantaten	16
1.4.1. Bakterielle Kontamination (exogen/endogen)	17
1.4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
1.4.3. Biofilme	21
1. 5. Ansätze zur Komplikationsvermeidung	24
1.5.1. Antibakterielle und antiadhäsive Wirkung von Schwermetallen (Kupfer, Silber)	24
1.5.2. Oberflächencharakteristika (bakterienabweisende Beschichtungen)	25
1. 6. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2. 1. Herstellung der Probekörper	28
2. 2. Künstliche Alterung der Silikonprobekörper	30
2. 3. Messung der Kupferfreisetzung	31
2. 4. Messung der Oberflächenrauheit ( $R_a$ )	31
2. 5. Bestimmung der freien Oberflächenenergie (SFE)	32

2. 6. Kultivieren der Bakterien	33
2. 7. Lebend-Tot-Färbung	35
2. 8. Fluoreszenzmikroskopie	35
2. 9. Quantifizierung der adhärenten Mikroorganismen	38
2.10. Statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	40
3. 1. Ergebnisse der Messung der Kupferfreisetzung	40
3. 2. Ergebnisse der Oberflächenrauheitsmessungen ( $R_a$ )	41
3. 3. Ergebnisse der Messungen der freien Oberflächenenergie (SFE)	41
3. 4. Bakterielle Adhäsion	42
3.4.1. Fluoreszenzaufnahmen	42
3.4.2. Quantifizierung der Gesamtmenge der adhärenten Keime (antiadhäsiver Effekt)	45
3.4.3. Anteil der avitalen Bakterien an der Gesamtmenge der adhärenten Keime (bakterizider Effekt)	47
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57
7. Danksagung	72
8. Lebenslauf	73

# **1. Einleitung**

## **1. 1. Historie der Silikonbrustimplantate**

Die erste dokumentierte Operation zum Ersatz von weiblichem Brustgewebe fand 1895 statt. Der Heidelberger Chirurg Czerny rekonstruierte, nach Exstirpation eines Knotens aus der Brust, einer Patientin den entstandenen Defekt mit Hilfe eines Lipoms aus dem Glutealbereich. 1917 füllte der amerikanische Chirurg Barett nach einer subkutanen Mastektomie den Defekt mit autologem Fettgewebe aus dem Bereich des Bauches und des Gesäßes auf. Neben körpereigenem Gewebe wurden auch körperfremde Substanzen, wie beispielsweise Paraffin, verwendet. Paraffininjektionen verursachten jedoch schwere Komplikationen. Die Suche nach einem möglichst inerten Material führte im Jahre 1930 zu Experimenten mit Glaskugeln, die aber auf Grund des Gewichtes, der Härte, sowie der mechanischen Belastung der Brust unbefriedigende Ergebnisse lieferten [Goscin et al 2001]. Nach den Fehlschlägen mit körperfremden Substanzen richtete sich in den 50er Jahren das Interesse wieder auf körpereigenes Gewebe zum Volumenersatz. Diese Techniken waren jedoch sehr aufwändig und wenig erfolgreich, sodass bei vielen Patientinnen weiterhin Paraffin- und später Silikonöl injiziert wurde. Auf Grund der Versuche von Grindlay und Clagett (1949), sowie von Grindlay und Waugh (1951), über Polyvinylschaum-Implantate bei Hunden, rückte dieses Material in den Fokus der Aufmerksamkeit [Converse Plastic Surgery 1977]. Die Polyvinylmaterialien führten zu geringen Fremdkörperreaktionen und waren nicht toxisch, hatten aber die Tendenz zu verhärten und zu schrumpfen. 1963 wurde ein Implantat entwickelt, bestehend aus Polysiloxanschaum (=Silikonschaum) mit einer Hülle aus Teflon, dieses sollte ein „Fibrosieren“ verhindern.

Die Silikonschaumimplantate wurden schnell durch Silikonhüllenimplantate ersetzt, welche mit den verschiedensten Materialien gefüllt wurden, wie zum Beispiel Silikongel, Kochsalz, Dextran oder Polyvinylpyrrolidon (PVP). Den Anstoß für diese erste Generation der heutigen Brustimplantate gaben 1964 Cronin und Gerow mit der sogenannten „Cronin-Prothese“ [Strömbeck et al 1986; McCarthy et al 1990; Beisang et al 1991]. Die Implantate der ersten Generation waren stabil mit kräftiger Hülle und festem Gelinhalt. Auf Grund der hohen Kontrakturrate und damit scheinbarer Verhärtung der Implantate entwickelte man ab Ende der 70er Jahre die Implantate der zweiten Generation [Peters 2000]. Diese hatten eine dünnere Silikonhülle und eine relativ flüssige Gelfüllung. Sie fühlten sich im Vergleich zur ersten Generation weicher und natürlicher an. Durch die veränderte Silikonhülle büßten die Implantate jedoch enorm an Widerstandsfähigkeit ein und es kam vielfach zu Hüllenrissen [Feng et al 1999]. Mit einer doppelten Hülle der Implantate versuchte man das Risiko von austretendem Silikongel in das umgebende Gewebe einzudämmen. Das eigentliche Problem der Kapselfibrose, welches auch heute noch die häufigste Komplikation darstellt, wurde mit der Entwicklung der zweiten Implantatgeneration nicht behoben. Denn nicht die Implantate der ersten Generation fühlten sich hart und unnatürlich an, sondern die unerwünschte Kontraktur der bindegewebigen Kapsel um die Prothesen [Peters 2000]. Somit war die Entwicklung zur zweiten Generation eher ein Rückschritt. Die dritte Generation von Brustimplantaten wurde Ende der 80er Jahre entwickelt. Diese hatten stärkere Hüllen mit texturierten Oberflächen, die je nach Fabrikation unterschiedlich ausfielen konnten. Die rauhe Oberfläche sollte die Integration in das Gewebe verbessern und somit die Gefahr einer Kapselkontraktur minimieren. Die aktuelle, vierte Generation der Silikonimplantate ist mit einem kohesiven bis hoch-kohesiven Gel gefüllt.

Nicht nur die Materialien der Silikonhüllenimplantate waren seit ihrer Entstehung einigen Entwicklungen unterworfen, es erweiterte sich ebenso das Indikationspektrum: Vor 1975 wurde hauptsächlich zum Zwecke der kosmetischen Augmentation implantiert, die rekonstruktive Chirurgie nach abladierenden Operationen fand erst in den darauffolgenden Jahren beträchtlichen Zuwachs [Cook et al 1995]. In den USA nahm die Neuimplantationsrate bei Frauen im Alter von über 15 Jahren von 3,5 pro 100.000 (1964) auf 95 pro 100.000 (1979) stetig zu und bleibt seitdem stabil. Nach den Ergebnissen einer Repräsentativumfrage im Jahre 1989 gab es zu diesem Zeitpunkt ca. 815.700 Silikonimplantatträgerinnen in den USA [Gabriel et al 1995].

### **1. 1.1. Silikon**

Silikon, chemisch genauer Poly(organo)siloxan, ist eine Bezeichnung für eine Gruppe synthetischer Polymere, bei denen Siliziumatome über Sauerstoffatome verknüpft sind. Der Begriff „Silikone“ wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von dem englischen Chemiker Frederic Stanley Kipping (1863–1949) eingeführt und leitet sich vom englischen *silicon ketone* ab.

Einfache, lineare Silikone sind nach dem Schema  $(R_2SiO)_n$  aufgebaut.  $R_2SiO$  entspricht der allgemeinen Formel für Ketone:  $R_2C=O$ , da die Si-O-Doppelbindung jedoch im chemischen Sinne nicht stabil ist, ist diese Ableitung rein formal.

Silikone bestehen aus einzelnen Siloxaneinheiten, dabei sind Siliziumatome, die durch das Ausbilden von Bindungen zu Sauerstoffatomen ihr Oktett (Elektronenschale) nicht erreichen, mit organischen Resten abgesättigt.

Die Zusammensetzung der Siloxaneinheiten ergibt sich unter Berücksichtigung der Tatsache, dass jedes Sauerstoffatom als Brückenglied zwischen je zwei

Siliziumatomen liegt:  $R_nSiO_{(4-n)/2}$ , d. h. eine Siloxaneinheit kann ein bis vier weitere Substituenten aufweisen, je nach Anzahl der frei gebliebenen Valenzen am Sauerstoff [Lykissa et al 1997; Flassbeck et al 2001].

Auf Grund ihres typisch anorganischen Gerüstes einerseits und der organischen Reste andererseits, nehmen Silikone eine Zwischenstellung zwischen den Silikaten und organischen Polymeren ein. Sie sind in gewisser Weise Hybride und zeigen ein einzigartiges Eigenschaftsspektrum, das kein anderer Kunststoff aufweisen kann.

Eines der bekanntesten Beispiele eines solchen Stoffes ist das Polydimethylsiloxan (siehe Abb. 1), besser geläufig unter seiner Abkürzung PDMS. Dies ist ein synthetisches Polymer mit sich wiederholenden  $(CH_3)_2SiO$ -Einheiten.

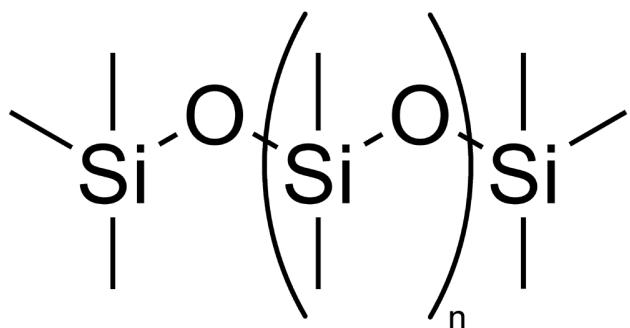


Abb. 1: Polydimethylsiloxan.

Friedel und Crafts waren 1963 die ersten Chemiker, die in der Lage waren Si-O-Verbindungen zu synthetisieren. Diese Pionierarbeit ebnete den Weg für die Herstellung von Silikon-Polymeren.

Je nach Länge der Si-O-Kette und Anzahl der Quervernetzungen lässt sich industriell genutztes Silikon in fünf Klassen unterteilen:

- Flüssigkeiten
- Mischpräparate
- Gleitmittel
- Harze
- Gummi [Le Vier et al 1995].

Das in der Medizin überlicherweise genutzte Silikon ist ein Polymer aus Siloxaneinheiten, die mit Methylgruppen hoher Reinheit abgesättigt sind. Es zeichnet sich besonders durch seine geringe Bioreaktivität aus, gilt als biologisch inert und toxikologisch unbedenklich. Auf Grund dessen findet die Materialgruppe der Silikone seit Jahrzehnten ihren Einsatz in diversen medizinischen Bereichen. Beispielsweise werden Silikonmaterialien für wasserdampfsterilisierbare Bluttransfusionsschläuche, Herzklappenventile, Katheter- und Schlauchsonden, sowie die in dieser Arbeit behandelten Silikongelimplantate verwendet [Wick et al 1982].

## **1. 2. Verwendung von Silikonbrustimplantaten**

Die Verwendung von Silikonimplantaten ist heutzutage ein etabliertes Verfahren zur primären und sekundären Rekonstruktion nach abladierenden Operationen der Brust oder zur Therapie von Fehlbildung und Anlagestörungen. Das Hauptindikationsgebiet bildet jedoch die kosmetische Augmentation bei Mikromastien.

Bei der in Vollnarkose durchgeführten Operation wird nach erfolgtem Hautschnitt das Brustdrüsengewebe angehoben und eine Implantattasche gebildet, in die das Brustimplantat eingelegt wird. Der transkutane Zugang, von dem postoperativ möglichst wenig zu sehen sein sollte, kann in der Unterbrustfalte (inframammärer Zugang (A)), um oder durch den Warzenhof (peri- oder transareolarer Zugang (B)) oder wahlweise in der Achselhöhle (transaxillärer Zugang (C)) erfolgen (Abb. 2).

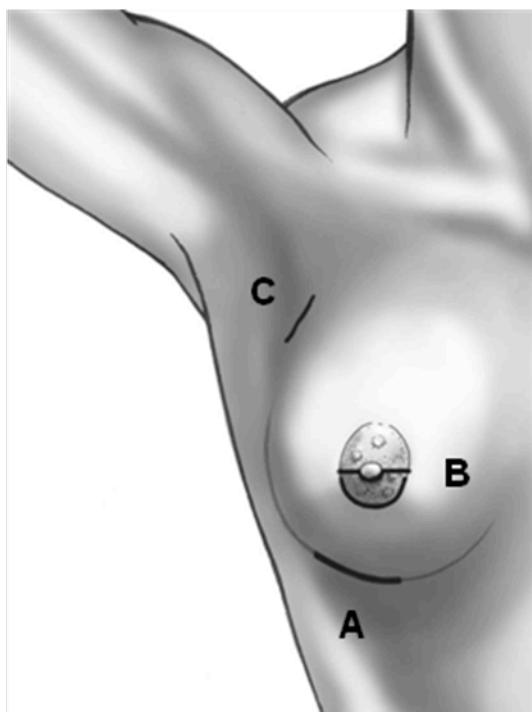


Abb. 2: Möglichkeiten der chirurgischen Schnittführung [Pittet et al 2005].

Die anschließend präparierte Implantathöhle befindet sich entweder zwischen der Brustdrüse und dem Muskel (subglanduläre Implantation, siehe Abb. 3A), unterhalb des *Musculus pectoralis major* (submuskuläre Implantation, siehe Abb. 3B), oder gegebenenfalls direkt unterhalb der Muskelfaszie (subfasziale Implantation). Das Brustdrüsengewebe selbst bleibt weitgehend unberührt.

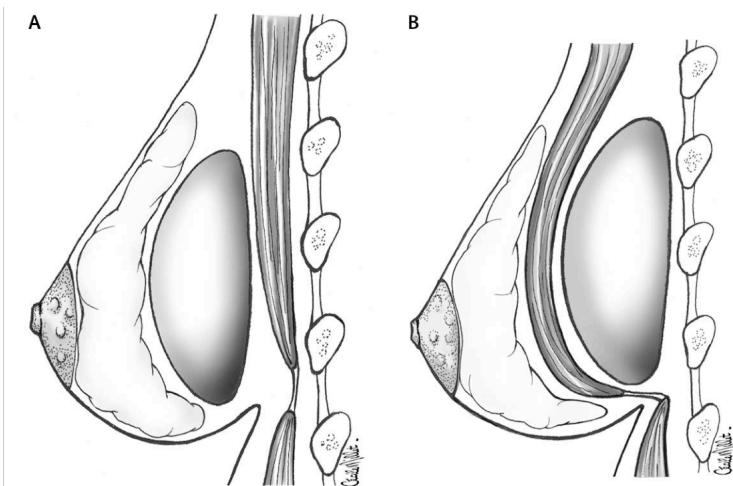


Abb. 3: Graphik A zeigt die subglanduläre Lage des Implantats, Graphik B, die der submuskulären Lage [Pittet et al 2005].

### 1. 2.1. Implantatcharakteristika

Seit ihrer Produkteinführung wurden weit über 240 verschiedene Silikongelimplantattypen allein in den USA entwickelt. Es gibt viele Hersteller und unterschiedliche Ausführungen der Brustimplantate, beispielsweise ein- bzw. doppelkammerige, glatte oder texturierte Prothesen. Auch Implantate ohne Hülle wurden produziert (Cavon Implantat und Aesthetech Implantat), sie wurden in den USA zwischen 1979 und 1986 verwendet [Middleton et al 1998]. Der Aufbau eines modernen Silikonimplantates setzt sich im Allgemeinen aus einer Außenhülle und einem variablen Füllmaterial zusammen. Das Volumen der Implantate wird für jede Patientin nach individuellen Gesichtspunkten ausgewählt und bewegt sich normalerweise zwischen 70 und 250 ccm, bei Bedarf kann es auch erheblich größer sein. Die Implantathülle besteht aus hochpolymeren Silikonelastomeren (Abb. 4), ist einfach oder doppelt und ca. 200-300 µm dick. Bei der Oberflächenstruktur wird zwischen glatten und texturierten Ausführungen unterschieden, ebenso können sie

mit Polyurethanschaum beschichtet sein. Die Außenhülle erfüllt vor allem die wichtige Funktion der Barriere für die meist gelartige Füllung [Pfleiderer et al 1995a]. Durch die stabile Umhüllung der Prothesen wird die Gefahr eines Defekts des Implantates durch äußere Einwirkung weitgehend reduziert, zudem wird durch die bereits genannte Barrierefunktion das Risiko des *Bleedings*, das Herausdiffundieren kleiner Mengen von Silikonöl aus dem Gelinhalt, gering gehalten.

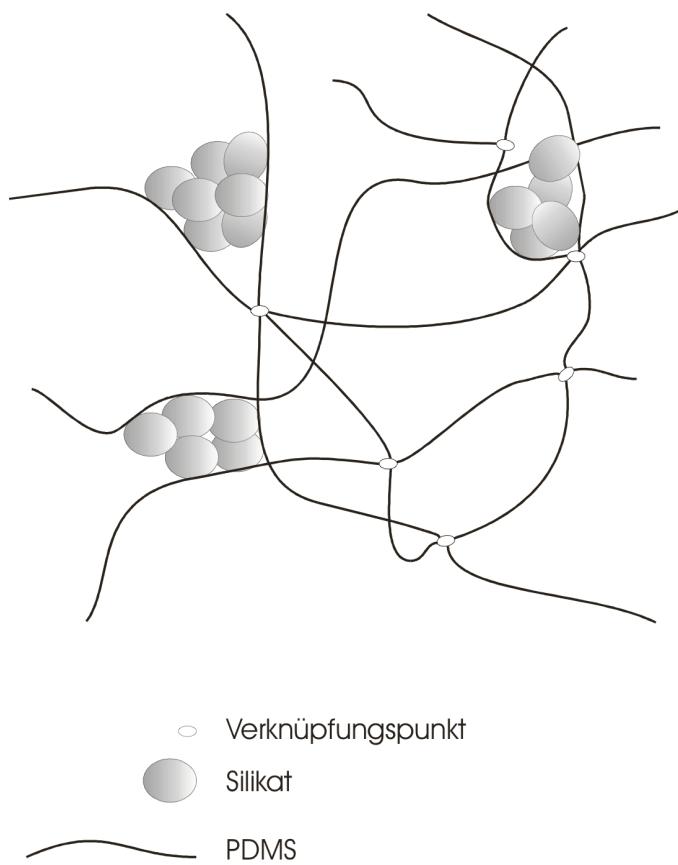


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Silikonelastomers [Lane et al 1996].

Bei dem Füllmaterial handelt es sich meist um ein Silikongel (Abb.5), einem relativ hochvernetzten Polydimethylsiloxan (PDMS). Die hierbei vorliegende Art der Siloxankettenverbindung führt zur Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes,

welches mit niedermolekularen Polydimethylsiloxanen (Silikonölen) aufgefüllt ist [Lane et al 1996]. Somit entsteht ein zähes, dickflüssiges Material. Durch die dreidimensionale, schwammähnliche Matrix bleibt das Gel sogar im Falle einer Implantatruptur weitestgehend formstabil [Heden et al 2006]. Historisch gesehen, wurden drei Typen von Silikongelen in Prothesen verwandt: das originale, feste Gel zwischen 1964 und 1977, ein leicht verändertes Gel und das elastische Gel, ab etwa 1975-1992 [Lane et al 1996]. Die heutigen Implantate sind mit kohesiven bis hochkohesiven Gelen gefüllt. Alternativ können die Implantate auch mit Kochsalz gefüllt sein, von dem früher gebrauchten Soja-Öl wird mittlerweile abgesehen.

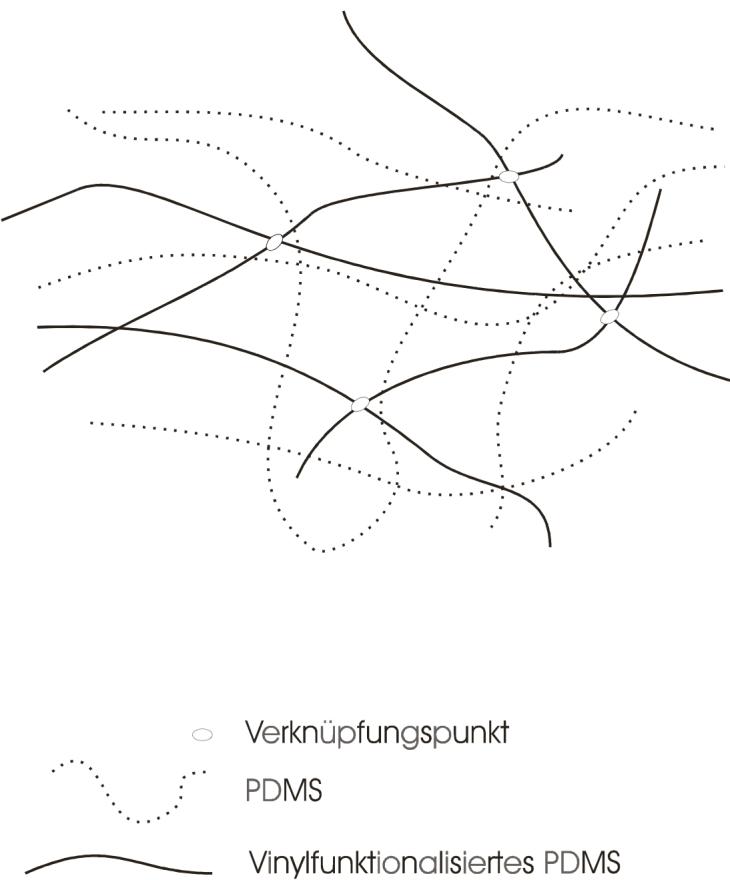


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Silikongels [Lane et al 1996].

Bis heute haben die Silikonbrustimplantate eine lange Entwicklung mit zahlreichen Änderungen und Verbesserungen hinter sich, mit dem Ziel, auch die durch die Materialien verursachten Komplikationen so gering wie möglich zu halten. Im Ergebnis kann Silikon als eines der am besten erforschten Biomaterialien überhaupt angesehen werden.

### **1. 3. Komplikationen bei der Verwendung von Silikonimplantaten**

Silikonbrustimplantate werden, neben den üblichen OP-Risiken, von Komplikationen unterschiedlicher Genese begleitet. Jedoch konnten sie, dank der ausgiebigen Forschungsarbeiten und den daraus resultierenden Innovationen der letzten Jahrzehnte, minimiert und teilweise sogar weitestgehend eliminiert werden. Eine bekannte Komplikation der Silikonimplantate ist das sogenannte „Gelbluten“ [Peters 2000]. Das *Bleeding* bezeichnet den Vorgang des Diffundierens von Silikonöl durch die gering permeable Membran, also die Silikonhülle, aus dem Gelinhalt in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie Alter, Mischung des Gels und Umgebungsbedingungen. Der größere Anteil des ausgetretenen Silikonöls wird von Makrophagen aufgenommen und im Bindegewebe in unmittelbarer Implantatnähe festgehalten. Kleinere Mengen können in den umgebenden Lymphknoten der Axilla nachgewiesen werden [Barker et al 1978; Hausner et al 1978; Ahn et al 1994]. Es kann angenommen werden, dass kleinste Mengen darüber hinaus in das Körpergewebe und die Organe, wie der Leber, gelangen [Pfleiderer et al 1995b]. Die Silikonfüllung stand deshalb einige Zeit im Verdacht Autoimmunkrankheiten oder Malignome zu verursachen [Friemann et al 1997]. 1979 wurden 4 Fälle von Sklerodermie nach kosmetischer Brustaugmentation beschrieben [Kruse et al 1999]. Im Jahre 1994 wurde auf Grund stark ähnlicher Krankheitsprofile in

Fallberichten von über 500 Patientinnen der Begriff der "Silikonose" eingeführt, um die klinischen Symptome, die im Zusammenhang mit Implantation von Silikonprothesen auftreten, zusammenzufassen [Mena et al 1995]. Nach Borenstein tritt die Silikonose bei Patientinnen mit Silikonprothesen erst 9-10 Jahren nach der Implantation auf [Borenstein 1994]. Sie kann mit systemischen Symptomen wie Unwohlsein, Müdigkeit, Diarrhoe, Muskel- und Gelenkschmerzen, Schwäche und Fieber einhergehen [Nemecek et al 1993; Dowden 1994]. Eine Erhöhung der antinukleären Antikörper und anderen Rheumafaktoren fanden sich bei 40 - 50 % der Implantatträgerinnen im Vergleich zu 5 - 6 % des Vergleichskollektivs [Hardin 1986; Mukerji et al 1993]. Aus diesem Grund wird die Silikonose als eine Immunkrankheit beschrieben. Andere Krankheitssymptome umfassen Schluckbeschwerden, neurologische Symptome, Gelenköseme, Hautveränderungen, Atembeschwerden, trockene Schleimhäute und trockene Augen. Die verschiedenen Symptome, die sich bei den Patientinnen äußerten, hatten das klinische Bild, wie es normalerweise auch bei Autoimmunerkrankungen, wie z. B. bei systemischen *Lupus Erythematoses* (SLE), systemischer Sklerodermie, Arthritis oder Sjögren Syndrom gefunden wird [Press et al 1992; Bridges 1994; Claman et al 1994; Vasey et al 1994]. Weitere Studien konnten zeigen, dass bei Frauen mit Silikonimplantaten Antikörper gegen körpereigenes Kollagen produziert werden. Bisher ist aber unklar, mit welcher Häufigkeit diese Antikörper in der normalen Population auftreten. Außerdem konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass diese Antikörper CTDs (*connective tissue diseases*) oder andere Krankheiten verursachen können [Wolf et al 1993; Teuber et al 1993; Rowley et al 1994]. Das Auftreten von verschiedenen Antikörpern bei Frauen mit Implantaten heißt somit nicht, dass diese einem erhöhten Risiko gegenüber der Entstehung von CTDs oder anderen Krankheiten ausgesetzt sind [FDA, Breast Implants - an information

update, 2002]. Eine weitere mögliche Komplikation bei Silikonbrustimplantaten ist die Implantatruptur. Die Rupturrate ist abhängig von der Implantationszeit, Implantatgeneration, Hersteller und Sitz des Implantates. Bei Silikonbrustprothesen konnte ein Zusammenhang zwischen der Implantatliegedauer und der Anzahl der Lecks oder der rupturierten Brustimplantate hergestellt werden. Sowohl ältere als auch neuere Studien zeigten einen Verlust der Integrität der Prothesen nach 8-14 Jahren Liegezeit [Robinson et al 1995]. Es ergab sich ein exponentieller Verlauf und eine direkte Korrelation zwischen Implantatliegedauer und Versagerquote der Hülle [Marotta et al 1999; Feng et al 1999]. Die Implantate der 2. Generation mit einer dünneren Hülle wiesen besonders nach 15-19 Jahren Implantatliegedauer eine hohe Rupturrate auf [Feng et al 1999]. Weiterhin entscheidend sind der Sitz des Implantates und das Vorhandensein einer periimplantären Kontraktur. Das Risiko eines Hüllenrisses ist bei bereits vorhandener Kontraktur und retroglandulärem Sitz des Implantates signifikant höher, als bei retropektoralem Sitz und fehlender Kontraktur [Feng et al 1999]. Seit der Einführung von Silikonimplantaten in der Mammachirurgie besteht jedoch die häufigste Langzeitkomplikation in der Entwicklung einer Kapselfibrose.

### **1. 3.1. Ätiologie der Kapselfibrose bei Brustimplantaten**

Die Ätiologie der Fibrose ist bis heute unklar. Man vermutet eine multifaktorielle Genese des Geschehens. In der Literatur findet man zahlreiche Studien über modulierende Faktoren wie Füllungsmaterial, Sitz des Implantats, Oberflächenbeschaffenheit, bakterielle Kontamination und Einfluss der Schwierigkeit des operativen Eingriffs auf die Häufigkeit der Entstehung der Kapselfibrose.

Um ein möglichst naturgetreues, postoperatives Ergebnis zu erhalten, wird die Implantathöhle minimal größer angelegt als das Implantat selbst. Die Wundheilung bewirkt, dass sich eine Narbenhülle bildet, welche im Idealfall ihre ursprüngliche Größe behält. Diese entstandene Kapsel fixiert das Implantat und entspricht der Konsistenz der Brust. Bei manchen Patientinnen kommt es durch eine überschießende Bindegewebsreaktion zu starken Schrumpfungen und Verhärtungen der Implantatkapsel, einer sogenannten Fibrose. In Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Kapselfibrose können bei den Patientinnen ein Fremdkörpergefühl, Druck- und Spannungsgefühl, bis hin zu starken Schmerzen auftreten. Die Kontraktur der Kapsel kann zu einer erheblichen Verformung der weiblichen Brust führen, sodass eine operative Korrektur, im Sinne einer Explantation oder eines Implantatwechsels, erforderlich wird. Die Inzidenzangaben für die Kapselkontraktur schwanken in der Literatur von 4% bis 74%. Henriksen et al untersuchten 2277 Frauen nach ästhetischer Brustaugmentation. Bei 561 von insgesamt 4548 Implantaten kam es zu Komplikationen, bei 136 war ein sekundärer chirurgischer Eingriff erforderlich. Die häufigste Indikation für eine erneute Operation war mit 52 Fällen die ungünstige Platzierung der Implantate mit einhergehender Asymmetrie, gefolgt von der Kapselkontraktur mit 29 Fällen [Henriksen et al 2005]. Der klinische Erfolg einer Augmentation der Brust mit Silikonimplantaten ist unmittelbar von der zellulären Reaktion an der Grenzfläche abhängig, welche von dem Implantat und dem körpereigenem Gewebe gebildet wird. Diese zelluläre Antwort auf das Einbringen eines Fremdmaterials wird durch eine große Anzahl von Einzelfaktoren bestimmt. Lokale Reaktionen in der Implantatloge und deren Einfluss auf die Extrazellulärmatrix in Form einer Aktivierung der Kollagensynthese scheinen der Schlüssel zum ursächlichen Verständnis der Kapselfibrose zu sein. Unabhängig von den Prothesentypen (glatte

oder texturierte Oberfläche) kommt es zu einem gesetzmäßigen Ablauf einer chronisch proliferierenden Entzündungsreaktion, welche mit einer synovialen Metaplasie beginnt und bei einer Verweildauer von länger als 2 Jahren in einem hyalinen Narbenstadium endet [Siggelkow et al 2003]. Die Art des Implantattyps spielt für die Dauer dieser Reaktion eine entscheidende Bedeutung. Die anfänglich verwendeten Brustimplantate mit einer glatten Oberfläche wiesen eine hohe Rate von Kapselkontrakturen auf [Benediktsson et al 2000]. Durch die Verwendung von rauen, texturierten Oberflächen kann die Kapselkontrakturrate scheinbar deutlich minimiert werden [Hakelius et al 1997]. Die bei texturierten Implantaten auftretende pseudopolypöse Fältelung des bindegewebigen Prothesenlagers, welche als eine Art Negativabdruck aus dem Produkt des resorbierenden Granulationsgewebes zu verstehen ist, stellt einen entscheidenden Faktor für die Verankerung und die Biobeständigkeit des Implantates dar. Obwohl die Entzündungsreaktion nach Einbringen eines Fremdkörpers *in situ* einem gesetzmäßigen Ablauf unterliegt, kann die Fibroserate bei texturierten Prothesen vermutlich durch einen verzögerten Übergang von der granulierenden Entzündungsreaktion in das zellarme Narbenstadium gesenkt werden [Friemann et al 1997]. Die Untersuchung von insgesamt 53 Patientinnen mit glatten und texturierten Silikonbrustimplantaten mit subglandulärer Position nach Brustvergrößerung zeigte nach 12-monatiger Liegedauer bei glatter Oberfläche eine signifikant höhere Kapselkontrukturbildung (58 %) im Vergleich zu texturierten Implantaten (8 %) [Coleman et al 1991; Tricot et al 1996; Potter et al 1996]. Bis heute ist im Einzelfall aber nicht vorhersehbar, welche Rolle individuelle Faktoren für die Entstehung einer Kapselfibrose spielen. Weiterhin bereitet die objektive Beurteilung des Fibrosegrades gewisse Schwierigkeiten. Orientierung bietet die klinische Klassifikation nach Baker et al (1981) (siehe Tab. 1), sowie die histologische Klassifikation nach Wilfingseder et al

(1983) (siehe Tab. 1). Die Einteilung nach Wilfingseder et al unterteilt die klinischen und morphologischen Veränderungen, die bei einer Kapselfibrose auftreten, in vier Schweregrade. Beim Typ I liegt eine sehr dünne und nicht kontrakte Kapsel vor, was den Idealzustand darstellt. Die Typ-II- und Typ-III-Kapselfibrosen unterscheiden sich durch die Ab- oder Anwesenheit von Fremdkörperriesenzellen in der mittleren und innersten, implantatnahen Schicht. Beim Typ IV liegt nach Wilfingseder eine zelluläre Entzündungsreaktion mit Fremdkörpergranulomen und Neovaskularisation vor [Prantl et al 2007].

<b>Grad</b>	<b>Baker Kriterien</b>	<b>Wilfingseder Kriterien</b>
I	Implantat nicht palpabel, Implantatkonturen nicht sichtbar	dünne, nicht kontrakte Kapsel
II	Implantat leicht verhärtet, Implantatkonturen nicht sichtbar	„konstriktive Fibrose“, keine Fremdkörperriesenzellen
III	Implantat eindeutig verhärtet, Implantatkonturen sichtbar	„konstriktive Fibrose“, Fremd- körperriesenzellen vorhanden
IV	Implantat stark verhärtet, Implantatdislokation und Deformierung der Brust	Entzündungszellen, Fremd- körpergranulome, Neo-Vasku- larisation, Neurome möglich

Tab.1.: Baker- und Wilfingseder-Grade der Kapselfibrose [Prantl et al 2007].

## **1. 4. Komplikationsursachen bei der Verwendung von Silikonimplantaten**

Es gibt verschiedene Theorien zu den Ursachen von Kapselkontrakturen bei Silikonbrustimplantaten. Meist wird als zentraler Mechanismus die Ausbildung einer Entzündungsreaktion mit Induktion einer verstärkten Fibrosierung und Kapselschrumpfung beschrieben. Als potenzielle Auslöser der Entzündungsreaktion werden eine Fremdkörperreaktion oder eine periprothetische Bakterienkontamination diskutiert. Hinsichtlich der Fremdkörperreaktion sind die Meinungen noch kontrovers, ob es sich um eine unspezifische Reaktion des Körpers handelt oder um eine spezifische Aktivierung der Immunabwehr, ob die Implantatoberfläche und/oder ihre Abriebpartikel die Reaktion auslösen, oder ob die Implantatfüllung entscheidend ist, die durch *Leckage* oder *Bleeding* mit dem Körpergewebe in Kontakt kommt (siehe Abb. 6). Auch hinsichtlich der einzelnen Faktoren, die diese Fremdkörperreaktion beeinflussen, liegen zumeist keine eindeutigen Daten vor. Der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit (texturiert/glatt), die Oberflächenumhüllung (Polyurethan), die Implantatfüllung (Kochsalz/Silikon), der Zugangsweg der Implantateinbringung (inframammär, axillär, peri- oder transareolar) und die Implantatplatzierung (subglandulär, submuskulär, subfaszial) sind mögliche Einflussfaktoren [Prantl et al 2006]. In einer groß angelegten Studie von Handel et al wurden 1655 Implantate nach einer durchschnittlichen Liegezeit von 27,6 Monaten ausgewertet. Es erfolgte eine Korrelation der Kapselfibroseraten mit der Oberflächenbeschaffenheit (glatt, texturiert oder Polyurethan-Beschichtung), dem Füllungsmaterial (Kochsalz versus Silikongel), der Implantatform, der Lokalisation (prä- versus subpectoral), der Indikationsstellung und dem Vorkommen eines postoperativen Hämatoms. Entgegen der Aussagen vieler anderer Autoren, fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Kapselfibroserate in Korrelation zur Oberflächenbeschaffenheit, Lokalisation und Füllungsmaterial. Jedoch erhöht die

Kontamination mit Bakterien, speziell des koagulasennegativen Keims *Staphylococcus epidermidis* und die Indikation zur Implantation bzw. der Schwierigkeitsgrad des primären operativen Eingriffs das Risiko für die Ausbildung einer Kapselfibrose [Handel et al 1995].

#### **1. 4.1. Bakterielle Kontamination (exogen/endogen)**

Die bakterielle Besiedelung der Oberfläche von Silikonprothesen scheint als hauptsächlicher ätiologischer Faktor der Kapselfibrose immer mehr in den Vordergrund zu treten. Die subklinische Infektionstheorie (Anwesenheit von Bakterien ohne Zeichen einer Infektion) besagt, dass der Grund für die Entstehung einer chronischen Irritation und Entzündungsreaktion die Ausbildung eines Biofilms auf dem Implantat ist. Studien bestätigen den Zusammenhang zwischen subklinischer Infektion von Silikonimplantaten und dem Entstehen einer Kapselkontraktur [Freedman et al 1989; Reid et al 1996; Pajkos et al 2003; Pittet et al 2005]. Ferner zeigten sich 20%-60% der Implantatlogen keimbesiedelt, der dabei am häufigsten nachgewiesene Keim ist *Staphylococcus epidermidis* [Burkhardt et al 1986]. Trotz nachweislicher Infektion ist es meist schwierig den Ursprung dessen zu ermitteln. Sie kann exogen verursacht werden, beispielsweise durch bereits kontaminierte Implantate oder andere Verunreinigungen, die während der Operation oder im OP selbst geschehen. Auch die chirurgische Technik kann verantwortlich sein für die Kontamination der Implantate, z.B. durch den Kontakt der Prothesen mit der besiedelten Haut der Patientin. Im Gegensatz zu der inframammären Schnittführung erhöht die peri- oder transareolare Variante ebenso das Risiko der periprothetischen Kolonisation von Silikonimplantaten durch die endogene Brustdrüsenvoraus, die der normaler Haut weitgehend entspricht, denn die *Ductuli*

*lactiferi* bilden eine Passage von der Oberfläche der Haut in das Innere des Brustgewebes. Die Milchgänge sind in über 90% nachweislich bakteriell besiedelt (siehe Abb. 6) [Takayanagi et al 2004; Pittet et al 2005]. Auf Grund dessen ist dem subpectoralen Sitz der Prothese laut Burkhardt et al den Vorzug zu geben, da der Muskel eine Barrierefunktion übernimmt und somit das Implantat vor einer Kontamination mit dem keimbesiedelten Drüsenkörper schützt [Burkhardt et al 1986]. Zusammenfassend ergeben sich viele Hinweise, dass die bakterielle Besiedelung einen Einfluss auf die Ausbildung einer Kapselfibrose zu haben scheint. Laut den Studien von Pajkos et al und Prantl et al sind mögliche Lösungsansätze eine intraoperative Antibiotikaprophylaxe, ein gründliches Desinfizieren der Implantatloge und wie schon erwähnt, das sorgfältige Einbringen der Implantate unter Vermeidung von Hautkontakte [Pajkos et al 2003, Prantl et al 2007].

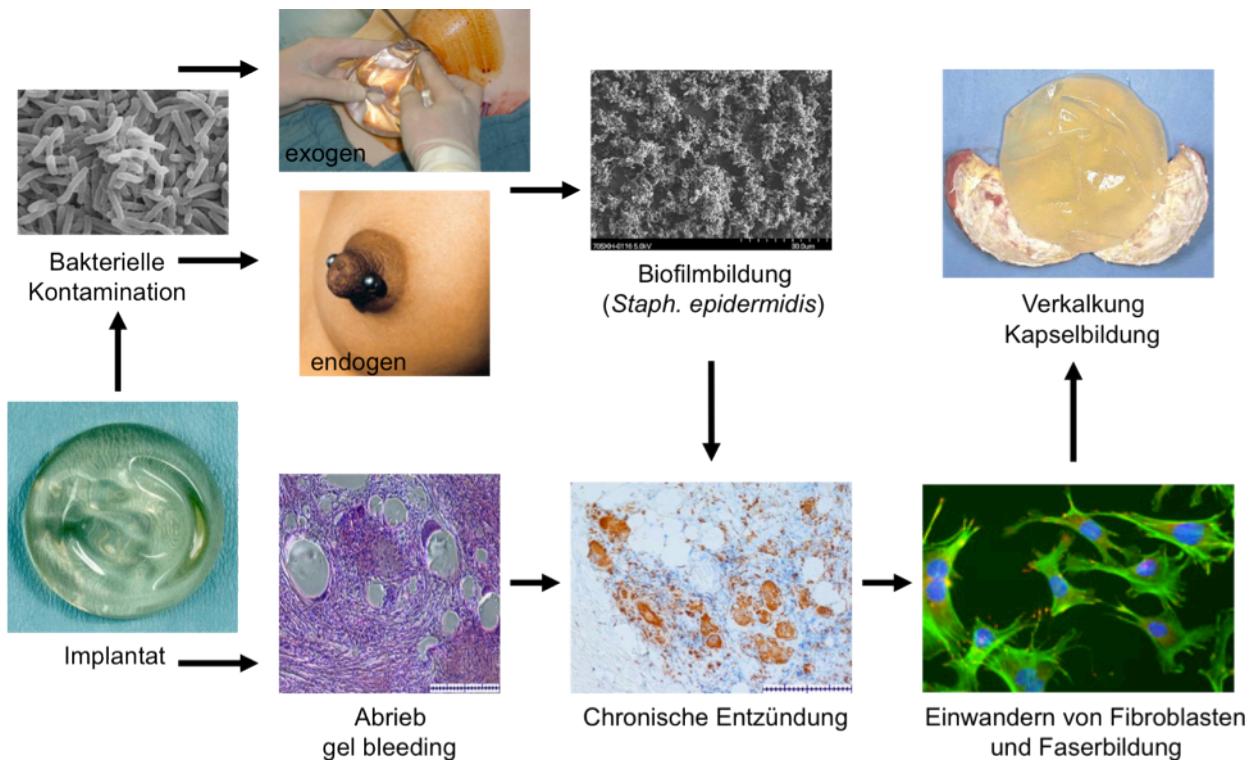


Abb. 6: Pathomechanismus der Kapselfibrose. Die übermäßige Schrumpfung der bindegewebigen Kapsel um ein Silikonbrustimplantat wird vermutlich durch multiple Faktoren verursacht: Die Ursprünge hierfür werden einerseits in der bakteriellen Kontamination (exogen/endogen) und andererseits im sogenannten *Gel-Bleeding* gesehen. Beide Wege münden in der Entstehung einer chronischen Entzündungsreaktion, welche der Schlüssel für die überschießende Fibrosierung des Bindegewebes zu sein scheint.

#### 1. 4.2. *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* (syn. *Staphylococcus albus*, *Micrococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*) ist ein grampositives, plasmakoagulase-negatives, saprophages Bakterium, das die menschliche Haut und Schleimhaut besiedelt

(siehe Abb.7). Des Weiteren ist es auf Lebensmitteln und polymeren Oberflächen zu finden. Über die Pathogenität von *Staphylococcus epidermidis* (S. e.) ist bekannt, dass diese Spezies in besonderem Maße in der Lage ist, durch Adhäsion an der Oberfläche von Kunststoffen anzuhafte und sich dort anschließend zu replizieren und Mikrokolonien auszubilden. Diese bakterielle Adhäsion spielt bei der Pathogenese einer bakteriellen Infektion eine entscheidende Rolle, denn sie ist Voraussetzung für die anschließende Kolonisation und Produktion extrazellulärer Produkte. Für die Adhäsion der Bakterien sind deren Oberflächenstrukturen (Fimbrien) wichtig [Quie und Belani 1987; Kloos und Lambe 1991; Schmidt et al 1998]. Für Menschen mit normaler, immunologischer Abwehr ist der Keim ungefährlich. Bei abwehrgeschwächten Menschen, kann er die Ursache für nosokomiale Infektionen sein. Häufig löst er eine Endokarditis nach Operationen am offenen Herzen oder Infektionen nach dem Einsetzen von Prothesen, Kathetern oder Drainagen aus. Der Anteil von *Staphylococcus epidermidis* bei Infektionen, die durch koagulasenegative Staphylokokken verursacht werden, beträgt 70%-80% und ist damit der häufigste Erreger bei fremdkörperinduzierten Erkrankungen. S. e. besitzt ein großes Spektrum an Antibiotikaresistenzen, dies gilt vor allem für Penicillin und Methicillin. Einige Stämme von *Staphylococcus epidermidis* können durch Produktion einer extrazellulären Schleimschicht in einer Art „Matrix“ der Phagozytose, Immunabwehr und dem Angriff antimikrobieller Substanzen entgehen und so auf Kunststoffen persistieren („Persister“) [Quie und Belani 1987; Kloos und Lambe 1991; Schmidt et al 1998]. Der Anteil dieser resistenten Stämme liegt aktuell bei 70% [ZCT 2/2004]. Dieser Umstand erschwert das Vorgehen gegen die durch diesen Keim verursachten Infektionen beträchtlich.

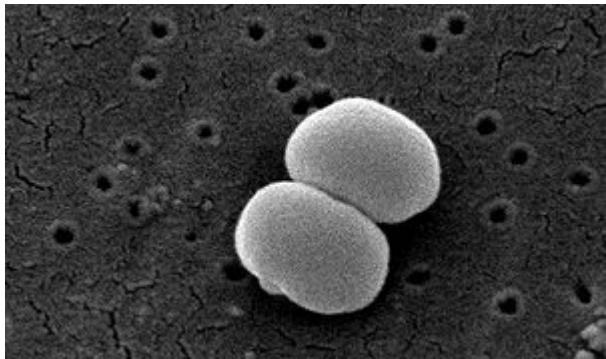


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus epidermidis*; [Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #259].

### 1. 4.3. Biofilme

Bakterien existieren, vereinfacht gesagt, in zwei verschiedenen Formen: in einer frei schwimmenden, Planktonischen und einer Adherenten. Letztere findet man auf Oberflächen, wie beispielsweise auf Silikonbrustimplantaten. Hier bilden sie sogenannte Exopolysaccharide und bilden so einen Biofilm [Pajkos et al 2003]. Biofilme bestehen aus einer dünnen Schicht, in die Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien, Algen, Pilze oder Protozoen eingebettet sind. Sie werden überwiegend in wässrigen Systemen gebildet, entweder auf einer Wasseroberfläche oder auf der Grenzfläche zu einer festen Phase.

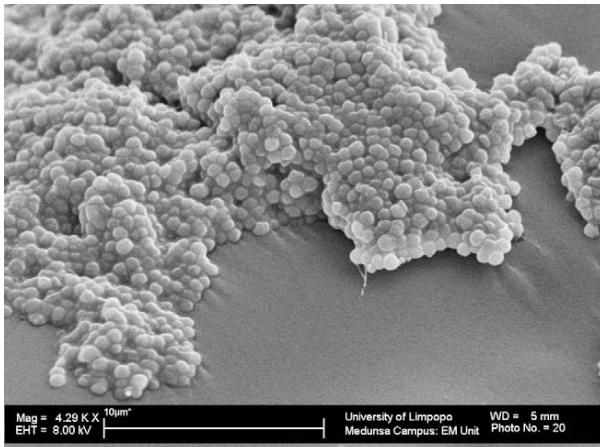


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf einem Silikonprobekörper [Van Heerden et al 2009].

Der Biofilm besteht hauptsächlich aus Wasser. Die von den verschiedenartigen Mikroorganismen ausgeschiedenen extrazellulären, polymeren Stoffen (EPS), bestehend aus Biopolymeren, wie Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, bilden in Verbindung mit Wasser Hydrogele. So entsteht eine Matrix, in der Nährstoffe und andere Substanzen gelöst sind [Hall-Stoodley et al 2005]. Die Bakterien in einem Biofilm zeigen langsamere Wachstumsraten, sie haben teilweise einen reduzierten Stoffwechsel bis hin zu Ruhestadien (VBNC – „*viable but not culturable*“) [Szewzyk et al 2003]. Bedingt durch diese eingeschränkte Aktivität nehmen sie weniger antibiotische Gifte auf. Somit ist die Antibiotikaresistenz von Bakterien in einem Biofilm erhöht.

Obwohl Biofilme in der Natur allgegenwärtig sind, wird ihre klinische Bedeutung in der Medizin häufig unterschätzt. Dies gilt insbesondere für Infektionen, denn in mehr als 60% aller bakteriellen Infektionskrankheiten schützen sich die Erreger durch die Bildung von Biofilmen vor dem Immunsystem [Fux et al 2005]. Der Biofilm hemmt die Entstehung einer Entzündungsreaktion, sowie spezifische, adaptive Immunantworten. Chemotaxis, die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose und

intrazelluläre Zerstörung, werden, wie auch andere Abwehrmechanismen des Wirts, unterdrückt. Dieser Biofilm trägt somit als „Virulenzfaktor“ zu einem erhöhten Risiko einer Infektion mit koagulasennegativen Staphylokokken bei in den Körper eingebrachten Kunststoffen bei [Quie und Belani 1987; Kloos und Lambe 1991; Schmidt et al 1998]. So stellt die mikrobielle Kontamination und Besiedlung von Kathetern, Implantaten (Abb. 8) und medizinischen Instrumenten ein schwerwiegendes Problem in der modernen Medizin dar [Donlan et al 2001]. Der zunehmende Einsatz von Kunststoffen in der Medizintechnik hat neben den Vorteilen für Diagnostik und Therapie zu einer Verschärfung der Biofilm-Problematik geführt. Besonders wegen der Affinität verschiedener Mikroorganismen, wie einigen Staphylokokken, zu den Oberflächen von Biomaterialien sind etwa die Hälfte der nosokomialen Infektionen auf chirurgische Implantate zurückzuführen [Patti et al 2005]. Abhängig von dem verwendeten Medizinprodukt und der Verweildauer kommen gram-positive, gram-negative Bakterien und Pilze als Einzel- oder Multi-Spezies-Biofilm vor. Beispiele für häufig beteiligte Erreger sind: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* [Drenkard et al 2002]. Auf Grund der erhöhten Resistenzen der Bakterien im Biofilm, u. a. durch Bildung von „Persistern“ und hoher Diversität, ist in vielen Fällen nur noch die Entfernung des Implantats der einzige Ausweg. Besonders gefährdet sind Systeme mit großen Oberflächen und Hautdurchtrittsstellen, wie z.B. Brustimplantate [Costeron et al 1999].

Moderne Techniken zur Visualisierung, wie die konfokale Mikroskopie und Gensonden zur Lokalisierung und Identifizierung von Biofilm-Organismen mittels Fluoreszenzmikroskopie, haben zu einem besseren Verständnis der Biofilme beigetragen.

## **1. 5. Ansätze zur Komplikationsvermeidung**

Es gibt verschiedene, zumeist experimentelle Methoden, Biofilme zu bekämpfen. Dabei wird häufig durch Vorbeugung versucht, es gar nicht erst zur Bildung von Biofilmen kommen zu lassen.

### **1. 5.1. Antibakterielle und antiadhäsive Wirkung von Schwermetallen**

#### **(Kupfer, Silber)**

Metalle wie Silber, Kupfer und Gold besitzen selbst in schwacher Konzentration desinfizierende und antiadhäsive Eigenschaften. Der oligodynamische Effekt, also die bakterizide Wirkung durch in Lösung gehende Metallionen, wurde erstmals von dem Botaniker Naegeli im Jahre 1893 bei Kupfer nachgewiesen; ihm fiel eine bakterizide Wirkung kleinstter Kupfermengen gegenüber gewissen pflanzlichen Substraten (Algen) auf, die man auch bei Bakterien fand [Eguchi 1989].

Kupfer, lateinisch *Cuprum*, ist ein Übergangsmetall mit dem Elementsymbol Cu und der Ordnungszahl 29. Kupfer ist für viele Mikroorganismen bereits in geringen, für Menschen unbedenklichen, Konzentrationen toxisch. Es wurden viele Studien durchgeführt, um den Mechanismus und die Einflussgrößen der desinfizierenden Wirkung vollständig zu klären. Dies ist bis heute nicht einwandfrei gelungen und weiterhin Gegenstand intensiver Forschungen [Murata 1991]; es wird davon ausgegangen, dass Kupferionen mit den Liposacchariden der Zellmembran der Mikroorganismen wechselwirken und somit letztendlich zum Zelltod führen [Dufrene et al 2003; Nan et al 2008]. Auf Grund der bekannten Eigenschaften von Kupfer wurden zwei Stationen in der Hamburger Asklepiosklinik mit Türklinken, Türplatten und Lichtschaltern aus einer speziellen Kupferlegierung ausgestattet. Damit konnte

die Keimzahl zu den Vergleichsoberflächen um 63% reduziert werden.

Silber, lateinisch *argentum*, ist ein Edelmetall mit dem Elementsymbol Ag und der Ordnungszahl 47. Silber und seine Verbindungen werden bereits seit langem gegen Mikroben eingesetzt. Es wirkt schon in geringer Konzentration und zeigt zudem eine geringe Toxizität [Clement et al 1994]. Im lebenden Organismus werden Silberionen schnell an Schwefel gebunden und werden als dunkles, schwer lösliches Silbersulfid ausgeschieden. In der Medizin wird Silbersulfadiazin, das aus Ag und Sulfadiazin entsteht, gegen Mikroben und Pilzinfektionen eingesetzt. Es ist eine unlösliche, polymere Verbindung, die Ag-Ionen langsam freisetzt. Bei schweren Verbrennungen wird Silbersulfadiazin z.B. als Salbe zur Vorbeugung gegen bakterielle Infektionen lokal angewendet [Fricker 1994]. Silber findet sich ebenso in der Beschichtung invasiver Geräte, wie endotrachealen Tuben oder Kathetern [Kollef et al 2008]. Bezuglich der Wirkung von Silber als Zellgift wird von verschiedenen Wirkmechanismen ausgegangen. Möglicherweise spielt die Zerstörung der Zellwände der Mikroorganismen durch die Blockierung von Enzymen eine entscheidende Rolle [Wells et al 1995]. Es sind auch silberresistente Bakterien bekannt [Clement et al 1994], jedoch ist das Verständnis für die Entwicklung einer solchen Resistenz noch weitgehend ungeklärt [Gupta et al 1999].

### **1. 5.2. Oberflächencharakteristika (bakterienabweisende Beschichtungen)**

Die physiko-chemischen Eigenschaften einer Oberfläche eines Biomaterials bestimmen das Potential Mikroorganismen an sich zu binden. Oberflächenrauheit und Hydrophobizität einer Oberfläche scheinen wichtig für die bakterielle Adhäsion und damit auch für die Ausbildung eines Biofilms zu sein [Wu-Yuan et al 1995; An und Friedman 1998; Rasperini et al 1998; Teughels et al 2006]. Raue Oberflächen

erhöhen die Bakterienakkumulation, wohingegen glatte Materialien mit reduzierter Oberflächenrauheit zumindest die anfängliche Biofilmbildung in vivo beschränken [An und Friedman 1998; Teughels et al 2006]. Ein weiterer Faktor für die Anhaftung von Bakterien auf Biomaterialien ist die freie Oberflächenenergie (SFE) der Bakterienstämme und der Substratoberflächen. Die freie Oberflächenenergie ist ein physikalischer Wert und wird in der Einheit mJ/cm<sup>2</sup> angegeben. Nach dem thermodynamischen Gesetz wird die freie Oberflächenenergie als entscheidender Faktor bei der Adhäsion von Bakterien betrachtet [Teughels et al 2006]. Die freie Energie nimmt zwischen den Grenzflächen von Bakterienstämmen mit hoher SFE und Substratoberflächen mit ebenfalls hoher SFE negative Werte an und bildet so die Grundlage einer spontanen Bakterienadhäsion, das gleiche gilt bei niedrigen SFE-Werten der Bakterienstämme und Substratoberflächen [Weerkamp et al 1985; Pratt-Terpstra et al 1988, 1989; Quirynen et al 1995; Teughels et al 2006]. Die SFE wird gewöhnlich mit einem Kontaktwinkel-Goniometer gemessen. Der Kontaktwinkel auf einer hydrophoben Oberfläche zu einem Wassertropfen ist größer als auf einem hydrophilen Material. Hydrophile Oberflächen besitzen auf Grund ihrer polaren Gruppen eine höhere Reaktionsfreudigkeit als hydrophobe Materialien und somit eine höhere Oberflächenergie.

Weitere Parameter, die die bakterielle Adhäsion negativ beeinflussen, sind:

- Nanostrukturierung (Lotuseffekt)
- negative Ladung
- antibiotische Beschichtung, z. B. Minocyclin-Rifampicin
- antiseptische Beschichtung, z. B. Chlorhexidin-Silbersulfadiazin
- Einbringung von Metallen, z. B. Silber, Platin, Bismut.

## **1. 6. Zielsetzung der Arbeit**

Diese Studie soll die bakterizide und antiadhäsive Wirkung von kupferbeschichteten Silikonbrustimplantaten, mit dem Ziel die mikrobielle Anhaftung zu reduzieren, untersuchen. Das langfristige Ziel ist durch den Einsatz bakterizider und antiadhäsiver Substrate die Biofilmbildung auf Brustimplantaten zu reduzieren und somit die Kapselkontrakturrate zu senken. Im Versuchsaufbau werden die Silikonprobekörper mit verschiedenen hohen Kupferkonzentrationen beschichtet. Die tatsächliche Kupferfreisetzung von der Silikonoberfläche soll ermittelt werden. Um in vivo Bedingungen zu simulieren, werden die Probekörper mit Hilfe des *Thermocyclings* künstlich gealtert. Nach unterschiedlich andauernden Alterungsintervallen werden die verschiedenen Probekörper mit *S. e.*, dem mutmaßlichen Leitkeim in der Genese der Kapselfibrose, inkubiert. Mit Hilfe einer fluorochromen Lebend-Tot-Färbung soll die Menge der adhärenten Bakterien auf der Oberfläche der Silikonprobekörper im Hinblick auf den antiadhäsiven und bakteriziden Effekt der Kupferbeschichtungen evaluiert werden. Es wird die bakterielle Adhäsion auf dem Referenzmaterial und der künstlich gealterten Probekörper in Bezug auf die Oberflächenrauheit und der freien Oberflächenenergie verglichen.

## **2. Material und Methoden**

### **2. 1. Herstellung der Probekörper**

Die Proben der Silikonbrustimplantate mit 25 mm im Durchmesser und 0,5 mm Dicke (siehe Abb. 9) wurden vorab in Aceton und Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Oberfläche der Silikonproben mit Carboxy-Gruppen modifiziert. Dies erfolgte mit 0,4 ml MMA in 100ml Wasser, aktiviert wurde die Polymerisationsreaktion durch das Fenton-Reagenz (Zusammensetzung je 100 ml Lösung: 0,4 ml Wasserstoffperoxid, 120 mg Fe-(II)-Sulfat, 100 mg Natriumpyrosulfit). Darin wurden die Prüfkörper zwei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt. Die auf der Silikonoberfläche befindlichen Carboxy-Gruppen wurden bei 5° C für 30 Minuten mit Hilfe eines wasserlöslichen Carbodiimid-Agenzes [3 mg N-Cyclohexyl-N-(2-Morpholino-) Carbodiimid-Methyl-p-Toluolsulfonat (CME- CDI) pro 1 ml Puffer (0,1 mol/l Morpholinoethansulfonsäure, pH 6, mit Natriumhydroxid)] aktiviert. Die kovalente Bindung wurde mittels deacetyliertem Chitosan erzeugt [Baumann und Kokott 2000; Hoffmann et al 2007], die Proben wurden anschließend erneut in destilliertem Wasser gereinigt.

Weil die Amino-Gruppen der äußersten Chitosan-Schicht mit Aldehyd-Gruppen reagieren würden, erzeugte man eine mehrlagige Beschichtung auf der Silikonoberfläche (siehe Abb. 10), indem man die Proben abwechselnd in Glutaraldehyd-Lösung (1 Gewichtsprozent) und einer Lösung von deacetyliertem Chitosan (3 Gewichtsprozent) eintauchte. Der Vorgang wurde solange wiederholt bis 20 Chitosan-Schichten aufgebracht waren. Nach dieser Oberflächenmodifikation wurden die Probekörper für eine Stunde in Kupferlösungen mit zwei

unterschiedlichen Konzentrationen (Kupfer-Acetat in Ethanol 32,5 mmol/l (Cu1) und Kupfer-Acetat in Ethanol 65 mmol/l (Cu2)) gebadet.

Eine Gesamtmenge von 120 Silikonproben wurde hergestellt, 40 Exemplare von jedem Material: 40 Stück kupferfrei, 40 Stück mit 32,5 mmol/l Kupfer-Acetat und 40 Stück mit 65 mmol/l Kupfer-Acetat (siehe Tab. 2). Die Probekörper wurden mit Hilfe eines lichthärtenden Bondings (Clearfil SE Bond, Kuraray Europe GmbH) in einer 24-Wellplatte fixiert.

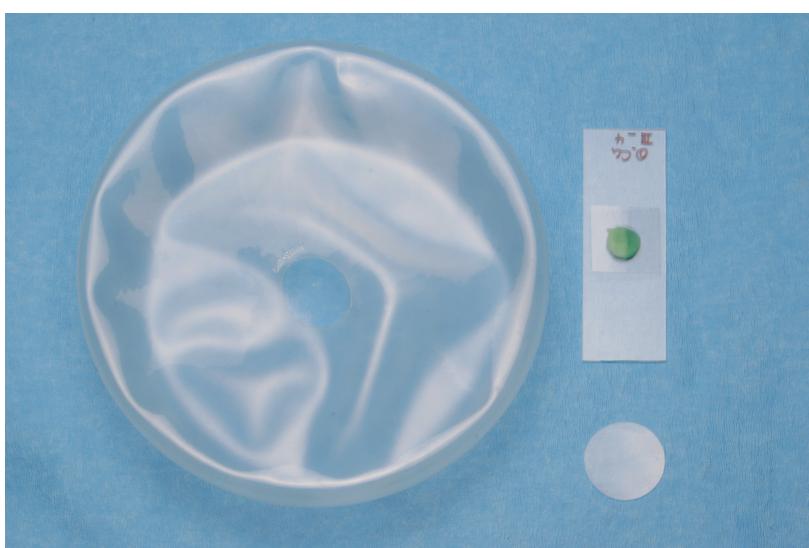


Abb. 9: Ausgestanzte Probe, isoliert und zugeschnitten auf einem Objektträger.

Material	Kupferkonzentration
Cu0 x 40 Stk.	0 mmol/Liter
Cu1 x 40 Stk.	32,5 mmol/Liter
Cu2 x 40 Stk.	65,0 mmol/Liter

Tab. 2: Überblick der Versuchsmaterialien.

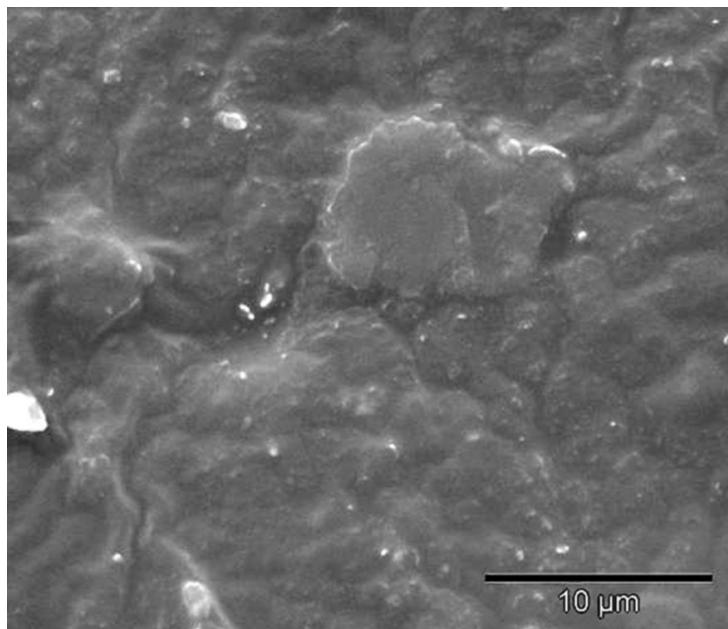


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Silikonoberfläche mit Chitosanbeschichtung.

## 2. 2. Künstliche Alterung der Silikonprobekörper

Die Alterung der Probekörper erfolgte mittels Thermocycling im Regensburger Simulator (EGO, Deutschland; siehe Abb. 12). Hierfür wurden die entsprechenden Probekörper im Wechsel für zwei Minuten in destilliertem Wasser auf 55°C erwärmt und dann für zwei Minuten auf 5°C abgekühlt. Die ersten Messungen der Rauheiten, Oberflächenenergien und bakteriellen Adhäsion erfolgte vor dem Alterungsprozess (Baseline). Die zweiten, dritten und vierten Messungen erfolgten dann nach jeweils 7, 14 und 21 Tagen im Thermocycler.



Abb. 12: Thermocycler zur künstlichen Alterung der Probekörper.

### **2. 3. Messung der Kupferfreisetzung**

Die Kupferfreisetzung wurde mit Hilfe von ICP-OES ermittelt. ICP-OES steht für „inductively coupled plasma optical emission spectrometry“, also „optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma“. Die Methode des induktiv gekoppelten Plasmas beruht auf der Verwendung eines sehr heißen (ca. 10.000 K) Argon-Plasmas zur Anregung der optischen Emission der zu analysierenden Elemente. Die Proben ( $n=3$  Cu1) wurden in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) analysiert.

### **2. 4. Messung der Oberflächenrauheit ( $R_a$ )**

Jeweils sechs Proben pro Testmaterial wurden einer Rauheitsmessung unterzogen. Dabei wurde pro Probekörper an drei verschiedenen Stellen gemessen. Dies geschah mittels Perthometer (Tastschlittenprinzip; S6P, Feinprüf Perten GmbH; Abb. 13). Die mittlere Rauheit ( $R_a$ ) ist das arithmetische Mittel des Oberflächenprofils der Testkörper. Oberflächen unter einem Wert von 0,2  $\mu\text{m}$

werden als glatt betrachtet. Unter diesem Grenzwert wird kein direkter Einfluss der Rauheit auf die bakterielle Adhäsion erwartet [Bollen et al 1997].



Abb. 13: Perthometer S6P.

## 2. 5. Bestimmung der freien Oberflächenenergie (SFE)

Die freie Oberflächenenergie (SFE) der Kunststoffe wurde mit Hilfe eines Kontaktwinkelmessgeräts (Erma, Tokyo, Japan) unter Verwendung drei unterschiedlichen Flüssigkeiten bestimmt. Es wurden hierbei entionisiertes Wasser, Ethylenglycol (Merck KgaA, Darmstadt) und Dijodmethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Mit einer automatischen Pipette (Mircolap p, Hamilton Bondaduz, Bonaduz, Schweiz) wurden je 2 µl der entsprechenden Flüssigkeit auf die Probe pipettiert. Pro Material wurden jeweils zwei Tropfen auf fünf zufällig ausgewählten Probekörpern gemessen. Durch ein optisches System (Goniometer G1, ERNA, Tokyo, Japan) wurden die auf der Probe aufgebrachten Tropfen aufgezeichnet. Aus der Höhe und der Breite der Kontaktfläche wurde der

Kontaktwinkel berechnet. Für jeden Tropfen wurden der rechte und der linke Kontaktwinkel gemessen. Aus den Kontaktwinkeln aller drei Flüssigkeiten konnte man anschließend die SFE der Kunststoffproben nach der Methode von Owens, Wendt, Rabel und Kaeble berechnen [Owens et al 1969].

## 2. 6. Kultivieren der Bakterien

Für die in den Versuchen verwendeten Kulturen wurde ein von der Haut isolierter *Staphylococcus epidermidis* - Stamm (AC-Acession: AF 270147) eingesetzt. Dieser stammt aus einem Vorversuch und wurde mittels DNA-Sequenzierung identifiziert (IDNS® version v3.1.63r14 © SmartGene 2005 Molecular Mycobacteriology). Der *Staphylococcus epidermidis* Keim wurde in einem BHI-Kultur-Medium (Bacto™ Brain Heart Infusion, BD Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA) vermehrt. Nachdem man Glycerin zugefügt hatte, lagerten die Kulturen bei -80 Grad. Vor der Durchführung der Tests wurden sie aufgetaut und bei 37 Grad über Nacht inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden zentrifugiert, anschließend wurden die Zellen entnommen und zwei Mal mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und PBS (Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) gespült. Danach wurden die Bakterien wieder in physiologische Kochsalzlösung gebracht und mit Hilfe der optischen Dichtemessung (bei 600 nm) auf einen Wert von 0,9 optischer Dichte eingestellt, was einer Bakterienkonzentration von  $10^8$  cfu (colony forming units/ml) entspricht. Zwei ml der Suspension wurden in jedes Well der 24-Wellplatten gegeben und anschließend bei 4 Grad 120 min inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde abgesaugt und schließlich wusch man die Proben zwei Mal mit 3 ml Kochsalzlösung, um nur die anhaftenden Kolonien auf den unterschiedlichen Probekörpern zurück zu behalten (siehe Abb. 14+15).

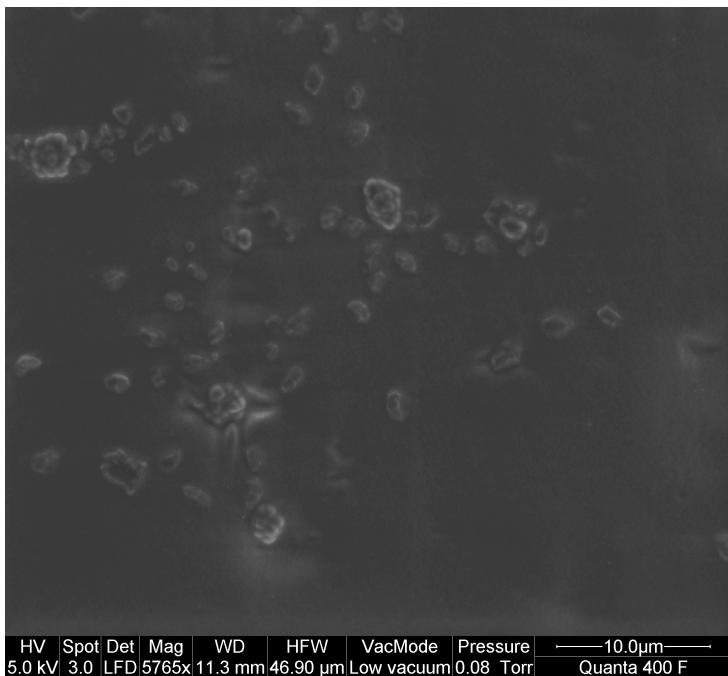


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kolonien von *S. epidermidis* verteilt auf einer unbeschichteten Silikonoberfläche.

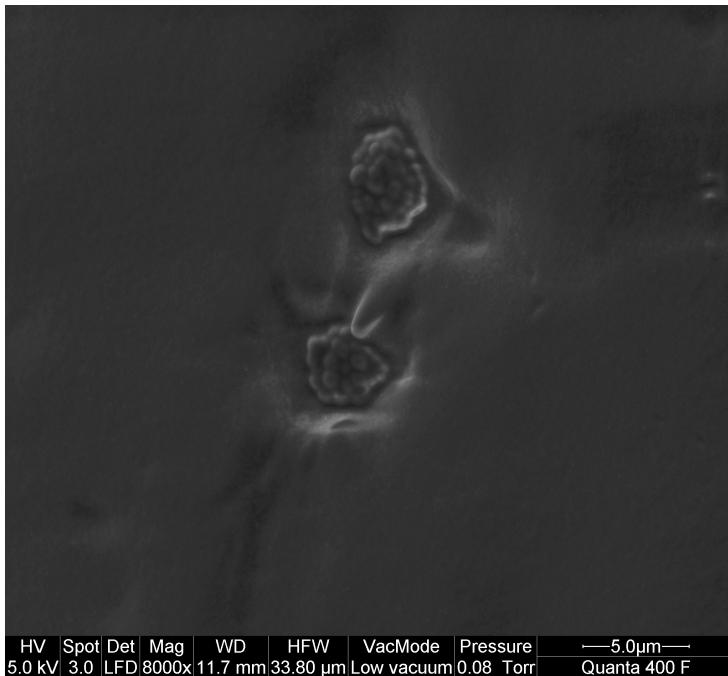


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von zwei Kolonien *S. epidermidis* auf der Silikonoberfläche eines beschichteten Probekörpers.

## **2. 7. Lebend-Tot-Färbung**

Zur fluorochromen Lebend-Tot-Färbung und der damit verbundenen Bestimmung der Verhältnisses von aktiven (lebenden) und inaktiven (toten) Bakterien wurde der LIVE/DEAD *BacLight bacterial viability kit* (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet [Bürgers et al 2010]. Für die Färbelösung wurden 6 µl der Komponente A (SYTO 9) und 6 µl der Komponente B (Propidiumjodid) in 5 ml destilliertem Wasser verdünnt. Von der Färbelösung wurden jeweils 500 µl in jedes Well gegeben. Diese wurden bei Raumtemperatur und im Dunklen für 15 Minuten inkubiert. Die Färbelösung wurde vorsichtig abgesaugt und die Proben anschließend einmal mit PBS gewaschen. Jede Probe wurde vorsichtig von der Wellplatte entfernt und auf einen Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgelegt, mit einem Tropfen der Komponente C (Mounting Oil) bedeckt und mit einem Deckglas (Menzel) fixiert (siehe Abb. 9). Die Proben wurden bei 4°C und bei absoluter Dunkelheit bis zur weiteren Auswertung (maximal 12 Stunden nach Färbung) gelagert.

## **2. 8. Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Beurteilung der fluoreszenten Emission der Lebend-Tot-Färbung wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) in Verbindung mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.6 (Carl Zeiss Microimaging GmbH) verwendet (Abb. 16).



Abb. 16: Fluoreszenzmikroskop.

Fünf Fluoreszenzbilder ( $100 \times 150 \mu\text{m} = 0,015 \text{ mm}^2$ ) von willkürlich gewählten Stellen wurden pro Probekörper mit einer Digitalkamera (Axiocam MRC5; Carl Zeiss Microimaging GmbH) fotografiert. Avitale (rote) und vitale (grüne) Bakterien wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfiltern (FITC/F41-054 und Alexa594/F41-027; AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) im selben mikroskopischen Feld betrachtet und fotografiert. Die beiden Bilder wurden dann vollautomatisch zu einem Lebend-Tot-Bild kombiniert (siehe Abb. 17A bis 17C).

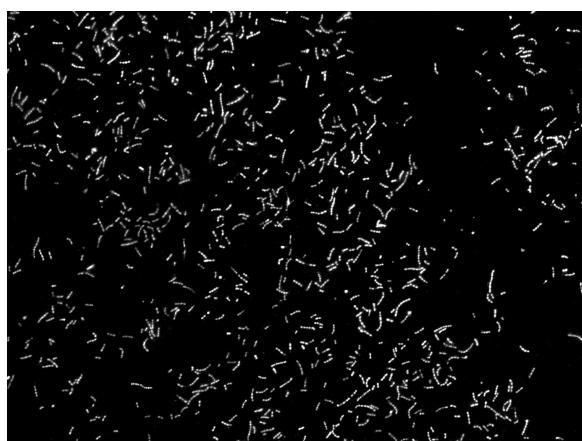


Abb. 17A: Fluoreszenzaufnahme mit FITC-Filter zur Darstellung der vitalen Bakterien ( $100 \times 150 \mu\text{m}$ ).



Abb. 17B: Fluoreszenzaufnahme mit Alexa 594-Filter zur Darstellung der avitalen Bakterien ( $100 \times 150 \mu\text{m}$ ).

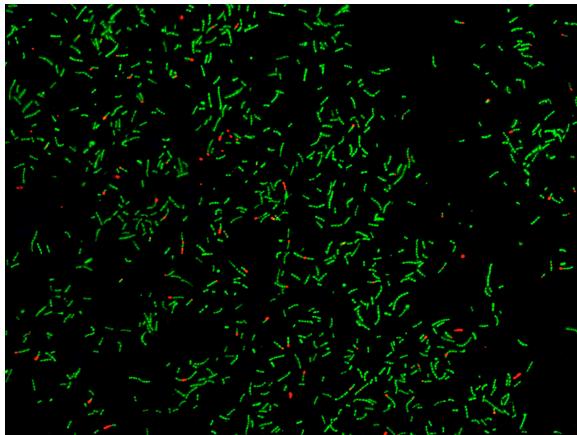


Abb 17C: Digital kombiniertes Lebend-Tot-Bild; Differenzierung von vitalen (grünen) und avitalen (roten) Bakterien ( $100 \times 150 \mu\text{m}$ ).

## 2. 9. Quantifizierung der adhärenten Mikroorganismen

Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Optimas 6.2 (Meyer Instruments, Houston, USA) wurde die mit Bakterien bedeckte Fläche jedes untersuchten Areals als Anteil in Prozent an der gesamten vermessenen Fläche berechnet. Hierzu wurden die getrennten Orginalaufnahmen (Tot/Rot bzw. Lebend/Grün, entsprechend den Abbildungen 17A und 17B) der Fluoreszenzmikroskopie für jedes untersuchte Areal verwendet.

## 2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS 15.0 für Windows (SPSS Corp., Chicago, USA). Zur statistischen Darstellung der ermittelten Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Die Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung für die Rauheiten, Oberflächenenergien und die bakterielle Adhäsion erfolgte über *One-way ANOVA* zwischen jeweils zwei Stichproben ( $\alpha=0,05$ ).

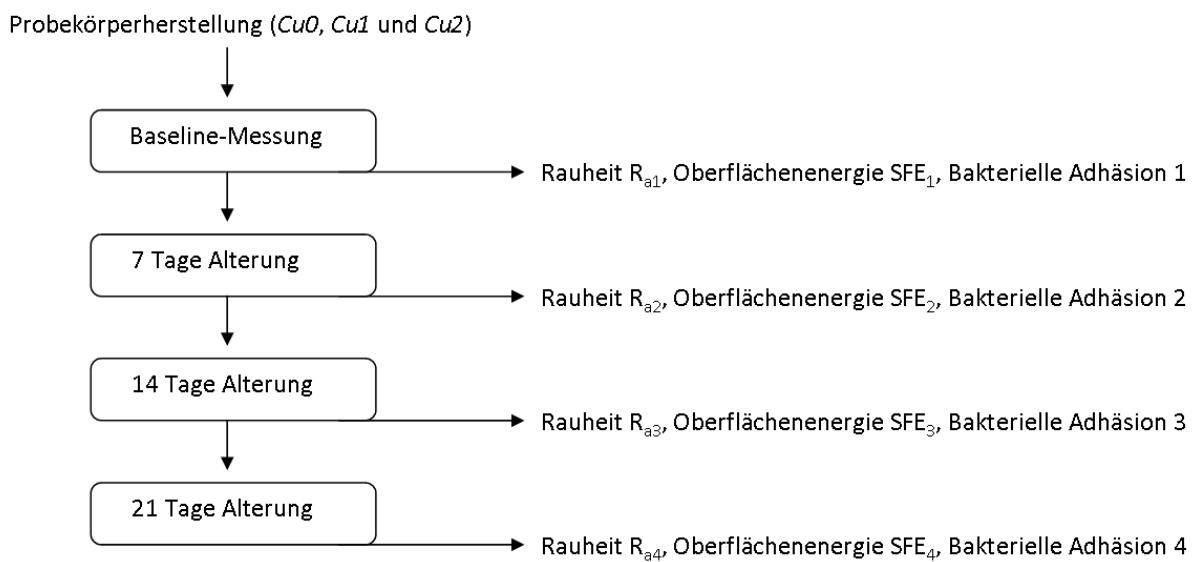


Abb. 18: Versuchsdesign im Überblick.

### 3. Ergebnisse

#### 3. 1. Ergebnisse der Messung der Kupferfreisetzung

Die Messung des nach acht Wochen in Lösung gegangenen Kupfers ergab eine Menge von 2,11 mg/l mit einer Standardabweichung von 0,63; n=3.

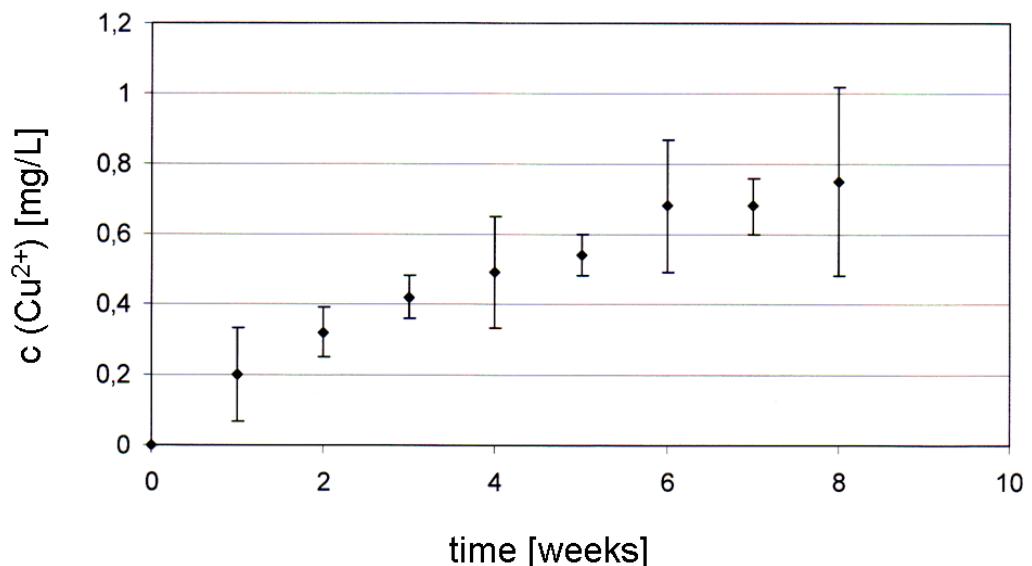


Abb. 19: Kupferfreisetzung von Cu1 (= 32,5 mmol/l) in NaCl 0,9% über acht Wochen.

### **3. 2. Ergebnisse der Oberflächenrauheitsmessungen ( $R_a$ )**

Die Ergebnisse der Perthometermessungen, vor und nach künstlicher Alterung, sind in Tabelle 3 dargestellt. Die statistische Bewertung mittels *One-way ANOVA* zeigte weder im Vergleich der verschiedenen Kupferkonzentrationen, Cu0/Cu1/Cu2, noch im Vergleich der verschiedenen Alterungsstufen, Baseline/7 Tage Alterung/14 Tage Alterung/21 Tage Alterung, statistisch signifikante Unterschiede ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=60$ ).

Probekörper	Baseline	Nach 7 Tagen	Nach 14 Tagen	Nach 21 Tagen
<b>Cu0</b>	0.08 (0.04/0.08)	0.08 (0.08/0.11)	0.08 (0.08/0.08)	0.08 (0.08/0.11)
<b>Cu1</b> [32,5 mmol/L]	0.08 (0.04/0.08)	0.08 (0.08/0.08)	0.08 (0.08/0.08)	0.08 (0.08/0.11)
<b>Cu2</b> [65 mmol/L]	0.08 (0.08/0.08)	0.08 (0.08/0.08)	0.08 (0.08/0.11)	0.08 (0.08/0.11)

Tab. 3: Oberflächenrauheiten (Mittelwerte und Standardabweichung;  $\mu\text{m}$ ) von drei verschiedenen Silikonmaterialien mit verschiedenen Kupfer-Beschichtungen vor und nach künstlicher Alterung.

### **3. 3. Ergebnisse der Messungen der freien Oberflächenenergie (SFE)**

Die Ergebnisse der Goniometermessungen, vor und nach künstlicher Alterung, sind in Tabelle 4 dargestellt. Entsprechend der Rauheitswerte zeigte die statistische Bewertung der SFE mittels *One-way ANOVA* auch hier im Vergleich der verschiedenen Kupferkonzentrationen, Cu0/Cu1/Cu2, und im Vergleich der verschiedenen Alterungsstufen, Baseline/7 Tage Alterung/14 Tage Alterung/21 Tage Alterung, statistisch keine signifikanten Unterschiede ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=60$ ). Bei allen drei Silikonoberflächen ist die Oberflächenenergie vor

der Alterung am höchsten, nimmt dann nach sieben Tagen Alterung ab und verbleibt auf niedrigem Niveau, wobei die beobachteten Unterschiede lediglich tendenziell auffallen, aber statistisch nicht signifikant sind.

<b>Probekörper</b>	<b>Baseline</b>	<b>Nach 7 Tagen</b>	<b>Nach 14 Tagen</b>	<b>Nach 21 Tagen</b>
<b>Cu0</b>	12,2 (11,5/0,7)	10,7 (10,5/0,2)	11,2 (10,9/0,3)	10,9 (10,8/0,1)
<b>Cu1</b> [32,5 mmol/L]	14,5 (10,7/3,8)	9,6 (9,5/0,1)	10,5 (10,0/0,5)	10,9 (10,7/0,2)
<b>Cu2</b> [65 mmol/L]	11,3 (11,0/0,3)	10,4 (10,2/0,2)	10,5 (10,3/0,2)	10,1 (9,8/0,3)

Tab. 4: Oberflächenenergie (totale Oberflächenenergie, disperse Komponente, polare Komponente; mJ/m<sup>2</sup>) von drei verschiedenen Silikonmaterialien mit verschiedenen Kupferbeschichtungen vor und nach künstlicher Alterung.

### 3. 4. Bakterielle Adhäsion

#### 3. 4.1. Fluoreszenzaufnahmen

Die Abbildungen 20 bis 22 sind Beispiele für die angefertigten Fluoreszenzaufnahmen. Die Differenzierung zwischen avitalen (roten) und vitalen (grünen) Staphylokokken konnte auf allen Aufnahmen eindeutig vorgenommen werden. Die einzelnen Bakterien konnten ebenfalls gut voneinander abgegrenzt werden. Nach der definierten Inkubation mit *S. e.* von 120 Minuten zeigten sich auf allen Probekörpern Monolayer von einzelnen Bakterien und Mikrokolonien (initiales Stadium der Biofilmbildung). Abbildung 20 zeigt insgesamt eine hohe Menge von

adhärenten Staphylokokken. Der Anteil der toten Bakterien ist eher gering. Im Vergleich hierzu zeigen die Abbildungen 21 und 22 weniger adhäsente Keime (antiadhäsive Wirkung), dafür einen höheren Anteil toter Keime (bakterizider Effekt).

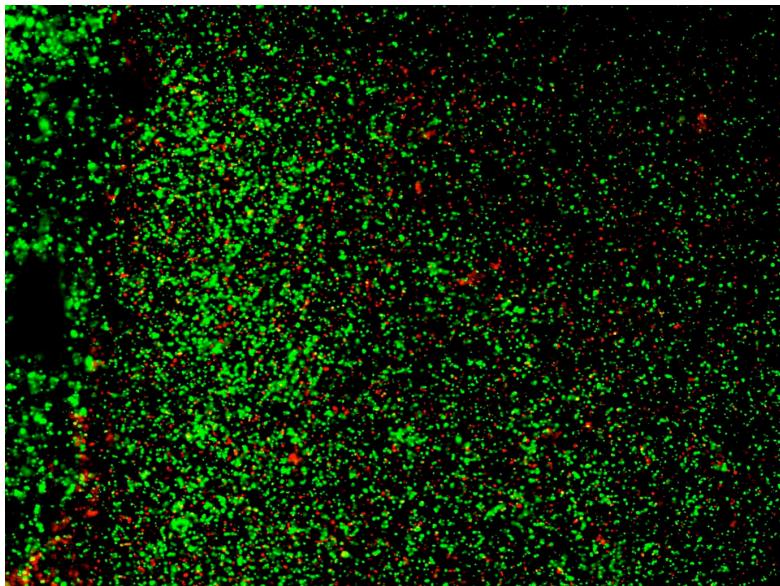


Abb. 20: Lebend-Tot-Fluoreszenzaufnahme der Silikonoberfläche Cu0 nach Inkubation mit S. e. für 120 Minuten. Insgesamt zeigt sich eine hohe Menge adhärenter Keime mit einem niedrigen Anteil avitaler Keime.

- Avitale/tote Keime: rot
- Vitale/lebend Keime: grün.

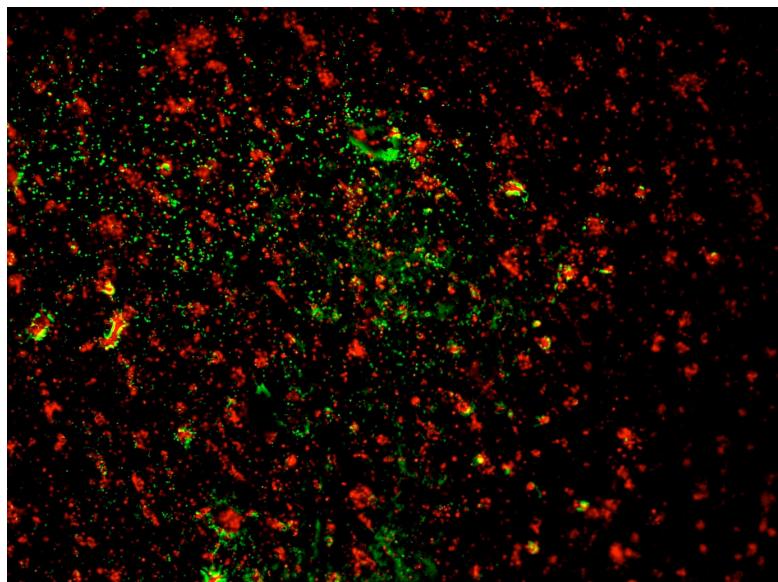


Abb. 21: Lebend-Tot-Fluoreszenzaufnahme der Silikonoberfläche Cu1 nach Inkubation mit *S. e.* für 120 Minuten. Insgesamt zeigt sich eine mittlere Menge adhärenter Keime mit einem höheren Anteil avitaler Keime.

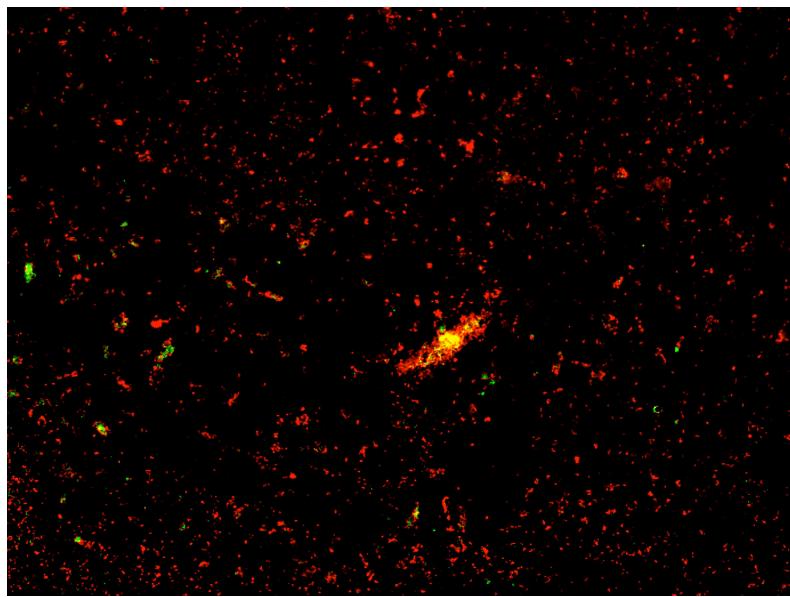


Abb. 22: Lebend-Tot-Fluoreszenzaufnahme der Silikonoberfläche Cu2 nach Inkubation mit *S. e.* für 120 Minuten. Insgesamt zeigt sich eine niedrige Menge adhärenter Keime mit einem hohen Anteil avitaler Keime.

### **3. 4.2. Quantifizierung der Gesamtmenge der adhärenten Keime (antiadhäsiver Effekt)**

Tabelle 5 und Abbildung 23 zeigen die Gesamtmenge (avitale und vitale Keime) der adhärenten Staphylokokken auf den drei getesteten Silikonmaterialien als Prozentwert der gesamten Probekörper-Oberfläche. Die stärkste Besiedelung fand sich auf den kupferfreien Silikonprobekörpern nach 7 Tagen Alterung (Mittelwert: 25,9%), die schwächste Besiedelung auf den Cu1-Oberflächen vor der Alterung (Mittelwert 1,2%). Die Menge der adhärenten Keime auf den kupferfreien Silikonprobekörpern (Cu0) ist – unabhängig vom Grad der Alterung – signifikant höher als auf den Silikon-Oberflächen mit Kupferbeschichtungen (Cu1 und Cu2) ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=32$ ). Zwischen den Werten von Cu1 und Cu2 – unabhängig vom Grad der Alterung – ist statistisch kein signifikanter Unterschied zu erkennen ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=16$ ). Vergleicht man die verschiedenen Alterungsstufen innerhalb eines Materials können bei allen drei Materialien keine signifikanten Unterschiede zwischen Baseline, Alterung nach 7 Tagen, Alterung nach 14 Tagen und Alterung nach 21 Tagen abgeleitet werden ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=6$  pro Material).

Probekörper	Baseline	Nach 7 Tagen	Nach 14 Tagen	Nach 21 Tagen
<b>Cu0</b>	23.5 (11.9)	25.9 (17.9)	23.6 (10.9)	18.4 (18.3)
<b>Cu1</b> [32,5 mmol/L]	1.2 (0.9)	4.1 (3.8)	3.2 (1.9)	4.2 (3.2)
<b>Cu2</b> [65 mmol/L]	2.5 (2.0)	2.1 (1.6)	3.4 (3.1)	2.8 (2.0)

Tab. 5: Gesamtmenge der adhärenen Bakterien (avitale und vitale) nach Inkubation in S. e.-Suspension (Mittelwerte und Standardabweichung).

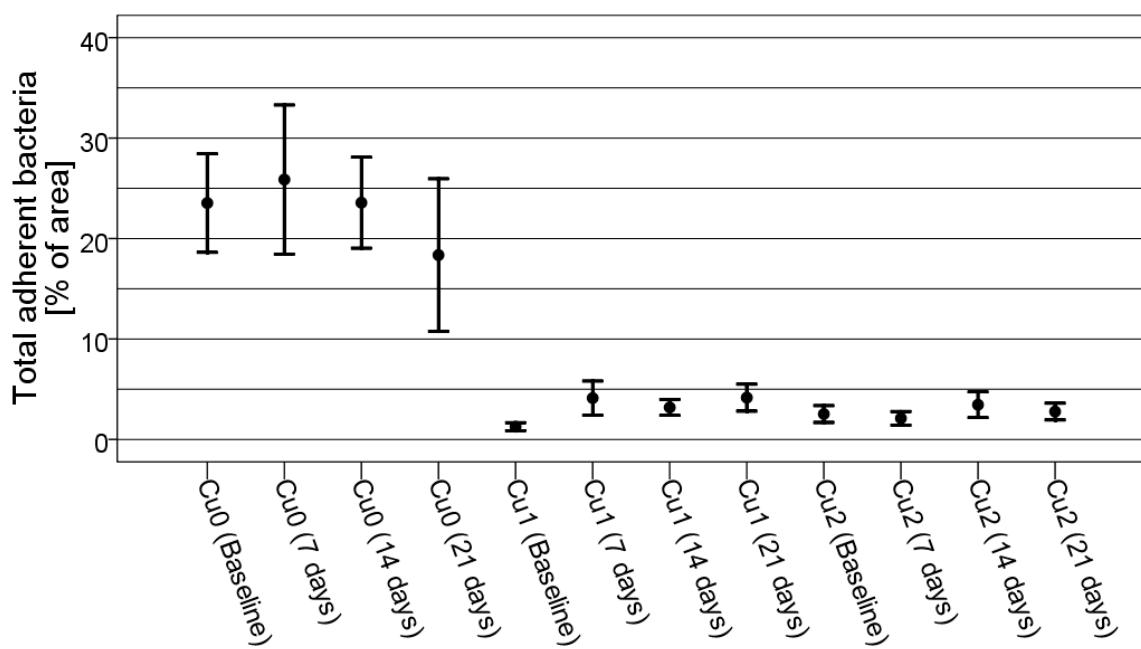


Abb. 23: Gesamtmenge der adhärenen Bakterien (avitale und vitale) nach Inkubation in Bakteriensuspension (Mittelwerte und Standardabweichung).

### **3. 4.3. Anteil der avitalen Bakterien an der Gesamtmenge der adhärenten**

#### **Keime (bakterizider Effekt)**

Tabelle 6 und Abbildung 24 zeigen das Verhältnis von toten/avitalen Keimen zu der Gesamtmenge der adhärenten Keime, bzw. den Anteil der abgetöteten Staphylokokken. Dieser Anteil toter Bakterien ist auf den kupferfreien Probekörpern (Cu0), unabhängig vom Alterungsgrad, deutlich geringer, ungefähr 3 bis 4-mal, als auf den kupferbeschichteten Oberflächen (Cu1 und Cu2). Allgemein sind die Werte für Cu2 tendenziell höher als für Cu1, allerdings ohne statistische Signifikanz ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=16$ ). Bei den Vergleichen zwischen den verschiedenen Alterungsstufen innerhalb der drei Materialien traten keine statistischen Unterschiede auf ( $P > 0,05$  für alle Vergleiche;  $n=6$  pro Material).

Probekörper	Baseline	Nach 7 Tagen	Nach 14 Tagen	Nach 21 Tagen
<b>Cu0</b>	0.09 (0.05)	0.15 (0.06)	0.15 (0.07)	0.21 (0.16)
<b>Cu1</b> [32,5 mmol/L]	0.55 (0.15)	0.56 (0.12)	0.53 (0.14)	0.61 (0.13)
<b>Cu2</b> [65 mmol/L]	0.75 (0.14)	0.76 (0.14)	0.79 (0.16)	0.69 (0.17)

Tab. 6: Anteil der avitalen Bakterien an der Gesamtmenge der adhärenten Bakterien nach Inkubation in Bakteriensuspension (Mittelwerte und Standardabweichung).

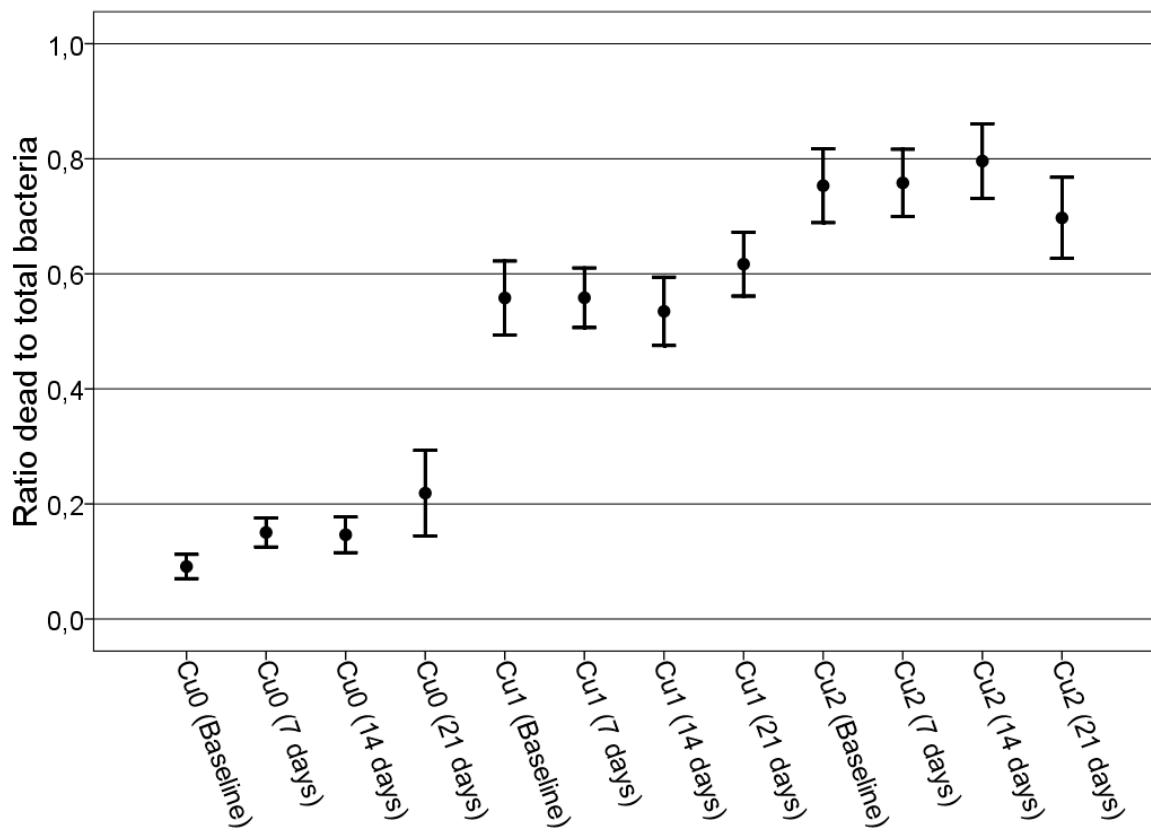


Abb. 24: Anteil der avitalen Bakterien an der Gesamtmenge der adhärenten Bakterien nach Inkubation in Bakteriensuspension (Mittelwerte und Standardabweichung).

## 4. Diskussion

*Staphylococcus epidermidis* ist Teil der natürlichen Mikroflora der Haut und der endogenen Flora der Brust [Takayanagi et al 2004]. Das Bakterium spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontamination von Silikonbrustimplantaten und wurde daher in vielen Studien über Bakterienadhäsion auf Implantatmaterialien verwendet [Neel et al 2005]. In der Tat werden Biomaterialien-assoziierte Infektionen nur durch wenige Bakterienspezies verursacht. Hierbei nimmt *S. e.* die Vorreiterrolle ein [Freedman und Jackson 1989; Hedin 1993; Dobke et al 1995; Embrey et al 1999; Siggelkow et al 2003; Heidenau et al 2005; Neel et al 2005; Hoffmann et al 2007; Schreml et al 2007; Tang et al 2007]. Ähnlich wie bei vielen anderen polymeren Biomaterialien sind Silikonelastomere anfällig für die Adhäsion von Bakterien und der damit einhergehenden Bildung von Biofilmen [Stickler und McLean 1995, McBride et al 2009]. Diese komplexen, mikrobiellen Beläge scheinen hauptursächlich für den chronischen Entzündungsprozess des periimplantären Gewebes zu sein und gelten somit als Stimulus für die Bildung fibrösen Gewebes [Pajkos et al 2003]. Die bakterielle Kontamination mit anschließender Biofilmbildung ist mutmaßlich verantwortlich für die frühe und späte Infektionen von Silikonbrustimplantaten [Embrey et al 1999; Schreml et al 2007] und damit auch für die Entstehung von Kapselkontrakturen [Freedman und Jackson 1989; Hedin 1993; Dobke et al 1995; Embrey et al 1999; Siggelkow et al 2003; Heidenau et al 2005; Hoffmann et al 2007; Schreml et al 2007; Tang et al 2007]. Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Grad einer Kapselfibrose und der Quantität der bakteriellen Besiedelung einer Implantatoberfläche [Virden et al 1992; Pajkos et al 2003; Prantl et al 2007; van Heerden et al 2009]. Der Versuch der Reduzierung der bakteriellen Adhäsion durch bakterizide und antiadhäsive

Beschichtungen ist sehr wahrscheinlich ausschlaggebend für die Vermeidung von Infektionen von Brustimplantaten und damit auch von Kapselfibrosen [Hedin 1993; Embrey et al 1995; Hoffmann et al 2007]. Ein entscheidender Faktor für die Langlebigkeit von Implantaten ist die Kontrolle der bakteriellen Adhäsion und der Biofilmbildung. Die Entwicklung von Materialien mit antiadhäsiven und bakteriziden Eigenschaften ist demnach anzustreben, um die komplikationslose Überlebensrate der Brustimplantate zu erhöhen [Virden et al 1992; Pajkos et al 2003; van Heerden et al 2009]. Frühere Studien belegten die bakterizide Wirkung einer neuartigen Kupferbeschichtung auf Silikonbrustimplantaten [Gosau et al 2010]. Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchte diese Arbeit die Wirkung von Kupferbeschichtungen mit verschiedenen hohen Konzentrationen im Hinblick auf die Anhaftung und die Überlebensfähigkeit von S. e.. Kupfer wurde als antibakterieller Zusatz gewählt, da Kupferionen den besten Kompromiss zwischen antibakterieller Wirksamkeit und Zytotoxizität bieten [Heidenau et al 2005]. Folglich erwiesen sich Kupferionen als ideal, um Implantatoberflächen mit antibakteriellen Eigenschaften zu modifizieren, ohne dabei deutlich an Biokompatibilität einzubüßen [Macadam et al 2004; Tham et al 2005; Nan et al 2008]. Die toxische Wirkung von Kupfer auf Bakterien scheint wie folgt: Nach initialer, bakterieller Anhaftung auf den Implantatoberflächen durch elektrostatische und physikalische Kräfte werden die Liposaccharide der Zellmembran der Bakterien durch Wechselwirkungen mit dem Kupfer verändert. Damit wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht und die sich daraus ergebende, reduzierte Dichtigkeit für die intrazellulären Bestandteile, insbesondere für K<sup>+</sup>-Ionen, zieht eine Stoffwechselstörung und damit den Zelltod nach sich [Dufrene et al 2003; Nan et al 2008].

Maßgebende Faktoren für die bakterielle Adhäsion sind die Oberflächeneigenschaften eines Materials, im Speziellen die freie

Oberflächenenergie (SFE) und die Oberflächenrauheit ( $R_a$ ). Im Versuch wurden die beschichteten Silikonproben und das unbeschichtete Referenzmaterial anhand der SFE und der  $R_a$  vor und nach verschiedenen langen Zyklen der künstlichen Alterung definiert. Es wurden die Zusammenhänge zwischen den veränderten Oberflächeneigenschaften infolge des künstlichen Alterungsprozesses und der daraus resultierenden *in vitro* Adhäsion von *S. e.* ermittelt.

Die Implantate wurden einem künstlichen Alterungsprozess mittels *Thermocycling* unterzogen, welches eine gängige Methode zur Simulation des natürlichen Alterungsprozesses der Implantate ist [Kolbeck et al 2006; Rosentritt et al 2006; Hahnel et al 2008; Bürgers et al 2009a]. Nach verschiedenen langen Alterungszyklen wurden die Proben mit einem von der menschlichen Haut isolierten *S. e.* inkubiert, um die natürliche Kontamination der Silikonproben für diese *in vitro* Studie zu imitieren, diese Methode bewährte sich bereits in vorhergehenden Studien [Broekhuizen et al 2007; Kodjikian et al 2008; Gosau et al 2010]. Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse, dass sich die künstliche Alterung nicht auf die Oberflächenrauheit und die freie Oberflächenenergie der Silikonproben ausgewirkt hat. Ein zu erwartendes Ergebnis bei den künstlich gealterten Implantaten wäre eine erhöhte Oberflächenrauheit gewesen, welche wiederum zu einer verstärkten bakteriellen Besiedelung der Implantatoberflächen geführt hätte [Yip et al 2004; Tari et al 2007; Zanin et al 2008]. Die konstanten Eigenschaften der Silikonprobekörper in Bezug auf SFE und  $R_a$  können wahrscheinlich auf die spezielle chemische Zusammensetzung und die Flexibilität des Materials zurückgeführt werden [Hahnel et al 2009]. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass nicht alle Oberflächendefekte und -unregelmäßigkeiten durch die hier angewandte Profilometrie erkannt werden können.

Es existieren nach wie vor widersprüchliche Aussagen dazu, ob Oberflächen mit hohen SFE-Werten die Quantität der anhaftenden Mikroorganismen reduzieren oder erhöhen [Busscher et al 1984 und 1986; Pratt-Terpstra et al 1988; Quirynen und Bollen 1995; An und Friedmann 1998]. Die Anhaftung von Mikroorganismen auf Oberflächen ist nicht nur von der SFE des Substrats, sondern auch von der SFE des Bakterienstamms abhängig [Busscher et al 1984 und 1986; Pratt-Terpsta et al 1988; Weerkamp et al 1988; Bürgers et al 2009b]. Im thermodynamischen Modell der mikrobiellen Adhäsion bevorzugen Bakterien mit niedriger SFE scheinbar Oberflächen mit ebenfalls niedriger SFE, wohingegen Bakterien mit hoher SFE eine stärkere Affinität zu Substratoberflächen mit hohen SFE-Werten haben [Busscher et al 1986; Weerkamp et al 1985; Quirynen und Bollen 1995; Morra und Cassinelli 1997; An und Friedmann 1998; Teughels et al 2006]. Der durchschnittliche SFE-Wert für Silikon liegt bei ca. 20mJ/m<sup>2</sup> [Pereni et al 2006; Hulterström et al 2008; Hauser et al 2009], unsere Messungen ergaben einen etwas niedrigeren Mittelwert von 11mJ/m<sup>2</sup>. Die verschiedenen Kupferbeschichtungen hatten in unseren Versuchen keine merklichen Änderungen der SFE zur Folge. Ebenso wurden die Werte durch die künstliche Alterung nicht beeinflusst. Der in der Literatur zu findende Mittelwert für *S. e.* von 60 mJ/m<sup>2</sup> ist identisch zu unserem Ergebnis, welches auch auf Grund des hydrophilen Charakters von *S. e.* zu erwarten ist. [Barton et al 1996; Morra und Cassinelli 1997]. Die große Differenz der SFE-Werte zwischen dem der Silikonoberflächen und dem der Bakterien deutet auf eine eher geringe Adhäsion hin [Pereni et al 2006; Bürgers et al 2009b]. Silikon zeigt also nicht nur auf Grund seiner niedrigen SFE-Werte gute physikalische Eigenschaften im Hinblick auf die unerwünschte Anhaftung von *S. e.*, sondern auch wegen seiner Hydrophobizität. Es ist zu erwähnen, dass *S. e.* nur eines der Bakterien ist, das bei der komplexen Biofilmbildung auf Silikonimplantaten beteiligt ist. Dieser Fakt

limitiert die Aussagekraft dieser in vitro Studie zu einem gewissen Grad. Im Gegensatz zu unserem Ziel dieser Arbeit, die Bakterienadhäsion zu reduzieren, gibt es Versuche, durch Plasmabehandlung die Biokompatibilität von Silikonimplantaten zu erhöhen, um die Zellaffinität zu verbessern; hieraus resultieren Oberflächen mit höheren SFE und  $R_a$ -Werten [Hauser et al 2009].

Die Messung der Freisetzung von Kupferionen der beschichteten Silikonoberfläche zeigte eine kontinuierliche Abgabe über einen Zeitraum von acht Wochen. Natürlich wäre eine längere Beobachtung der Kupferfreisetzung wünschenswert gewesen, es kann aber davon ausgegangen werden, dass diese bis in die 20. Woche andauern würde. Diese Annahme ist begründet auf der Anzahl von Chitosan-Schichten, mit der die Proben behandelt wurden. Die Freisetzung von Kupferionen könnte ab dem Zeitpunkt der Implantation sowohl gegen frühe und, durch die anhaltende Abgabe, auch gegen späte Infektionen der Brustimplantate wirksam sein.

In dieser Studie wurde die antibakterielle und antiadhäsive Wirkung von Kupferionen nur für die initiale, bakterielle Adhäsion untersucht. Nachteilig ist sicherlich, dass die Möglichkeit besteht, dass die überlebenden Bakterien wachsen und einen Biofilm bilden. Es besteht die Annahme, dass es einfacher und wirkungsvoller ist, direkt zu Beginn, während die Bakterien fast ausschließlich in der planktonischen Form vorliegen, vorzugehen, als gegen die komplexen Biofilme, die bekannt für ihre Widerstandsfähigkeit gegen die toxische Wirkung von Metallen sind [Booth et al. 2011].

Es ist zu erwähnen, dass, obwohl Kupferionen giftig für Bakterien sind, einige Bakterienstämme Resistenzmechanismen gegen Kupfer entwickelt haben. Die erworbene Kupferresistenz ist sowohl für gram-positive als auch für gram-negative Bakterien beschrieben worden [Brown et al 1995; Hasman und Aarestrup 2002; Hasman et al 2006], zum Beispiel für einen vom Menschen isolierten *Enterococcus*

*faecium* und *Enterococcus faecalis* [Hasman und Aarestrup 2002].

Die exakte Erfassung der anhaftenden Staphylokokken und die notwendige Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde im Versuch durch die Fluoreszenzfärbung ermöglicht [Decker 2001]. Im Baclight staining wurden, in Bezug auf die Gesamtmenge der erfassten Bakterien, signifikant mehr adhäsive Mikroorganismen auf dem unbeschichteten Referenzmaterial nachgewiesen als auf den kupferbeschichteten Probekörpern. Zudem wurden wesentlich mehr membrangeschädigte und damit tote Zellen auf den kupferbeschichteten Proben gefunden als auf dem Referenzmaterial. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den mit verschiedenen Kupferkonzentrationen beschichteten Silikonproben aufgezeigt werden. Und auch wenn keine signifikante, bakterizide Wirkung für höhere Kupferkonzentrationen gezeigt werden konnte, war eine Tendenz für eine konzentrationsabhängige, bakterizide Wirkung von höheren Kupferkonzentrationen erkennbar.

Leider sind die antibakteriellen Testmethoden wenig standardisiert und die verschiedenen Methoden zur Quantifizierung antimikrobieller Aktivität sind bekannt dafür, sehr unterschiedliche Ergebnisse zu liefern [Kim et al 2008]. Einige Autoren testeten die Empfindlichkeit von *S. e.* gegenüber verschiedenen Antibiotika auf Silikonoberflächen mit Standard-Disc-Diffusionstests [van Heerden et al 2009]. Diese Standardmethoden erwiesen sich als ungeeignet für die Evaluation des antimikrobiellen Effekts metallbeschichteter Biomaterialien, da diese schlecht in Wasser löslich sind und keine Kupferionen in das Kulturmedium freisetzen. Das Fehlen der typischen Inhibitionszonen bei den Agar-Diffusionstests kann als Ausbleiben der antibakteriellen Wirkung fehlinterpretiert werden [Bechert et al 1999; Alt et al 2004]. Das Kultivieren auf Agar-Platten ist ungeeignet, da nur lebende, kultivierbare Bakterien erfasst werden. Nicht-kultivierbare Bakterien bleiben hier

unberücksichtigt; trotzdem besitzen sie eine hohe Membranintegrität und sind potentielle Träger für Infektionen [Boulos et al 1999, Decker 2001]. So diente uns die Fluoreszenzmikroskopie zur direkten Überwachung der bakteriziden und antiadhäsiven Wirkung von kupferbeladenem Substrat auf der Oberfläche der Probekörper [Bürgers et al 2009b und 2010].

## **5. Zusammenfassung**

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die neuartige Kupferbeschichtung von Silikonbrustimplantaten positive antiadhäsive und antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus epidermidis* in vitro hat. Wir fanden mehr anhaftende Bakterien auf dem Referenzmaterial als auf dem Kupferbeschichteten, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Kupferkonzentrationen. Obwohl keine wesentliche bakterizide Wirkung für höhere Kupferkonzentrationen nachgewiesen werden konnte, war eine Tendenz hinsichtlich eines konzentrationsabhängigen, bakteriziden Effekts für höhere Konzentrationen erkennbar. Da die Kupferionen nach und nach freigesetzt wurden, konnten wir einen antiadhäsiven und antibakteriellen Langzeiteffekt auf S. e. nachweisen. Die intensive, künstliche Alterung der Probekörper hatte keine Veränderung der Oberflächeneigenschaften zur Folge und damit auch keinen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion.

Abschließend ist anzunehmen, dass die Kupferbeschichtungen der Silikonoberflächen frühe und späte Infektionen von Brustimplantaten reduzieren und somit auch die Zahl der damit einhergehenden Kapselfibrosen vermindern können.

## 6. Literatur

1. Ahn CY, Shaw WW. Regional silicone-gel migration in patients with ruptured implants. *Ann Plast Surg.* 1994 Aug;33(2):201-8.
2. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R. In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Nov;48(11):4084-8.
3. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998 Fall;43(3):338-48.
4. Baker JL Jr, Chandler ML, LeVier RR. Occurrence and activity of myofibroblasts in human capsular tissue surrounding mammary implants. *Plast Reconstr Surg.* 1981 Dec;68(6):905-12.
5. Barker DE, Retsky MI, Schultz S. "Bleeding" of silicone from bag-gel breast implants, and its clinical relation to fibrous capsule reaction. *Plast Reconstr Surg.* 1978 Jun;61(6):836-41.
6. Barton AJ, Sagers RD, Pitt WG. Measurement of bacterial growth rates on polymers. *J Biomed Mater Res.* 1996 Oct;32(2):271-8.
7. Baumann H, Kokott A. Surface modification of the polymers present in a polysulfone hollow fiber hemodialyser by covalent binding of heparin or endothelial cell surface heparan sulfate: flow characteristics and platelet adhesion. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2000;11(3):245-72.
8. Bechert T, Böswald M, Lugauer S, Regenfus A, Greil J, Guggenbichler JP. The Erlanger silver catheter: in vitro results for antimicrobial activity. *Infection.* 1999;27 Suppl 1:S24-9.

9. Beisang AA 3rd, Geise RA, Ersek RA. Radiolucent prosthetic gel. *Plast Reconstr Surg.* 1991 May;87(5):885-92.
10. Benediktsson K, Perbeck LG. Fluid retention in Bioplasty Misti Gold II breast prostheses with development of capsular contracture. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2000 Mar;34(1):65-70.
11. Birdsell DC, Jenkins H, Berkel H. Breast cancer diagnosis and survival in women with and without breast implants. *Plast Reconstr Surg.* 1993 Oct;92(5):795-800.
12. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997 Jul;13(4):258-69.
13. Booth SC, Workentine ML, Wen J, Shaykhutdinov R, Vogel HJ, Ceri H, Turner RJ, Weljie AM. Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J Proteome Res.* 2011 Jul 1;10(7):3190-9. Epub 2011 May 31.
14. Borenstein D. Siliconosis: a spectrum of illness. *Semin Arthritis Rheum.* 1994 Aug;24(1 Suppl 1):1-7.
15. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods.* 1999 Jul;37(1):77-86.
16. Bridges AJ. Autoantibodies in patients with silicone implants. *Semin Arthritis Rheum.* 1994 Aug;24(1 Suppl 1):54-60.
17. Broekhuizen CA, de Boer L, Schipper K, Jones CD, Quadir S, Feldman RG, Dankert J, Vandebroucke-Grauls CM, Weening JJ, Zaai SA. Peri-implant

tissue is an important niche for *Staphylococcus epidermidis* in experimental biomaterial-associated infection in mice. *Infect Immun.* 2007 Mar;75(3):1129-36. Epub 2006 Dec 11.

18. Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT, Rouch DA. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol.* 1995 Sep;17(6):1153-66.
19. Burkhardt BR, Dempsey PD, Schnur PL, Tofield JJ. Capsular contracture: a prospective study of the effect of local antibacterial agents. *Plast Reconstr Surg.* 1986 Jun;77(6):919-32.
20. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1984 Nov;48(5):980-3.
21. Busscher HJ, Uyen MH, Weerkamp AH, Postma WJ, Arends J. Reversibility of adhesion of oral streptococci to solids. *FEMS Microbiol Lett* 1986; 35:303–306.
22. Bürgers R, Cariaga T, Müller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, Hahnel S. Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Investig.* 2009a Dec;13(4):419-26.
23. Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol.* 2009b Jun;54(6):595-601. Epub 2009 Apr 16.
24. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. 2010. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 21:156-164.

25. Claman HN, Robertson AD. Antinuclear antibodies and breast implants. *West J Med.* 1994 Mar;160(3):225-8.
26. Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. *Met Based Drugs.* 1994;1(5-6):467-82.
27. Coleman DJ, Foo IT, Sharpe DT. Textured or smooth implants for breast augmentation? A prospective controlled trial. *Br J Plast Surg.* 1991 Aug-Sep;44(6):444-8.
28. Converse J. *Plastic Surgery* 1977, Senders Company. Vol 7: 3694-98.
29. Cook RR, Delongchamp RR, Woodbury M, Perkins LL, Harrison MC. The prevalence of women with breast implants in the United States--1989. *J Clin Epidemiol.* 1995 Apr;48(4):519-25.
30. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
31. Decker EM. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol.* 2001 Sep;33(3):188-92.
32. Dobke MK, Svahn JK, Vastine VL, Landon BN, Stein PC, Parsons CL. Characterization of microbial presence at the surface of silicone mammary implants. *Ann Plast Surg.* 1995 Jun;34(6):563-9; discussion 570-1.
33. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr;7(2):277-81.
34. Dowden RV. Periprosthetic bacteria and the breast implant patient with systemic symptoms. *Plast Reconstr Surg.* 1994 Aug;94(2):300-5.

35. Drenkard E, Ausubel FM. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 2002 Apr 18;416(6882):740-3.
36. Dufrêne YF. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Jun;6(3):317-23.
37. Eguchi M. Antibacterium Effect of Copper. Development of Products by Application of the Antibacterium Effect 01' Copper. *Copper and Brass*. 1989;12:1-8.
38. Embrey M, Adams EE, Cunningham B, Peters W, Young VL, Carlo GL. A review of the literature on the etiology of capsular contracture and a pilot study to determine the outcome of capsular contracture interventions. *Aesthetic Plast Surg*. 1999 May-Jun;23(3):197-206.
39. FDA, Breast Implants - an information update. Vol. <http://www.fda.gov/cdrh/breastimplants/>. 2002, Rockville: Food and Drug administration.
40. Feng LJ, Amini SB. Analysis of risk factors associated with rupture of silicone gel breast implants. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Sep;104(4):955-63.
41. Flassbeck D, Pfleiderer B, Grümping R, Hirner AV. Determination of low molecular weight silicones in plasma and blood of women after exposure to silicone breast implants by GC/MS. *Anal Chem*. 2001 Feb 1;73(3):606-11.
42. Freedman AM, Jackson IT. Infections in breast implants. *Infect Dis Clin North Am*. 1989 Jun;3(2):275-87.
43. Fricker SP. A role for in vitro cytotoxicity testing in the selection and development of metal-based pharmaceutical and materials products. *Toxicol In Vitro*. 1994 Aug;8(4):879-81.

44. Friemann J, Bauer M, Golz B, Rombeck N, Höhr D, Erbs G, Steinau HU, Olbrisch RR. Physiologic and pathologic patterns of reaction to silicone breast implants. *Zentralbl Chir.* 1997;122(7):551-64.
45. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):34-40.
46. Gabriel SE, O'Fallon WM, Beard CM, Kurland LT, Woods JE, Melton LJ 3rd. Trends in the utilization of silicone breast implants, 1964-1991, and methodology for a population-based study of outcomes. *J Clin Epidemiol.* 1995 Apr;48(4):527-37.
47. Gosau M, Prantl L, Feldmann M, Kokott A, Hahnel S, Bürgers R. The effects of copper additives on the quantity and cell viability of adherent *Staphylococcus epidermidis* in silicone implants. *Biofouling.* 2010 Apr;26(3):359-65.
48. Goscin CP, Berman CG, Clark RA. Magnetic resonance imaging of the breast. *Cancer Control.* 2001 Sep-Oct;8(5):399-406.
49. Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med.* 1999 Feb;5(2):183-8.
50. Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G. Surface properties and in vitro *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jul;19(7):2619-27.
51. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Jan;20(1):249-55. Epub 2008 Aug 30.
52. Hakelius L, Ohlsén L. Tendency to capsular contracture around smooth and textured gel-filled silicone mammary implants: a five-year follow-up. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Nov;100(6):1566-9.

53. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):95-108.
54. Handel N, Jensen JA, Black Q, Waisman JR, Silverstein MJ. The fate of breast implants: a critical analysis of complications and outcomes. *Plast Reconstr Surg.* 1995 Dec;96(7):1521-33.
55. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1986 Apr;29(4):457-60.
56. Hasman H, Aarestrup FM. tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 May;46(5):1410-6.
57. Hasman H, Kempf I, Chidaine B, Cariolet R, Ersbøll AK, Houe H, Bruun Hansen HC, Aarestrup FM. Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the tcrB gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Sep;72(9):5784-9.
58. Hauser J, Zietlow J, Köller M, Esenwein SA, Halfmann H, Awakowicz P, Steinau HU. Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Dec;20(12):2541-8.
59. Hausner RJ, Schoen FJ, Pierson KK. Foreign-body reaction to silicone gel in axillary lymph nodes after an augmentation mammoplasty. *Plast Reconstr Surg.* 1978 Sep;62(3):381-4.
60. Hedin G. *Staphylococcus epidermidis*--hospital epidemiology and the detection of methicillin resistance. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1993;90:1-59.
61. Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G, Gollwitzer H. A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Oct;16(10):883-8.

62. Henriksen TF, Fryzek JP, Hölmich LR, McLaughlin JK, Kjøller K, Høyer AP, Olsen JH, Friis S. Surgical intervention and capsular contracture after breast augmentation: a prospective study of risk factors. *Ann Plast Surg.* 2005 Apr;54(4):343-51.
63. Hoffmann B, Volkmer E, Kokott A, Weber M, Hamisch S, Schieker M, Mutschler W, Ziegler G. A new biodegradable bone wax substitute with the potential to be used as a bone filling material. *J Mater Chem* 2007;17:4028-4033.
64. Hulterström AK, Berglund A, Ruyter IE. Wettability, water sorption and water solubility of seven silicone elastomers used for maxillofacial prostheses. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jan;19(1):225-31.
65. Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1446-53.
66. Kloos WE, Lambe DW. *Staphylococcus*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1991;28:222-237.
67. Kodjikian L, Casoli-Bergeron E, Malet F, Janin-Manificat H, Freney J, Burillon C, Colin J, Steghens JP. Bacterial adhesion to conventional hydrogel and new silicone-hydrogel contact lens materials. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Feb;246(2):267-73.
68. Kolbeck C, Rosentritt M, Lang R, Handel G. Discoloration of facing and restorative composites by UV-irradiation and staining food. *Dent Mater.* 2006 Jan;22(1):63-8.
69. Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, Veremakis C, Kerr KM, Margolis BD, Craven DE, Roberts PR, Arroliga AC, Hubmayr RD, Restrepo MI, Auger WR, Schinner R; NASCENT Investigation Group. Silver-coated endotracheal tubes and

- incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. JAMA. 2008 Aug 20;300(7):805-13.
70. Kruse M, Steffen R, Batel R, Müller IM, Müller WE. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J Cell Sci.* 1999 Dec;112 ( Pt 23):4305-13.
71. Lane TH, Burns SA. Silica, silicon and silicones ... unraveling the mystery. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;210:3-12.
72. LeVier RR, Harrison MC, Cook RR, Lane TH. What is silicone? *Plast Reconstr Surg.* 1993 Jul;92(1):163-7.
73. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):999-1007.
74. Lykissa ED, Kala SV, Hurley JB, Lebovitz RM. Release of low molecular weight silicones and platinum from silicone breast implants. *Anal Chem.* 1997 Dec 1;69(23):4912-6.
75. Macadam SA, Clugston PA, Germann ET. Retrospective case review of capsular contracture after two-stage breast reconstruction: is colonization of the tissue expander pocket associated with subsequent implant capsular contracture? *Ann Plast Surg.* 2004 Nov;53(5):420-4.
76. Marotta JS, Widenhouse CW, Habal MB, Goldberg EP. Silicone gel breast implant failure and frequency of additional surgeries: analysis of 35 studies reporting examination of more than 8,000 explants. *J Biomed Mater Res. J Biomed Mater Res.* 1999;48(3):354-64.
77. McBride MC, Karl Malcolm R, David Woolfson A, Gorman SP. Persistence of antimicrobial activity through sustained release of triclosan from pegylated silicone elastomers. *Biomaterials.* 2009 Dec;30(35):6739-47.

78. McCarthy JG. Plastic Surgery Volume 6, The Trunk And Lower Extremity. 1990: 3887-3896.
79. Mena EA, Kossovsky N, Chu C, Hu C. Inflammatory intermediates produced by tissues encasing silicone breast prostheses. *J Invest Surg.* 1995 Jan-Feb;8(1):31-42.
80. Middleton MS. Magnetic resonance evaluation of breast implants and soft-tissue silicone. *Top Magn Reson Imaging.* 1998 Apr;9(2):92-137.
81. Morra M, Cassinelli C. Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1997;9(1):55-74.
82. Mukerji B, Hardin JG. Undifferentiated, overlapping, and mixed connective tissue diseases. *Am J Med Sci.* 1993 Feb;305(2):114-9.
83. Murata A. Mechanism of Bactericidal Action of Ascorbic Acid on Escherichia coli. *Vitamins (Kyoto).* 1991;65:439-445.
84. Nan L, Liu Y, Lü M, Yang K. Study on antibacterial mechanism of copper-bearing austenitic antibacterial stainless steel by atomic force microscopy. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Sep;19(9):3057-62.
85. Neel EA, Ahmed I, Pratten J, Nazhat SN, Knowles JC. Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres. *Biomaterials.* 2005 May;26(15):2247-54.
86. Nemecek JA, Young VL. How safe are silicone breast implants? *South Med J.* 1993 Aug;86(8):932-44.
87. Owens DK, Wendt RC. 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 13:1741–1747.

88. Pajkos A, Deva AK, Vickery K, Cope C, Chang L, Cossart YE. Detection of subclinical infection in significant breast implant capsules. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Apr 15;111(5):1605-11.
89. Patti JM. Vaccines and immunotherapy for staphylococcal infections. *Int J Artif Organs.* 2005 Nov;28(11):1157-62.
90. Pereni CI, Zhao Q, Liu Y, Abel E. Surface free energy effect on bacterial retention. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006 Mar 15;48(2):143-7.
91. Peters W. Current status of breast implant survival properties and the management of the woman with silicone gel breast implants. March/April 2000, Volume 8 Issue 2: 54-67.
92. Pfleiderer B, Xu P, Ackerman JL, Garrido L. Study of aging of silicone rubber biomaterials with NMR. *J Biomed Mater Res.* 1995a Sep;29(9):1129-40.
93. Pfleiderer B, Garrido L. Migration and accumulation of silicone in the liver of women with silicone gel-filled breast implants. *Magn Reson Med.* 1995b Jan;33(1):8-17.
94. Pittet B, Montandon D, Pittet D. Infection in breast implants. *Lancet Infect Dis.* 2005 Feb;5(2):94-106.
95. Potter M, Rose NR, Current Topics in Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 6-11,14,18, 22, 39, 40, 44, 64, 93, 246, 323, 1996.
96. Prantl L, Schreml S, Fichtner-Feigl S, Pöppl N, Roll C, Eisenmann-Klein M, Hofstädter F. [Histological and immunohistochemical investigations with capsular contracture after breast augmentation with smooth silicone gel implants]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2006 Aug;38(4):224-32.
97. Prantl L, Schreml S, Fichtner-Feigl S, Pöppl N, Eisenmann-Klein M, Schwarze H, Füchtmeier B. Clinical and morphological conditions in capsular contracture

- formed around silicone breast implants. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jul;120(1):275-84.
98. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *J Colloid Interface Sci* 1988;129:568–574.
99. Press RI, Peebles CL, Kumagai Y, Ochs RL, Tan EM. Antinuclear autoantibodies in women with silicone breast implants. *Lancet.* 1992 Nov 28;340(8831):1304-7.
100. Quie PG, Belani KK. Coagulase-negative staphylococcal adherence and persistence. *J Infect Dis.* 1987 Oct;156(4):543-7.
101. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995 Jan;22(1):1-14.
102. Reid G, Bailey RR. Biofilm infections: implications for diagnosis and treatment. *N Z Med J.* 1996 Feb 23;109(1016):41-2.
103. Robinson OG Jr, Bradley EL, Wilson DS. Analysis of explanted silicone implants: a report of 300 patients. *Ann Plast Surg.* 1995 Jan;34(1):1-6; discussion 6-7.
104. Rosentritt M, Behr M, Gebhard R, Handel G. Influence of stress simulation parameters on the fracture strength of all-ceramic fixed-partial dentures. *Dent Mater.* 2006 Feb;22(2):176-82.
105. Rowley MJ, Cook AD, Teuber SS, Gershwin ME. Antibodies to collagen: comparative epitope mapping in women with silicone breast implants, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 1994 Dec;7(6):775-89.

106. Schmidt H, Schlörcke E, Fislage R, Schulze HA, Guthoff R. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriol*. 1998 Jan;287(1-2):135-45.
107. Schreml S, Heine N, Eisenmann-Klein M, Prantl L. Bacterial colonization is of major relevance for high-grade capsular contracture after augmentation mammoplasty. *Ann Plast Surg*. 2007 Aug;59(2):126-30.
108. Siggelkow W, Faridi A, Spiritus K, Klinge U, Rath W, Klosterhalfen B. Biomaterials. Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. 2003 Mar;24(6):1101-9.
109. Stickler DJ, McLean RJC. Biomaterials associated infections: the scale of the problem. *Cell Mater* 1995;5:167-182.
110. Strömbeck JO, Rosato FE. Surgery of the Breast Thieme 1986:8-20,312-320.
111. Szewzyk U, Szewzyk R. Biofilme – die etwas andere Lebensweise. *Biospektrum*.2003;9,253–255.
112. Takayanagi S, Nakagawa C, Sugimoto Y. Augmentation mammoplasty: where should the implant be placed? *Aesthetic Plast Surg*. 2004 Mar-Apr;28(2):83-8.
113. Tang H, Cao T, Wang A, Liang X, Salley SO, McAllister JP 2nd, Ng KY. Effect of surface modification of siliconon *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 15;80(4):885-94.
114. Tari BF, Nalbant D, Dogruman Al F, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. *J Contemp Dent Pract*. 2007 Jul 1;8(5):18-25.
115. Teuber SS, Rowley MJ, Yoshida SH, Ansari AA, Gershwin ME. Anti-collagen autoantibodies are found in women with silicone breast implants. *J Autoimmun*. 1993 Jun;6(3):367-77.

116. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.
117. Tham C, Lai YL, Weng CJ, Chen YR. Silicone augmentation rhinoplasty in an Oriental population. *Ann Plast Surg.* 2005 Jan;54(1):1-5; discussion 6-7.
118. Tricot GJ, Naucke S, Vaught L, Vesole D, Jagannath S, Barlogie B. Is the risk of multiple myeloma increased in patients with silicone implants? *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;210:357-9.
119. Van Heerden J, Turner M, Hoffmann D, Moolman J. Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented? *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 May;62(5):610-7.
120. Vasey FB, Havice DL, Bocanegra TS, Seleznick MJ, Bridgeford PH, Martinez-Osuna P, Espinoza LR. Clinical findings in symptomatic women with silicone breast implants. *Semin Arthritis Rheum.* 1994 Aug;24(1 Suppl 1):22-8.
121. Virden CP, Dobke MK, Stein P, Parsons CL, Frank DH. Subclinical infection of the silicone breast implant surface as a possible cause of capsular contracture. *Aesthetic Plast Surg.* 1992 Spring;16(2):173-9.
122. Weerkamp AH, van der Mei HC, Busscher HJ. The surface free energy of oral streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth. *J Dent Res.* 1985 Oct;64(10):1204-10.
123. Wells TN, Scully P, Paravicini G, Proudfoot AE, Payton MA. Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flamazine. *Biochemistry.* 1995 Jun 20;34(24):7896-903.
124. Wick M, Kreis G, Kreuzer FH: "Silicone" in: Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie; Bartholomi E, Biekert E, Hellmann H, Ley H, Weigert WM, Weise E (Hrsg.), 4., 1982;21,511-541.

125. Wilflingseder P, Hoinkes G, Mikuz G. Tissue reactions from silicone implant in augmentation mammoplasties. *Minerva Chir.* 1983 Jun 30;38(12):877-80.
126. Wolf LE, Lappé M, Peterson RD, Ezrailson EG. Human immune response to polydimethylsiloxane (silicone): screening studies in a breast implant population. *FASEB J.* 1993 Oct;7(13):1265-8.
127. Yip HK, To WM, Smales RJ. Effects of artificial saliva and APF gel on the surface roughness of newer glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2004 Nov-Dec;29(6):661-8.
128. Zanin FR, Garcia Lda F, Casemiro LA, Pires-de-Souza Fde C. Effect of artificial accelerated aging on color stability and surface roughness of indirect composites. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2008 Mar;16(1):10-4.
129. ZCT. Zeitschrift für Chemotherapie. März/April 2004; 25.Jhg,11.

## **7. Danksagung**

Ich möchte mich auf diesem Weg herzlich bei Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau für die Überlassung des Themas bedanken.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. dent. Ralf Bürgers für die stets geduldige und freudliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei den Teams der Forschungsbereiche der prothetischen und konservierenden Zahnheilkunde bedanken, im Speziellen bei Frau Marlene Rosendahl und Herrn Andreas Eidt.

Und zu guter Letzt dem wichtigsten Menschen in meinem Leben.

## **8. Lebenslauf**

## Persönliche Daten:

Name: Schedel  
Vorname: Katharina  
Geburtsdatum: 06.02.1983  
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein  
Eltern: Fritz Schedel, Zahnarzt  
Martina Zürker, Oberstudienrätin  
Geschwister: Friedrich Schedel  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Werdegang:

1989-1993: Grundschule Carlsberg

1993-2002: Leininger Gymnasium Grünstadt; Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

2002-2004: Studium der Zahnmedizin an der Universität zu Köln

2004-2009: Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg;  
Staatsexamen November 2009; Approbation als Zahnärztin

2010-2012: Vorbereitungsassistentin in allgemeinzahnärztlicher Praxis