

Universität Rostock

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Analyse der mikrovaskulären Antwort der Skelettmuskulatur auf die Implantation von TiAg-Implantaten im dorsalen Rückenhautkammer-Modell



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Maximilian Beythien

Rostock im Oktober 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Direktorin Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier
Direktor Klinik und Poliklinik für Chirurgie - Abteilung für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke
Direktor Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes

Datum der Einreichung: 1. Oktober 2015

Datum der Verteidigung: 20. Juli 2016

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung.....	1
II	Glossar	3
III	Thesen	6
1	Einleitung.....	8
1.1	Implantate und Fixationsmaterialien in der Chirurgie	8
1.1.1	Knochenersatzmaterialien und Endoprothesen.....	8
1.1.2	Implantat-Materialanforderungen.....	10
1.2	Titan als Prothesenmaterial	11
1.3	Implantatinfektionen.....	11
1.3.1	Epidemiologie und klinische Problematik	11
1.3.2	Biofilm - Entstehung und Aufbau	13
1.3.3	Körpereigene Immunabwehr-Mechanismen	14
1.3.4	Therapie und Prävention.....	16
1.4	Silber als antimikrobielles Agens.....	18
1.4.1	Silber als chemisches Element.....	18
1.4.2	Geschichte der medizinischen Anwendung von Silber	18
1.4.3	Silber-Anwendungsformen.....	19
1.4.4	Wirkmechanismus von Ag ⁺ -Ionen	20
2	Zielstellung	22
3	Material und Methodik	23
3.1	Versuchstiere.....	23
3.2	Implantatmaterial.....	23
3.2.1	CGS Medical GmbH	23
3.2.2	Herstellung der Implantate	23
3.3	Experimentelles Protokoll	25
3.4	Modell der Rückenhautkammer	26
3.4.1	Das Rückenhautkammer-Modell.....	26
3.4.2	Anästhesie	27
3.4.3	Präparation der Rückenhautkammer	28
3.4.4	Implantation der Ti- & TiAg-Implantate	31
3.5	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	32
3.5.1	Aufbau des IVM Systems	32
3.5.2	Fluoreszenzfarbstoffe.....	33

3.5.3	IVM-Beobachtungsfelder	35
3.5.4	Auswertung mittels CapImage [®] -Analyse-Software	36
3.6	Blutentnahme und Implantatasservierung	40
3.7	Histologische Analyse	40
3.8	Statistische Analyse	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Allgemeine und makroskopische Beobachtungen	43
4.2	Mikrohämodynamik	44
4.2.1	Gefäßdurchmesser, Zellfluss, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Blutvolumenfluss, Wandscherrate	44
4.2.2	Funktionelle Kapillardichte	47
4.2.3	Extravasation	48
4.3	Inflammation	49
4.4	Histologie	52
4.5	EDA-Analyse der Implantat-Oberfläche	53
5	Diskussion	54
5.1	Diskussion von Material und Methode	54
5.1.1	Modell der Rückenhautkammer	54
5.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	56
5.1.3	Silberanwendung in der Medizin	57
5.2	Diskussion der Ergebnisse	60
6	Literaturverzeichnis	68
7	Abbildungs- & Tabellenverzeichnis	79
7.1	Abbildungen	79
7.2	Tabellen	79

I Zusammenfassung

Implantatinfektionen spielen insbesondere bei immunsupprimierten Patienten sowie bei Reimplantationen eine große Rolle, da sie nur schwer in den Griff zu bekommen sind und meist schwerwiegende Folgen für den Patienten haben. Aus diesem Grund steigt die Wichtigkeit von antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen der Implantate in der Prävention von Infektionen. Eine mögliche und vielversprechende antimikrobielle Substanz ist Silber (Ag), welches nicht nur aktuell Anwendung findet, sondern auch eine lange Historie in der medizinischen Nutzung hat.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Biokompatibilität einer neuartigen Implantatbeschichtung mit TiAg auf konventionellem Titan. Dabei wurde diese neuartige TiAg-Verbundbeschichtung mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD = engl. physical vapor deposition) unter Vakuumbedingungen auf die Ti-Folien aufgebracht, welche im Modell der Rückenhautkammer auf den quergestreiften Skelettmuskel der Rückenhaut (*M. panniculus carnosus*) implantiert wurden. Die Analyse der lokalen kapillären und der venulären Perfusion, der Gefäßpermeabilität und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) direkt und eine Stunde sowie einen, drei und sieben Tage nach Implantation. Des Weiteren wurden Blutparameter als auch die Histologie des Skelettmuskels im Bereich der Implantate nach Ende des Versuchszeitraums untersucht.

Die mit der neuartigen TiAg-Beschichtung ausgestatteten Implantate wurden gut toleriert. Im Vergleich zur Kontroll- sowie zur reinen Ti-Implantatgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der funktionellen Kapillardichte und der endothelialen Farbstoff-Extravasation. Weiterhin konnte mittels IVM weder eine erhöhte Anzahl an rollenden noch an adhärenenten Leukozyten analysiert werden. Anzeichen einer vermehrten Inflammation wurden bei der Untersuchung der histologischen Präparate ebenso nicht gesehen.

Die neuartige TiAg-Verbundbeschichtung zeigte eine gute Biokompatibilität und keine Hinweise auf eine erhöhte Inflammation im Mausmodell und bietet somit gute Voraussetzungen für eine weitere Testung zur zukünftigen Verwendung in der Humanmedizin.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock in Kooperation mit der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsmedizin Rostock unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier sowie mit der Firma CGS Medical GmbH (Jakob Huber, Thorsten Zufraß) durchgeführt und von Frau Dr. rer. nat. Ann-Kathrin Behrendt betreut. Die Ergebnisse der Studie wurden bereits erfolgreich im Journal of Material Science: Materials in Medicine (PMID: 25589204) veröffentlicht:

Behrendt AK, Beythien M, Huber J, Zufraß T, Butschkau A, Mittlmeier T, Vollmar B. **New TiAg composite coating for bone prosthesis engineering shows promising microvascular compatibility in the murine dorsal skinfold chamber model.** J Mater Sci Mater Med 2015; 26 (1): 5373

II Glossar

Abb.	Abbildung
Ag	Silber
BMI	Body Mass Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CAE	Chloracetat-Esterase
CCD	charge-coupled device = dt. ladungsgekoppeltes Bauteil
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
dc	direct current = dt. Gleichspannung
EDA	energiedispersive Röntgenanalyse
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
g	Gramm
Gew%	Gewichtsprozent
G _{mean}	mittlerer Grauwert
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hz	Hertz
Impl	Implantation
IVM	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kHz	Kilohertz
Kon	Kontrolle
kW	Kilowatt

M.	Musculus
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.Chr.	nach Christus
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
pL	Pikoliter
ppb	parts per billion = dt. Teile pro Milliarde
PVD	physical vapor deposition = dt. physikalische Gasphasenabscheidung
RKP	Rückenhautkammer-Präparation
ROI	region of interest = dt. Beobachtungsfeld
s	Sekunden
S	Sprengring
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Tab.	Tabelle
Ti	Titan
TiAg	Titan-Silber
TiNi	Titan-Nickel
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UBM	unbalancierte-Magnetron-Kathodenzerstäubung
v	velocity = dt. Geschwindigkeit

V	Volt
v.Chr.	vor Christus
VQ	Blutvolumenfluss
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

III Thesen**Thema der Dissertation:****Analyse der mikrovaskulären Antwort der Skelettmuskulatur auf die Implantation von TiAg-Implantaten im dorsalen Rückenhautkammer-Modell**

- Implantatmaterialien spielen insbesondere in der Therapie der Orthopädie und der Unfallchirurgie eine wesentliche Rolle.
- Die Verwendung und Bedeutung von Implantaten wie z.B. Hüft- und Kniegelenks-Totalendoprothesen ist in den letzten Jahren gestiegen und steigt weiterhin.
- Bei jeder Operation bestehen Risiken, wobei die Infektion eine der schwersten Komplikationen darstellt, durch die weitere Behandlungsschritte, wie u.U. eine Reoperation notwendig werden und weitere schwerwiegende Komplikationen auftreten können.
- Silber ist ein vielversprechendes Material für den Einsatz bei Implantatmaterialien aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften.
- Eine gute Biokompatibilität und gute vaskuläre Bedingungen sind essentiell für eine optimale Gewebeintegration und somit für optimale funktionelle Ergebnisse.
- Vaskuläre und inflammatorische Parameter zur Bewertung der Biokompatibilität wurden mithilfe der Rückenhautkammer und der intravitalen Mikroskopie untersucht.
- Während eine antimikrobielle Wirkung von Silber auch in Verbindung mit anderen Materialien schon untersucht und bestätigt wurde, ist die Biokompatibilität der TiAg-Legierung noch nicht ausreichend analysiert worden.
- Die TiAg-Verbundbeschichtung zeigte sowohl in zentralen als auch peripheren Bereichen um das Implantat herum intakte vaskuläre Verhältnisse und keine Anzeichen einer vermehrten endothelialen Schädigung.
- Eine erhöhte inflammatorische Reaktion wurde durch die TiAg-Verbundbeschichtung nicht ausgelöst.
- Der Vergleich der reinen Ti-Implantate mit den TiAg-Implantaten zeigte eine gleich gute Biokompatibilität und eine ähnlich geringe Inflammation.

- Histologisch konnten eine gute Biokompatibilität und eine geringe Inflammation bestätigt werden.
- Die EDA-Analyse zeigte eine adäquate Silberfreisetzung der TiAg-Legierung.
- Die TiAg-Verbundbeschichtung bietet durch die Kombination der Festigkeit der Ti-Komponente mit der antibakteriellen Wirkung von Silber gute Voraussetzungen für weitere Testungen mit dem Ziel der zukünftigen Anwendung im menschlichen Organismus.

1 Einleitung

1.1 Implantate und Fixationsmaterialien in der Chirurgie

1.1.1 Knochenersatzmaterialien und Endoprothesen

Die vorliegende Arbeit untersucht eine neuartige Silberlegierung als Beschichtung von Implantatmaterialien hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und ihrer Auswirkungen auf die lokale körpereigene Immunantwort. Implantatmaterialien jeglicher Art haben einen hohen Stellenwert insbesondere in der orthopädischen sowie in der Unfallchirurgie. Dabei kommen u.a. Schrauben, Marknägel oder Plattenmaterial zur Versorgung von Frakturen zum Einsatz sowie Totalendoprothesen im Rahmen eines Knie- oder Hüftgelenkersatzes. Der totale Hüftgelenkersatz mittels Endoprothese ist ein sehr erfolgreiches operatives Verfahren für Patienten mit einer endgradigen Hüftgelenkserkrankung und wird seit über 40 Jahren mit guten funktionellen Ergebnissen durchgeführt [Jassim et al 2012, Field et al 2005, Berry et al 2002]. Die Bedeutung dieses Verfahrens hat in der Vergangenheit aufgrund verschiedener Faktoren zugenommen. Ein Grund hierfür ist die Bevölkerungsentwicklung der letzten Jahrzehnte in den Industrienationen. In Deutschland kam es im Zuge des demographischen Wandels zu einer fortlaufenden Alterung der Gesellschaft mit zunehmendem Anteil der älteren Bevölkerung und gleichzeitiger Abnahme der Anzahl der jungen Menschen (Abb. 1).

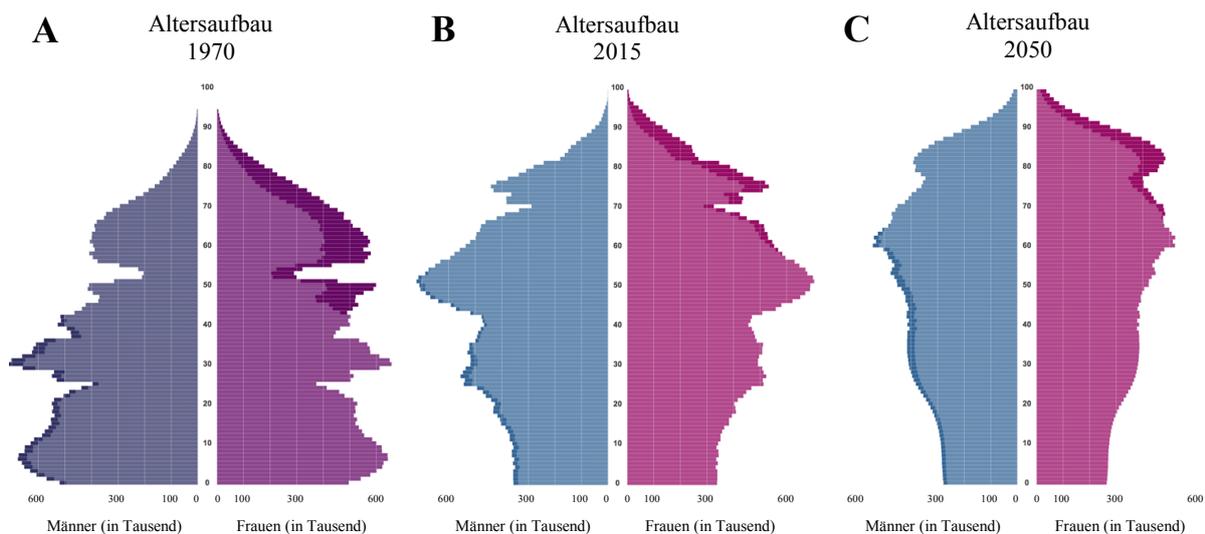


Abb. 1: Demographische Entwicklung Deutschlands in den Jahren 1970 (A) und 2015 (B) und voraussichtliche Bevölkerungspyramide für das Jahr 2050 (C). Zahlen innerhalb der Grafik entsprechen dem Lebensalter, aufgetragen als Anzahl der Männer (blau) gegen Frauen (pink) in Tausend [Statistisches Bundesamt 2015].

Betrag der Anteil der Einwohner in einem Alter von 80 Jahren oder älter 1970 noch etwa 2%, stieg der Anteil dieser Altersgruppe bis zum Jahr 2015 auf ca. 7% an. Hochrechnungen für das Jahr 2050 erwarten sogar einen Anstieg auf etwa 13% der Gesamtbevölkerung, einerseits bedingt durch eine steigende Lebenserwartung und andererseits durch sinkende Geburtenraten [Statistisches Bundesamt 2015, Peters et al 2010]. Neben diesem demographischen Wandel zeigt sich ebenso ein Wandel der Ernährungsgewohnheiten und der sportlichen Betätigung der Menschen. In Deutschland sind aktuell etwa 44% der Frauen und 60% der männlichen Bevölkerung übergewichtig oder adipös. Mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit außerdem weiter zu [Robert Koch Institut 2012]. Studien belegen eine klare Assoziation zwischen der Höhe des Body Mass Index (BMI) und der späteren Notwendigkeit der Implantation eines totalendoprothetischen Hüftgelenks-Ersatzes. Das relative Risiko für Männer mit einem BMI von 32kg/m^2 oder mehr im Vergleich zu einem BMI von 20,5 bis $21,9\text{kg/m}^2$ beträgt dabei 3,4, bei Frauen steigt das relative Risiko um den Faktor 2,3 [Flugsrud et al 2006]. Als normal angesehen wird dabei ein BMI von 18,5 bis $24,9\text{kg/m}^2$, eine Adipositas ersten Grades ist ab einem Wert von 30kg/m^2 definiert.

Aufgrund dieser Entwicklungen hat die Anzahl der totalendoprothetischen Eingriffe in den letzten Jahren zugenommen. In Deutschland wurden im Jahr 2005 insgesamt 209.292 endoprothetische Operationen des Hüftgelenks durchgeführt, drei Jahre später waren es 226.736. Bis zum Jahr 2011 erhöhte sich die Anzahl weiterhin auf 232.320 Fälle, was einen Anstieg von 2005 bis 2011 von etwa 11% bedeutet (Abb. 2) [Wengler et al 2014].

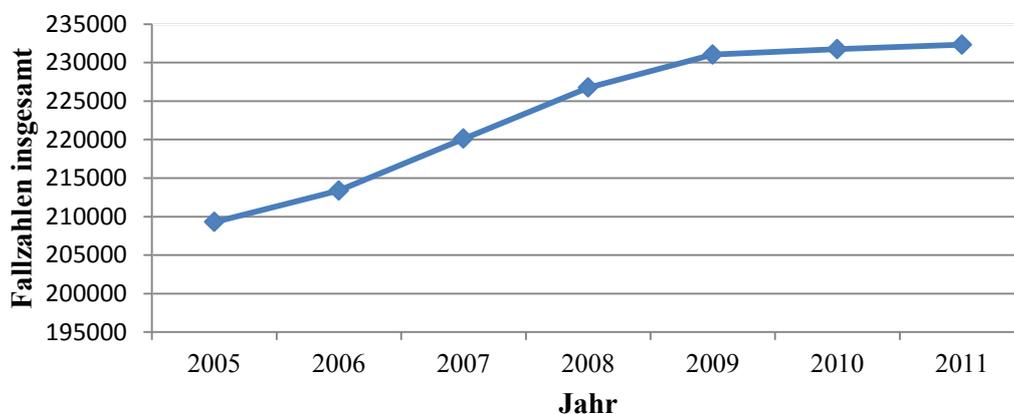


Abb. 2: Endoprothetische Eingriffe des Hüftgelenks in Deutschland von 2005 bis 2011 [Abbildung modifiziert nach Wengler et al 2014].

Auch in anderen Industrienationen wie den USA war dieser Trend zu beobachten: Hier erhöhten sich die absoluten Fallzahlen im oben angegebenen Zeitraum sogar um circa 22%. Hinsichtlich der Altersverteilung der Hüftprothesen-Implantation zeigt sich, dass etwa 74% der Eingriffe an Patienten in einem Alter von 65 oder älter vorgenommen werden (Stand 2011). Dabei stellen 70-79 jährige Patienten den größten Anteil dar [Wengler et al 2014]. Damit zählt heutzutage an deutschen Krankenhäusern die Implantation eines künstlichen Hüftgelenks zu den Routineoperationen und rangiert innerhalb der 20 häufigsten operativen Eingriffe in der Statistik an sechster Stelle bei vollstationär aufgenommenen Patienten [Schnabel & Borelli 2011].

1.1.2 Implantat-Materialanforderungen

In den menschlichen Körper eingebrachtes Fremdmaterial jeglicher Art führt sowohl zu lokalen als auch zu systemischen reaktiven Prozessen. Dies geschieht unabhängig davon, ob es inerte oder nicht inerte Eigenschaften besitzt [Sáenz de Viteri & Fuentes 2013]. Ein Implantat sollte daher Charakteristika aufweisen, welche das Ausmaß dieser Prozesse begrenzen und eine möglichst lange Verweildauer im menschlichen Organismus gewährleisten. Hierzu gehört neben einer hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber Korrosion und Abrieb eine starke Belastbarkeit, um Kräften, die auf das Implantat ausgeübt werden, entgegenwirken zu können. Eine große Rolle spielt die chemische Zusammensetzung des Biomaterials, um eine gute Biokompatibilität zu gewährleisten und damit unerwünschte Gewebereaktionen zu vermindern [Long & Rack 1998]. Die Biokompatibilität beschreibt hierbei die Wirkung des implantierten Materials auf den menschlichen Körper und umgekehrt. Als gut biokompatibel gilt ein Material, welches nicht toxisch wirkt und weder eine inflammatorische noch eine allergische Reaktion auslöst [Sáenz de Viteri & Fuentes 2013]. Sind diese optimalen Voraussetzungen jedoch nicht gegeben, kann es bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten und Körpergeweben zu einer Adhäsion von Thrombozyten auf der Implantatoberfläche mit Ausbildung von Thromben kommen [Gorbet & Sefton 2004]. Ein weiteres Problem ist die Besiedlung des Biomaterials mit Fibroblasten, welche zusammen mit anderen inflammatorischen Zellen eine Implantatlockerung verursachen können [Santavirta et al 1992]. Wie stark ein Implantat in einem Knochen verankert wird, ist außerdem von seiner

Fähigkeit zur Osseointegration abhängig. Das Ausmaß dieser Osseointegration ist dabei abhängig vom Einfluss eines Biomaterials auf die quergestreifte Muskulatur. Wird die Mikrozirkulation des Skelettmuskels verschlechtert, hat dies einen sehr ausgeprägten Effekt auf den angrenzenden Knochen und seinen Stoffwechsel: Es können Osteonekrosen begünstigt und eine ossäre Integration verschlechtert oder sogar verhindert werden [Kraft et al 2003].

1.2 Titan als Prothesenmaterial

Titan ist ein chemisches Element mit dem Symbol Ti und der Ordnungszahl 22. Im Periodensystem steht es in der vierten Nebengruppe und gehört zu den Übergangsmetallen. Zu seinen Merkmalen zählen neben einer geringen Dichte eine hohe Festigkeit bei geringem Gewicht sowie gute plastische und mechanische Charakteristika. Außerdem ist es gut biokompatibel und besitzt eine hohe Korrosionswiderstandsfähigkeit [Sáenz de Viteri & Fuentes 2013]. Aufgrund dieser Eigenschaften findet Titan u.a. in der Luftfahrt-, Automobil- und Schiffbauindustrie breite Anwendung und spielt darüber hinaus eine große Rolle in der Medizin. Hier kommt es u.a. als Bestandteil von Zahnersatzprothesen, als Knochenersatzmaterial, in Form von ausdehnbaren Käfigen zur intrakorporalen Versorgung von Wirbelkörperfrakturen sowie als Platten- und Schraubenmaterial in der operativen Therapie von z.B. Blow-Out-Frakturen zum Einsatz und ist außerdem ein wesentlicher Bestandteil in künstlichen Gelenkersatzmaterialien [Sáenz de Viteri & Fuentes 2013, Eschler et al 2014, Lee KM et al 2014].

1.3 Implantatinfektionen

1.3.1 Epidemiologie und klinische Problematik

Bei der Prothesenimplantation besteht - wie auch bei jeder anderen Operation - die Gefahr verschiedener Komplikationen, wobei in ca. 11% die Notwendigkeit eines erneuten Eingriffes mit Prothesenwechsel besteht [Militz & Bühren 2010]. Die häufigste Ursache hierfür stellt die aseptische Lockerung dar, gefolgt von einer Instabilität des Implantates und der Protheseninfektion [Ulrich et al 2008]. Die periprothetische Infektion stellt dabei eine der schwersten Komplikationen in der Endoprothetik und bei Implantaten allgemein dar. Die

Infektionsrate bei Gelenkersatzoperationen liegt zwischen 0,5 und 2%, wobei ihre Inzidenz bei Patienten mit Vorerkrankungen und nach Revisionseingriffen auf bis zu 5% steigt. Bei Patienten, bei denen eine Reimplantation aufgrund einer Infektion vorgenommen wurde, liegt die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Infektion sogar bei 15-20% [Militz & Bühren 2010, Tiemann et al 2007, Frommelt 2004, Haaker et al 2004, Gaine et al 2000, Berbari et al 1998]. Ursächlich für die Infektion sind einerseits das Eintragen von Erregern über das Operationsteam während der Operation und andererseits eine hämatogene oder lymphogene Streuung. Zu den gesicherten Risikofaktoren gehören weiterhin der Endoprothesenwechsel sowie eine vorbestehende maligne Erkrankung. Als wahrscheinliche Risikofaktoren gelten u.a. Vorerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und der Diabetes mellitus sowie ein erhöhtes Körpergewicht und ein hohes Lebensalter [Militz & Bühren 2010, Friesecke & Wodtke 2008]. Zu den häufigsten Erregern bei Implantatinfektionen zählen koagulase-negative Staphylokokken (30-40%), gefolgt von *Staphylococcus aureus* (12-25%) sowie Streptokokken (10%) und Enterokokken (3-7%). Polymikrobielle Infektionen treten in etwa zehn Prozent der Fälle auf [Zimmerli & Moser 2012, Sendi et al 2011, Del Pozo & Patel 2009, Pandey et al 2000].

Eine periprotetische Infektion ist nicht immer leicht zu diagnostizieren, da es kein eindeutiges Leitsymptom gibt. Sie kann asymptomatisch verlaufen, nur gelegentlich Schmerz verursachen oder aber auch zu einer Fistelbildung und zu großflächigen Wunddehiszenzen führen, in seltenen Fällen sogar zu einem hochakuten, septischen und lebensbedrohlichen Krankheitsbild [Friesecke & Wodtke 2008]. Hinweise in der Anamnese sind Wundheilungsstörungen und eine verlängerte Antibiotikagabe postoperativ sowie häufige Revisionseingriffe. Auch Informationen über vorausgegangene, von der Endoprothese unabhängige Operationen, Zahnbehandlungen oder Fieberschübe können zu der Diagnosefindung beitragen. Zu den diagnostischen Mitteln zählen die Gelenkspunktion zum Erregernachweis oder als Ausschlussdiagnostikum sowie der Nachweis erhöhter CRP- und Leukozyten-Werte im Blut und eine erhöhte BSG. Ein Nativröntgenbild ist diagnostisch und zur Operationsplanung unerlässlich, zeigt jedoch nur in sehr wenigen Fällen typische, Infekt-bedingte, heterotope Ossifikationen [Militz & Bühren 2010, Friesecke & Wodtke 2008].

Eine Implantatinfektion hat zumeist einen Revisionseingriff mit einem zweizeitigen Implantat-Wechsel sowie ein radikales Wunddebridement zur Folge. Eine erneute Operation ist für die Patienten jedoch im Vergleich zu einer primären Endoprothesenimplantation mit häufiger auftretenden Komplikationen verbunden. Dazu zählen neben einem erhöhten Blutverlust während der Operation auch postoperativ vermehrte Komplikationen wie häufigere Infektionen, längere Krankenhausaufenthalte und höhere Kosten sowie eine längere Bewegungseinschränkung und insgesamt ein schlechteres Outcome [Pulido et al 2008, Bozic et al 2005, Gaine et al 2000, Segawa et al 1999]. Dies konnte insbesondere bei älteren Patienten gezeigt werden, bei denen darüber hinaus eine höhere Mortalitäts-Inzidenz bestand [McGarry et al 2004].

1.3.2 Biofilm - Entstehung und Aufbau

Die Therapie von Implantatinfektionen stellt sich häufig als sehr problematisch dar. Dies beruht u.a. auf der Eigenschaft vieler Bakterien einen Biofilm auszubilden, welcher komplexe Ansammlungen von mikrobiellen Zellen auf Fremdkörpern und natürlichen Oberflächen darstellt, umgeben von einer extrazellulären Matrix [Sawhney & Berry 2009]. Der Biofilm entsteht, wenn sich Proteine an einer Implantatoberfläche anheften (Abb. 3A) und die Voraussetzung dafür schaffen, dass sich daraufhin Bakterien auf dem Implantat ablagern können (Abb. 3B). Diese adhären Bakterien proliferieren und rekrutieren weitere Mikroorganismen aus ihrer Umgebung (Abb. 3C). Essentiell für die Entstehung eines Biofilms ist die Ausbildung einer extrazellulären Matrix, welche gebildet wird, wenn die Bakterienkolonie eine bestimmte Größe erreicht und durch Veränderung ihres Genexpressionsmusters Gene aktiviert und exprimiert, die Informationen über die Produktion dieser extrazellulären, polymeren Substanz beinhalten (Abb. 3D). Reguliert wird dieser Vorgang über das sogenannte „Quorum Sensing“, der Fähigkeit von Bakterien mittels chemischer Kommunikation die Zelldichte ihrer Population zu messen. Die Matrix besteht vor allem aus Polysacchariden, Proteinen und DNA und besitzt viele kleine Kanäle, über die Bakterien Signalmoleküle und Genmaterial austauschen können, wobei durch Genrekombination Antibiotikaresistenzen entstehen können. Durch einen behinderten Sauerstoff- und Nährstofftransport innerhalb der Matrix verändert sich außerdem der

Stoffwechsel der Bakterien. Aus der Gesamtheit dieser Vorgänge resultiert eine wesentlich geringere Sensibilität des Biofilms gegenüber körpereigenen Abwehrmechanismen oder antibiotischen Substanzen, die mit dem normalen Stoffwechsel der Bakterien interferieren. Mit Größenzunahme des Biofilms ist zudem eine Absiedlung einzelner Bakterien und Bakterienkolonien möglich (Abb. 3E), welche sich nun im Körper verteilen sowie zu einer Chronifizierung der Infektion mit immer wiederkehrenden Bakteriämien führen können [Knetsch & Koole 2011, Høiby et al 2010, Hall-Stoodley & Stoodley 2009].

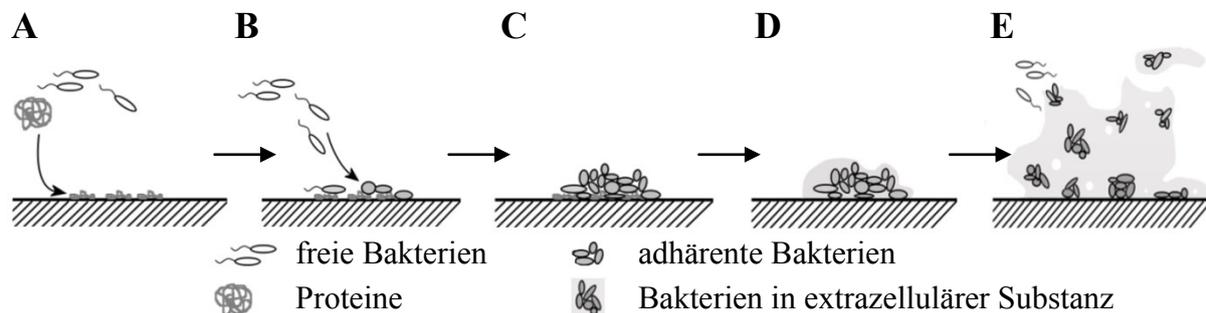


Abb. 3: Phasen der Biofilmbildung: Nachdem sich körpereigene Proteine an der Oberfläche eines Implantates abgesiedelt haben (A), bieten sie frei schwimmenden Bakterien eine gute Grundlage um sich dort abzulagern (B). Die Bakterienkolonie wächst (C) und produziert eine extrazelluläre, polymere Matrix, welche den Hauptbestandteil des Biofilms ausmacht (D). Nun können sich einzelne Bakterien aus dem Verbund lösen und sich anderorts erneut ablagern (E) [Abbildung modifiziert nach Knetsch & Koole 2011].

1.3.3 Körpereigene Immunabwehr-Mechanismen

Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Bei einer Infektion und ebenso als Reaktion auf einen Fremdkörper reagiert der menschliche Körper mithilfe eigener physiologischer Abwehrmechanismen, u.a. der Aktivierung von Leukozyten und dessen Interaktion mit dem Gefäßendothel. Leukozyten zirkulieren im inaktiven Status ununterbrochen im Blutkreislauf (Abb. 4A). Sie werden auf bestimmte Reize hin, wie z.B. im Rahmen eines Gewebetraumas, einer Entzündung oder einer Infektion, aktiviert und können in das betroffene Interstitium eindringen [Kiefel & Müller-Eckhardt 2010]. Dieser Vorgang wird als Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bezeichnet und verläuft in drei Phasen. Dabei erfolgt zunächst eine Aktivierung der angrenzenden Endothelzellen, vermittelt über inflammatorische Zytokine [Frenette 2002]. Die Leukozyten binden nun über

Adhäsionsmoleküle, den sogenannten Selektinen, an den Endothelzellen, wobei Leukozyten vorwiegend L-Selektine, die Endothelzellen P- und E-Selektine auf ihrer Oberfläche exprimieren [Hoffmann et al 1997]. Durch diese temporäre Interaktion, mit noch geringer Affinität zueinander, beginnen die Leukozyten am Endothel entlang zu rollen (Abb. 4B). Durch Überwindung von Scherkräften und eine permanente Bindung an Integrinen kann ein sogenanntes „Sticking“ erfolgen, d.h. ein festes Anhaften der Leukozyten an das Gefäßendothel (Abb. 4C). Dieser Vorgang der Transduktion vom Rollen zur Adhärenz wird über eine starke Bindung zwischen β_2 -Integrinen auf Seiten der Leukozyten und den endothelialen, intrazellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und -2 aus der Familie der Immunglobuline vermittelt [Anbarasan et al 2015, Hoffmann et al 1997]. Durch die Fähigkeit der Endothelzellen, ihre Verbindung zur Basalmembran zu trennen, können die Leukozyten nun den Intravasalraum verlassen und mithilfe von Pseudopodien in das Gewebe einwandern (Abb. 4D). Diese letzte Phase der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wird als Diapedese oder Transmigration bezeichnet [Kiefel & Müller-Eckhardt 2010, Hoffmann et al 1997].

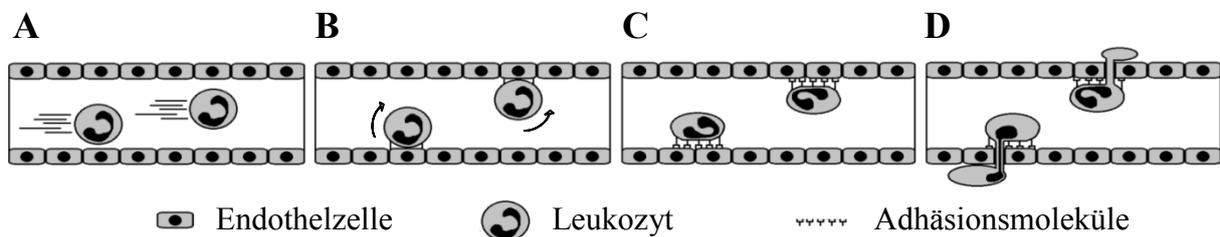


Abb. 4: Ablauf der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion: **A:** Frei fließende Leukozyten; **B:** Rollende Leukozyten; **C:** Adhärenente Leukozyten; **D:** Transmigrierende Leukozyten [Abbildung modifiziert nach Panés et al 1999].

Extravasation und Mikrozirkulation

Transmigrierende Leukozyten bekämpfen jedoch nicht nur eine Infektion, sondern können ebenso über die Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie z.B. Elastasen, Kollagenasen und Gelatinasen die extrazelluläre Matrix angreifen und zur Schädigung der mikrovaskulären Struktur und des Gewebes führen [Di Paola & Cuzzocrea 2007]. Diese enzymatische Schädigung sowie die feste Verbindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen führen zu einem Verlust der endothelialen Integrität, wodurch Makromoleküle von intravasal nach

extravasal austreten und den osmotischen Druck verändern. Aus dieser erhöhten mikrovaskulären Permeabilität resultiert nun eine erhöhte Flüssigkeits-Extravasation mit der Ausbildung eines Ödems, wodurch die Gewebe-Perfusion und somit ebenso seine Oxygenierung abnehmen [Hoffmann et al 1997].

Die lokale Mikrozirkulation der arteriellen, venösen und lymphatischen Kapillaren spielt eine wesentliche Rolle in der Versorgung und Entsorgung des Zellstoffwechsels und sorgt somit für eine intakte Zellernährung. Ist die mikrozirkulatorische Situation durch körpereigene Abwehrmechanismen jedoch gestört, ergibt sich daraus ein verminderter Stoffwechsel und eine ungenügende ATP-Bildung. Durch die dadurch aktivierte anaerobe Glykolyse fällt im Gewebe vermehrt Milchsäure an, was zu einer lokalen Azidose u.a. mit Reizung der Nozizeptoren und somit zur Schmerzempfindung führt [Ostermeier & Dickreiter 2014].

Die beschriebenen Mechanismen der körpereigenen Immunantwort dienen somit einerseits der Abwehr von z.B. Implantat assoziierten Erregern, andererseits können sie im Zusammenhang mit Implantatmaterialien mit schlechter Biokompatibilität zu Wundheilungsstörungen sowie zu einer erhöhten lokalen Infektanfälligkeit führen und sich außerdem negativ auf die Implantat Integration auswirken.

1.3.4 Therapie und Prävention

Da periprothetische Infektionen zu einer Sepsis oder Desintegration des Implantates führen können, ist eine schnelle und präzise Diagnostik mit anschließender effektiver Therapie von essentieller Bedeutung. Dabei stehen in Abhängigkeit des allgemeinen Gesundheitszustandes und des Immunstatus des Patienten, der bisherigen Dauer der Symptomatik und des infizierenden Mikroorganismus sowie abhängig von möglicherweise vorherigen Implantatinfektionen mehrere Therapieoptionen zur Verfügung [Parvizi et al 2012, Song et al 2013]. Hierbei stellt die alleinige intravenöse Antibiotikatherapie eine Möglichkeit dar, insbesondere bei inoperablen Patienten und bei einem sehr hohen OP-Risiko. Die Auswahl des antibiotischen Therapieregimes ist dabei von vielen Faktoren, wie u.a. der Dauer und der Pathogenese der Infektion und von den Erregertypen abhängig. Dem gegenüber stehen reoperative Maßnahmen, wie einerseits die Spülung der Wundfläche zusammen mit einem radikalen Debridement und Belassen der implantierten Prothese intrakorporal sowie

andererseits ein Prothesenwechsel. Der Prothesenaustausch kann dabei entweder einzeitig oder zweizeitig mit temporärer Einlage eines antibiotisch beschichteten Materials durchgeführt werden. Als ultima ratio können eine Arthrodeese oder sogar eine Amputation erwogen werden [Parvizi et al 2012, Trampuz & Widmer 2006].

Um einer Infektion jedoch schon initial vorzubeugen, werden heutzutage verschiedene präventive Maßnahmen in der Praxis durchgeführt. Aufgrund der Annahme, dass etwa 60% der periprothetischen Infektionen intraoperativ infolge mangelnder Hautdesinfektion und kontaminierter chirurgischer Instrumente erfolgen, spielt ein streng steriles Arbeiten eine entscheidende Rolle [Dancer et al 2012, Song et al 2013]. Einen ebenso effektiven Baustein der Prävention stellt die antimikrobielle Prophylaxe dar, welche schon intraoperativ begonnen werden sollte. Als Mittel der Wahl gelten dabei Cephalosporine der 1. oder 2. Generation [Song et al 2013, Marculescu & Osmon 2005, Rodriguez-Merchan 2012]. Antibiotisch wirksamer Zement sowie speziell beschichtetes Implantatmaterial können ebenfalls zu einer Reduktion der Implantat-Infektionsrate führen [Song et al 2013, Schmidmaier et al 2006, Langlais et al 2006]. Sogenannte „active release strategies“, also die Freisetzung antibakteriell wirksamer Substanzen von der Implantatoberfläche spielen dabei eine wesentliche Rolle, da sie die Inzidenz von Implantatinfektionen senken können, indem sie die mikrobielle Besiedlung von Fremdmaterialien schon initial verhindern. Ist es nämlich schon zu der Ausbildung eines bakteriellen Biofilms gekommen, ist eine konservative Therapie mittels intravenöser Antibiose meist nicht mehr vielversprechend [Hetrick & Schoenfisch 2006]. Als Beschichtung kommen dabei einerseits indirekt antimikrobiell wirksame Substanzen wie Antikörper zum Einsatz, welche über den Vorgang der Opsonierung Bakterien für das körpereigene Immunsystem markieren und so zu deren Phagozytose führen. Auf der anderen Seite werden direkt antimikrobiell wirksame Substanzen verwendet, zu denen Stickstoffmonoxid (NO) gehört, welches als starkes Oxidationsmittel bakterielle DNA irreversibel schädigen kann. Ebenfalls direkt wirksam sind Antibiotika wie z.B. Gentamicin, Vancomycin oder Cephalothin, welche den Vorteil besitzen, nur lokal in hohen Dosen freigesetzt zu werden, ohne dabei ihr systemisches Toxizitätslevel zu übersteigen. Ihr Nachteil liegt jedoch in ihren oft sehr spezifisch wirksamen Eigenschaften mit limitierter Wirksamkeit gegenüber bestimmten bakteriellen Stämmen [Harrasser & Harnoss 2012,

Hetrick & Schoenfisch 2006]. Daher kommen auch antimikrobiell wirkende Metalle wie z.B. Kupfer, Zink oder Gold sowie außerdem Silber als bakterizide Oberfläche von Prothesen und Implantatmaterialien allgemein zur Anwendung [Harrasser & Harnoss 2012, Arciola et al 2011, Hetrick & Schoenfisch 2006].

1.4 Silber als antimikrobielles Agens

1.4.1 Silber als chemisches Element

Silber ist ein Edelmetall mit dem chemischen Symbol Ag, abgeleitet aus dem lateinischen Wort *argentum* für „Silber“. Es besitzt die Ordnungszahl 47 und steht im Periodensystem in der 5. Periode und der 1. Nebengruppe und gehört somit zu den Übergangsmetallen.

Silber besitzt unter den Metallen die größte elektrische und auch thermische Leitfähigkeit und ist außerdem weich und so gut verformbar, dass es sich zu feinsten Folien mit einer Dicke von nur wenigen Millimetern aushämmern lässt. Es gibt vier Oxidationszustände, Ag^0 , Ag^+ , Ag^{++} sowie Ag^{+++} , wobei die beiden letzteren im Vergleich zu Ag^0 und Ag^+ weniger löslich und weniger antimikrobiell wirksam sind [Edwards-Jones 2009].

1.4.2 Geschichte der medizinischen Anwendung von Silber

Silber war schon in der Antike nicht nur als edles Metall sehr beliebt, sondern fand ebenso in der Medizin, u.a. in der Behandlung von Infektionen, insbesondere chirurgischer Infektionen, Anwendung. Obwohl seine Bedeutung mit der Einführung der Antibiotika abgenommen hat, spielt es dennoch bis heute eine große Rolle [Alexander 2009, Edwards-Jones 2009].

Schon in den alten Kulturen der Ägypter, Griechen und Römer in den Jahrhunderten vor Christus wurden Silbergefäße genutzt, um Lebensmittel und Wasser zu konservieren. Die Makedonier verwendeten Silber darüberhinaus zur Verbesserung der Wundheilung und Hippokrates (460v.Chr. - 370v.Chr.) außerdem zur Behandlung von Ulzera. Die ersten sicheren Erwähnungen der medizinischen Anwendung von Silber-Nitrat stammen aus den Jahren 702 - 705n.Chr. von Gabor sowie 980n.Chr. von dem persischen Arzt Avicenna, welche es u.a. in der Vorbeugung von Palpitationen und zur Behandlung von Mundgeruch einsetzten [Alexander 2009]. Anfang des 17ten Jahrhunderts therapierte Angelo Sola die Epilepsie und Cholera mithilfe der systemischen Anwendung von Silber-Nitrat

[Edwards-Jones 2009].

Im Laufe der Zeit erweiterten sich die medizinischen Anwendungsgebiete des Edelmetalls immer weiter. Im Jahre 1852 beispielsweise behandelte der Amerikaner Dr. J. Marion Sims vesiko-vaginale Fisteln, indem er diese mit feinen Silber-Drähten als Nahtmaterial verschloss. Zur Harnableitung während des Heilungsprozesses benutzte er Harnblasen-Katheter, welche ebenfalls aus Silber gefertigt waren. Eine der wohl bekanntesten Anwendungen von Silber stammt von dem deutschen Gynäkologen Dr. Carl Siegmund Franz Crede aus den 1880er Jahren, welcher Silber-Nitrat erfolgreich als Augentropfen zur Prävention der Ophthalmia neonatorum einsetzte, was bis zur Einführung der Antibiotika das präventive Mittel der Wahl darstellte [Alexander 2009, Schneider 1984, Klasen 2000]. Auch andere ophthalmologische Erkrankungen wie Kornealulzera, Dakryozystitiden oder Blepharitiden wurden mithilfe von Silber therapiert [Roe 1915].

1.4.3 Silber-Anwendungsformen

Es gibt verschiedene Verwendungsformen von Silber, welche unterschiedlich gut antibakteriell wirksam sind. Metallisches Silber ist inert und ionisiert erst in Verbindung mit Flüssigkeiten von Wunden oder der Feuchtigkeit der Haut, wodurch es über Bindung von Gewebeproteinen und Interaktion mit Zellbestandteilen von Bakterien wirkt. Silber-Salze hingegen sind Verbindungen von positiv-geladenen Ag^+ -Ionen mit negativ-geladenen Ionen, wodurch eine stabilere Applikationsform entsteht. Die meist gebrauchte Silber-Salz-Lösung ist dabei eine 0,5%ige Ag-Nitrat-Lösung, welche vor allem topisch zur Therapie von Verbrennungen eingesetzt wird. Darüber hinaus gibt es Verbindungen von Silber mit anderen, selbst antibiotisch wirkenden Substanzen wie dem Sulfadiazin, einem Antibiotikum aus der Gruppe der Sulfonamide. Diese Silber-Verbindung besitzt ein breites antibiotisches Spektrum und bietet ein Ag-Reservoir aus dem kontinuierlich Ag^+ -Ionen freigesetzt werden [Rai et al 2009, Atiyeh et al 2007]. Eine weitere Form von Silber ist das Nanosilber. Dies sind Nanopartikel mit einer Größe von unter 100nm, welche aus 20-15.000 Silberatomen bestehen [You et al 2012].

1.4.4 Wirkmechanismus von Ag^+ -Ionen

Die bakterizide Wirkung von Silber wird vorrangig über hoch reaktive Silber-Ionen (Ag^+) vermittelt, die zelluläre Prozesse innerhalb der Bakterien stören bzw. unterbrechen [Morones-Ramirez et al 2013, Atiyeh et al 2007]. Entscheidend ist der Anteil der freigesetzten Ag^+ -Ionen, welcher abhängig von der Oberfläche des Silbers und direkt proportional zur antibakteriellen Wirkung ist [Danscher & Loch 2010, Schierholz et al 1998].

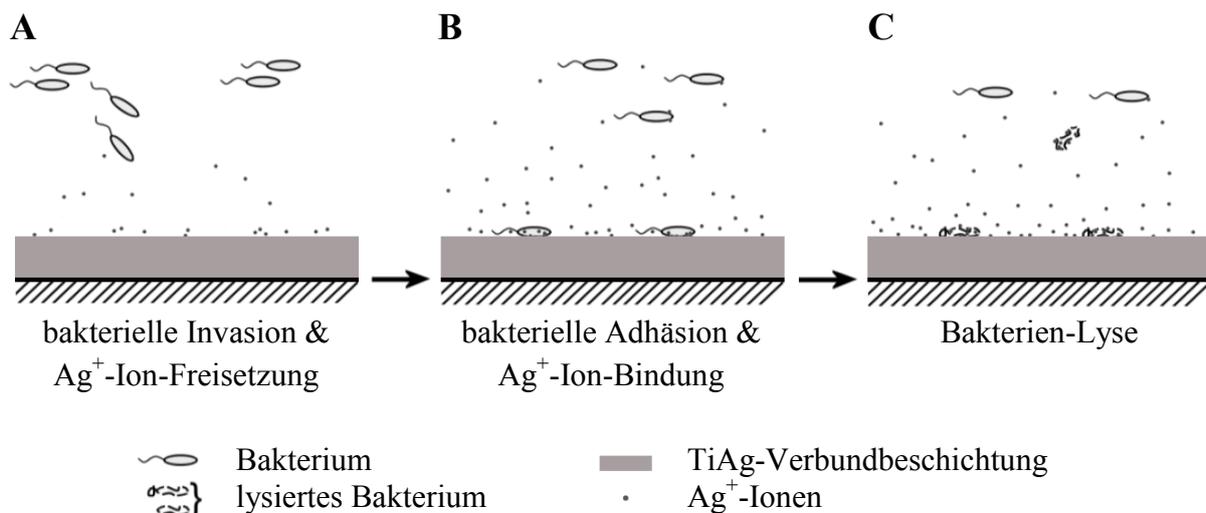


Abb. 5: Antibakterieller Wirkmechanismus von Silber [Abbildung modifiziert nach Knetsch & Koole 2011].

Von einer Silberoberfläche freigesetzte Ag^+ -Ionen binden u.a. an der bakteriellen DNA und RNA, wodurch Translations- und Transkriptionsprozesse von Enzymen gestört werden. Außerdem binden sie an Sulfhydryl- und Phosphoryl-Gruppen von Membranproteinen der Bakterien, wobei sie diese inaktivieren und zu einer Aggregation der Proteine führen (Abb. 5 A&B). Die Kumulation der Ionen an negativ geladenen Proteinen der Zellmembran führt zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran bis hin zur Perforation dieser und zu einem Austritt von Zellkomponenten. Infolge dieser Vorgänge sowie durch vermehrt anfallende reaktive Sauerstoffspezies werden der Zellstoffwechsel und die Zellfunktion gestört, was schlussendlich zum Zelltod der Bakterien führt. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen [Lee et al 2014, Morones-Ramirez et al 2013, Gordon et al 2010, Knetsch & Koole 2011, Li et al 2010,

Atiyeh et al 2007, Lansdown 2006]. Der optimale antibiotische Effekt liegt dabei bei einer Ag^+ -Ionen Konzentration zwischen 10nM und 10 μM [Knetsch & Koole 2011, Kim et al 2007].

2 Zielstellung

Die vorliegende Studie untersucht die Gewebekompatibilität einer neuartigen TiAg-Verbundbeschichtung. Dabei wurden im Rückenhautkammer-Modell spezielle Folien auf den Skelettmuskel der Maus implantiert. Um mögliche Auswirkungen und insbesondere auch Unterschiede der TiAg-Verbundbeschichtung zu reinem Titan festzustellen, wurden sowohl reine Ti- als auch TiAg-Implantate mittels IVM hinsichtlich folgender Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Einfluss hat die TiAg-Beschichtung auf die Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur?
 - a) Wie werden mikrozirkulatorische Parameter beeinflusst?
 - b) Verursacht die TiAg-Beschichtung Endothelschäden?
2. Bewirkt die TiAg-Beschichtung eine mögliche inflammatorische Reaktion?
 - a) Welches Ausmaß hat die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion?

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Studie wurden sowohl gesunde männliche als auch weibliche C57BL/6J sowie C57BL/6J Tyr-Mäuse im Alter von zwei bis fünf Monaten und einem Körpergewicht von 25-35g verwendet. Die Tiere



Abb. 6: C57BL/6J Tyr Maus

wurden einzeln, mit freiem Zugang zu Wasser und Futter im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gehalten. Dabei herrschte in einem klimatisierten Raum ein zwölf Stunden Tag/Nachtrhythmus. Die Versuche waren gemäß des Tierschutzgesetzes §8 genehmigt und standen unter Aufsicht des zuständigen Tierschutzbeauftragten.

3.2 Implantatmaterial

3.2.1 CGS Medical GmbH

In dieser Studie wurde eine neuartige TiAg-Verbundbeschichtung getestet, deren Wirkmechanismus auf der „active release strategy“ (s. Einleitung) beruht und bei Implantaten jeglicher Art zum Einsatz kommen soll. Die bei den Versuchen verwendeten Test-Folien (Implantate) wurden durch die Firma CGS Medical GmbH (Karlstadt, Deutschland, www.cgsmedical.de, T. Zufraß, J. Huber) hergestellt, mit der die vorliegende Studie in Kooperation durchgeführt wurde.

3.2.2 Herstellung der Implantate

Im Modell der Rückenhautkammer wurden zwei verschiedene Implantate verglichen: Zum einen ein reines kommerzielles Ti-Implantat und zum anderen ein identisches Ti-Implantat mit einer zusätzlichen TiAg-Verbundbeschichtung, welche mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD = engl. physical vapor deposition) aufgebracht wurde (Abb. 7). Bei diesem Verfahren wurden zunächst kreisförmige Proben (3 mm Durchmesser x 0,1mm Dicke) aus einer kommerziellen Titan-Folie (99,995% Ti) gestanzt. Die Plättchen wurden nun mithilfe einer Ultraschall-Reinigungs-Anlage mit einer alkalischen Reinigungslösung gereinigt, mit reinem deionisierten Wasser gespült und durch einen Vakuum-Trockner

getrocknet. Im direkten Anschluss wurden die Proben mittels einem PVD-System Typ Z700 (SVS, Deutschland; Abb. 7 A) mithilfe zweier UBM-Quellen (UBM = unbalancierte-Magnetron-Kathodenzerstäubung) beschichtet, einer Ti- und einer Ag-Quelle (Abb. 7 B). Die Proben rotierten dabei zwischen diesen beiden Quellen mit einer Frequenz von 0,33Hz.

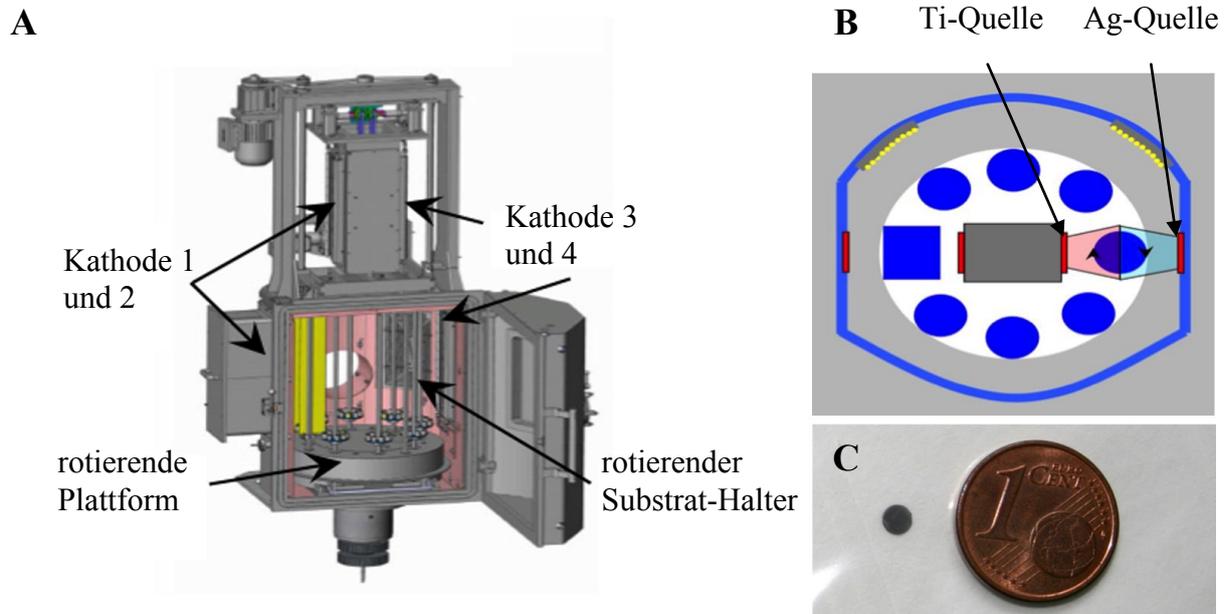


Abb. 7: Herstellung der Implantate mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (A & B) und Größenverhältnis eines fertigen Implantates im Vergleich zu einer ein Euro Cent Münze (C) [CGS Medical GmbH, Thorsten Zufraß].

Die Vorsäuberung wurde mittels eines dc-gepulsten (1000V/60kHz) Argon Plasma (1 E-2mbar) durchgeführt. Nach dem Reinigungsschritt folgte der Beschichtungsvorgang mit Argon als Zerstäubungsgas bei einem Druck von 4,2 E-3mbar mit einer Leistung an der Ti-Quelle von 4kW, welche im Verlauf auf 2kW gesenkt wurde sowie einer ansteigenden Leistung an der TiAg-Quelle von 0kW auf 4kW. Die finale TiAg-Verbundbeschichtung besaß einen Ag-Gehalt von etwa 70Gew%. Dieser Wert wurde an der Oberfläche der Implantate mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (EDA) analysiert. Jedes Implantat wurde schlussendlich einzeln steril verpackt.

3.3 Experimentelles Protokoll

Die Versuchstiere wurden in dieser Studie randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt: In der Kontrollgruppe (Kon, n=7) erhielten die Mäuse kein Implantat, in der Titangruppe (Ti, n= 6) hingegen ein reines Ti-Implantat. Versuchstieren der Titan-Silber-Gruppe (TiAg, n=7) wurden Ti-Implantate mit der zu untersuchenden TiAg-Verbundbeschichtung implantiert.

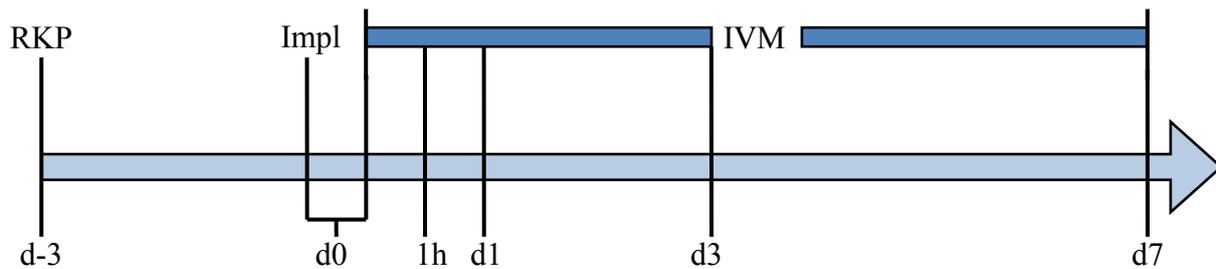


Abb. 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Zunächst wurde die Rückenhautkammer präpariert (RKP). Dies erfolgte drei Tage (d-3) vor der Implantation (Impl) der Ti- und TiAg-Implantate am Tag Null (d0). Die IVM-Aufnahmen (IVM) erfolgten im direkten Anschluss an die Implantation (d0) und eine Stunde danach (1h) sowie an den Tagen eins (d1), drei (d3) und sieben (d7) nach Implantation.

Der Versuch erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt elf Tagen und begann mit der Rückenhautkammer-Präparation (RKP) am Tag d-3 (Abb. 8), wobei an diesen Tagen randomisiert Mäuse aller drei Versuchsgruppen präpariert wurden. Nach einer dreitägigen Erholungspause erfolgte an d0 die Implantation (Impl) der Implantate, woraufhin sich im direkten Anschluss die erste und nach einer Stunde (1h) die zweite intravitalmikroskopische Aufnahme (IVM) mehrerer Beobachtungsareale der Rückenhautkammer sowie eine makroskopische Übersichtsaufnahme des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer anschloss. Beide Untersuchungen wurden an den Tagen eins (d1), drei (d3) und sieben (d7) nach Implantation wiederholt. Am Ende des Versuchszeitraums wurde den Tieren unter Narkose Blut entnommen, daraufhin erfolgte die Tötung mithilfe einer Überdosis der Narkotika Ketamin und Xylazin. Die Implantate wurden entnommen, in Isopropanol gelagert und hinsichtlich der Intaktheit ihrer Oberfläche mithilfe eines EDA Detektors (EDAX mit Iridium Ultra Software) durch die Firma CGS Medical GmbH analysiert. Im letzten Arbeitsschritt erfolgte eine histologische Asservierung des Rückenhautkammer-Gewebes.

3.4 Modell der Rückenhautkammer

3.4.1 Das Rückenhautkammer-Modell

In dieser Studie wurde das Modell der Rückenhautkammer verwendet, welches ein Standardverfahren für *in vivo* Studien zur Analyse mikrozirkulatorischer sowie inflammatorischer Parameter darstellt. Erste Erfahrungen und Versuche mit einem derartigen Verfahren konnte Sandison 1924 sammeln, indem er eine transparente Beobachtungskammer in Ohren von Ratten implantierte [Sandison 1924, Sandison 1928]. Algire wiederum wandte eine weiterentwickelte Methode 1943 das erste Mal erfolgreich an der Rückenhaut von Mäusen an [Algire 1943]. Bis heute hat sich diese mikrochirurgische Präparationstechnik weiter verbessert und kommt mittlerweile bei Ratten [Papenfuss et al 1979], immunkompetenten Mäusen [Cardon et al 1970], Nacktmäusen [Lehr et al 1993] sowie Hamstern [Endrich et al 1980] zum Einsatz. Mithilfe der Rückenhautkammer ist es über intravitalmikroskopische Aufnahmen möglich, mikrozirkulatorische und inflammatorische Veränderungen über einen kontinuierlichen Zeitraum von einigen Wochen an lebenden, wachen Tieren zu beobachten [Menger et al 2002].

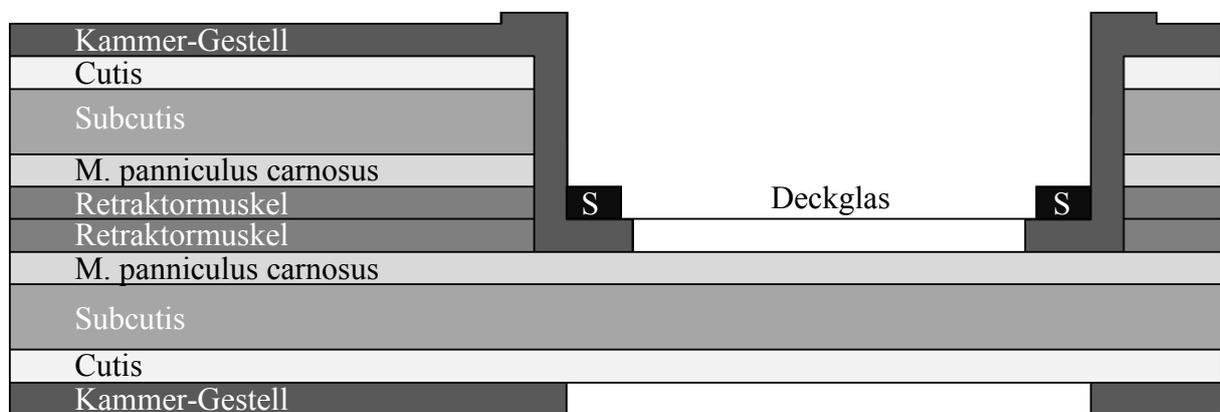


Abb. 9: Schema der verschiedenen Schichten der Rückenhautkammer. Dargestellt sind das Kammer-Gestell, Cutis und Subcutis, Musculus panniculus carnosus sowie der Retraktormuskel. Das Deckglas wurde mithilfe eines Sprengtringes (S) fixiert [Abbildung modifiziert nach Laschke et al 2011].

Die Rückenhautkammer ist während des gesamten Versuchszeitraumes über ein abnehmbares Deckglas zugänglich, wodurch Implantate oder Transplantate zu jeder Zeit platziert oder entfernt werden können. Aufgebaut ist die Rückenhautkammer aus Cutis, Subcutis mit

Musculus panniculus carnosus sowie Retraktormuskel (Abb. 9) zweier aufeinander platzierter Hautfalten. Ein Teil einer Hautfalte wird in einer Größe, die dem späteren Beobachtungsfeld entspricht, mit all seinen drei Schichten inklusive Retraktormuskel der gegenüberliegenden Hautfalte entfernt. Die Intravitalmikroskopie beinhaltet somit Aufnahmen von Gefäßen des quergestreiften Musculus panniculus carnosus.

3.4.2 Anästhesie

Zur Anästhesie der Versuchstiere wurden Ketamin (90mg/kg KG) und Xylazin (25mg/kg KG) verwendet. Die Narkoselösung bestand aus einer 10%igen Stammlösung Ketamin (100mg/ml, Bela-pharm®) und einer 2%igen Stammlösung Xylazin (20mg/ml, Rompun®, Bayer), welche in einer 1ml Spritze im Mischverhältnis 3:1 (0,6ml Ketamin, 0,2ml Xylazin) hergestellt wurde. Sie diente sowohl zur Initialnarkose als auch zur Aufrechterhaltung der Anästhesie. Nach Ermittlung des Körpergewichts der Versuchstiere erfolgte die Anästhesie mittels einer intraperitonealen Injektion der Narkoselösung in einer dem Körpergewicht angepassten Dosierung (0,1ml/10kg KG). Anschließend wurden die Tiere mit einem elektrischen Rasierer und zusätzlich mit einem Enthaarungsmittel an der Stelle der Präparation enthaart.

3.4.3 Präparation der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer besteht aus einer Vorder- und Hinterseite, welche beide aus Titan gefertigt und ca. 4g schwer sind (Abb. 10B). Die Hinterseite der Rückenhautkammer verfügt über drei Gewinde, über die beide Kammerteile mithilfe von drei Muttern fixiert werden. Zur Präparation der Hautschichten wurde mikrochirurgisches Operationsbesteck verwendet (Abb. 10A).

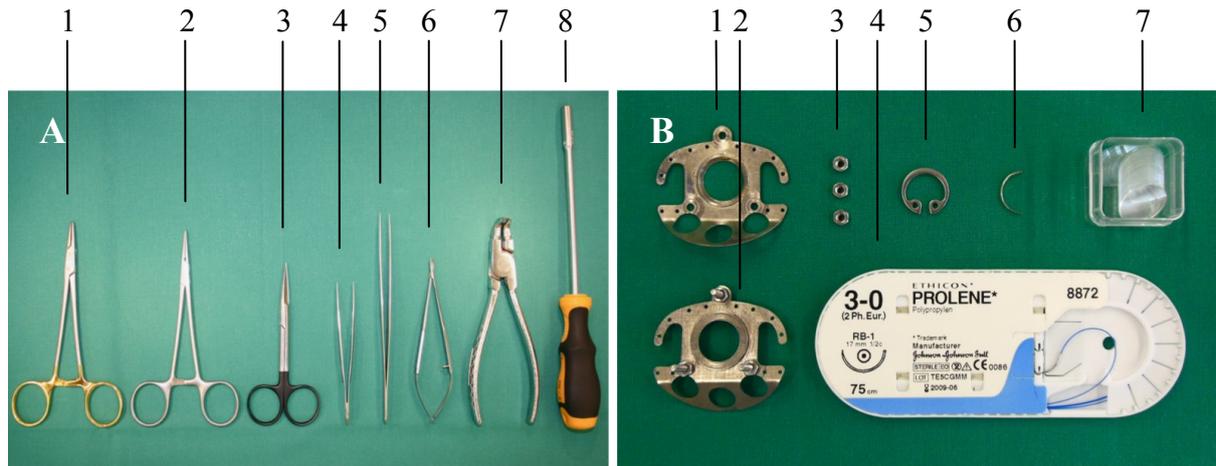


Abb. 10: Instrumente sowie Bestandteile und Utensilien zur Präparation der dorsalen Rückenhautkammer:

A: Nadelhalter (1) und anatomische Klemme (2) zur Fixation der Schrauben der Hinterseite des Rückenhautkammer-Gestells, Schere (3) und Pinzette (4) zur Präparation des Hautdeckels, Mikropinzette (5) und Mikrofederschere (6) zur Präparation der Rückenhautkammer, Zange (7) zur Platzierung des Sprengringes sowie Schraubenzieher (8) zum Anziehen der Schrauben.

B: Die Rückenhautkammer besteht aus einer Vorder- (1) und einer Rückseite (2), welche miteinander über insgesamt drei Schrauben (3) verbunden werden. Lediglich die Rückseite des Rückenhautkammer-Gestells wird mithilfe einer chirurgischen Nadel (6) und einem 3-0 Prolenefaden (4) an der Rückenhaut der Maus angenäht. Nach dem Verschluss der präparierten Fläche mit einem Deckglas (7) wird dieses über einen Sprengring (5) fixiert.

Nach der Vorbereitung des Operationsplatzes und des Versuchstieres wurde die Maus zur Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur auf einer auf 37°C vorgeheizten Wärmeplatte platziert (Abb. 11A). Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde Augensalbe aufgetragen (Bepanthen®, Bayer) und es folgte eine Desinfektion der enthaarten Haut (Octeniderm®, Schülke&Mayr). Danach wurde die Rückenhaut mittels zweier Haltefäden (Dermafil 4/0, SMI AG) an einem Haltegestell so aufgespannt, dass die großen dermalen Gefäße beider Hautfalten nahezu parallel übereinander lagen. Dadurch wurde gewährleistet,

dass die Rückenhautkammer mittig platziert wurde, um im weiteren Verlauf des Versuches nicht nach lateral zu verrutschen. Überprüft wurde die Lage durch ein von hinten auf die Rückenhaut einfallendes Licht einer Schwanenhalslampe (KL 200, Leica), wodurch die Gefäße sichtbar wurden (Abb. 11B).

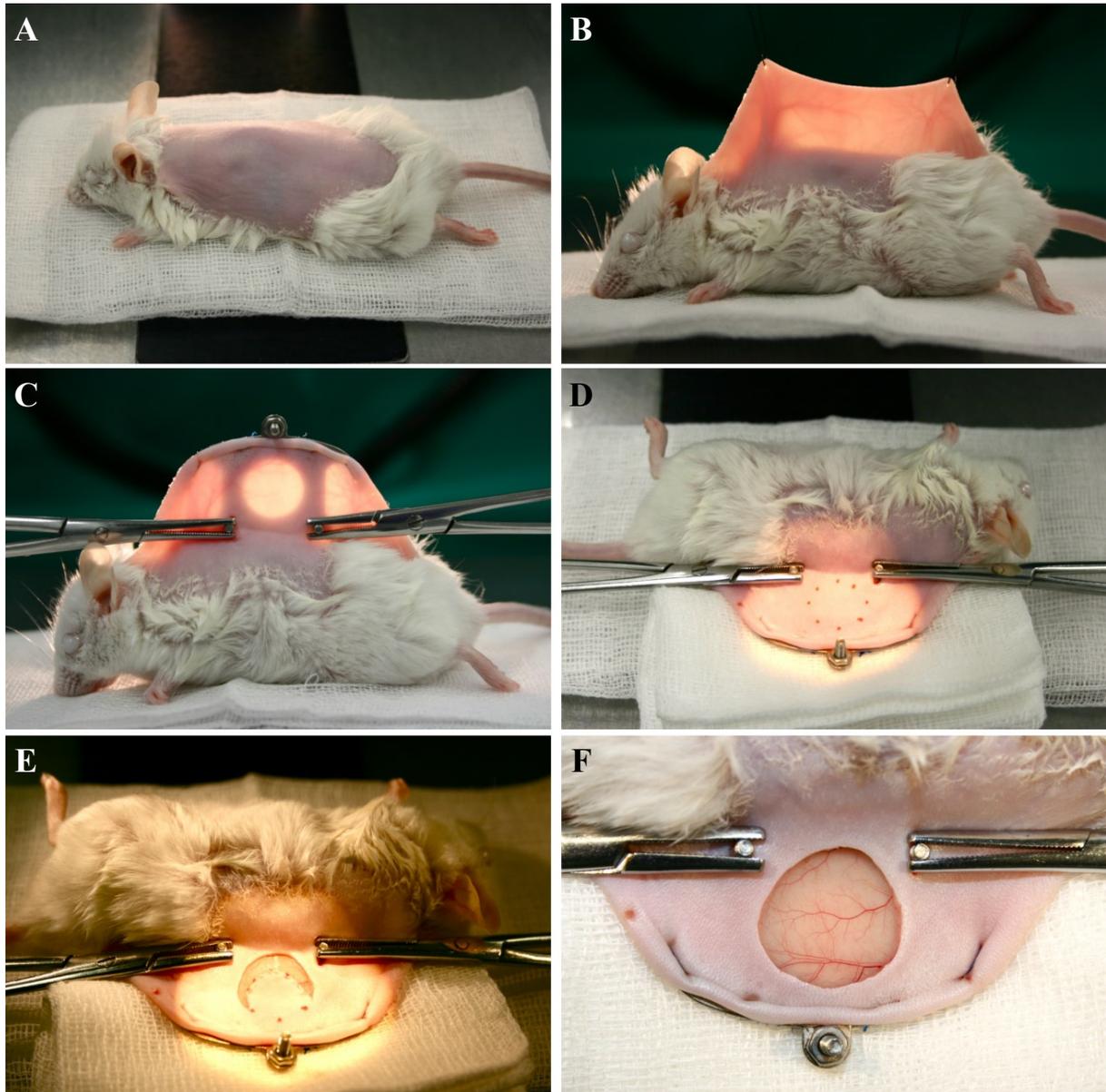


Abb. 11: Arbeitsschritte der Präparation der dorsalen Rückenhautkammer: Zunächst wurde die Maus an den Stellen der Präparation und der Anlageflächen der Rückenhautkammer enthaart (A). Die Rückenhaut wurde nun mithilfe von zwei Haltefäden nach dorsal aufgespannt (B). Nach Anlage der Rückenhautkammer-Hinterseite erfolgte eine Fixation der durch die Haut präparierten Schrauben über jeweils eine anatomische Klemme (C). Im nächsten Schritt wurde das zu entfernende Hautareal markiert (D), dessen Präparation kreisrund erfolgte (E). Im finalen Präparationsschritt wurde das Bindegewebe bis zum M. panniculus carnosus entfernt (F).

Die Hinterseite der Rückenhautkammer wurde nun ebenfalls unter Gegenlichtkontrolle leicht kranial des Beckenkammes platziert, um während des Versuchszeitraumes Abschürfungen der Haut zu verhindern. Die Kammer-Rückseite wurde an ihrem Oberrand mit einem 3-0 Prolenefaden mittels vierer Einzelknopfnähte so an der Haut fixiert, dass die oberste Schraube oberhalb der Rückenhaut der Maus verlief. Nachdem mit einer Präparierschere zwei Inzisionen in einem Sicherheitsabstand zu den Hauptstämmen der Gefäße geschaffen wurden, um diese nicht zu verletzen, konnten die beiden unteren Schrauben mit jeweils einer anatomischen Klemme fixiert werden (Abb. 11C). Der sich unter Gegenlicht nun abzeichnende Kreis entsprach dem zukünftigen Beobachtungsfenster und wurde mit einem Stift durch Punkte markiert (Abb. 11D). Nun konnten die Haltefäden gelöst werden und das Versuchstier wurde auf die Seite umpositioniert, sodass die zu präparierende Rückenhaut nach oben zeigte. Unter einem Stereomikroskop (M 651 MSD, Leica) erfolgte die Entfernung der Cutis, Subcutis sowie des oberen Musculus panniculus carnosus und beider Retraktormuskeln (Abb. 11E). Der untere Musculus panniculus carnosus wurde zur besseren Sicht bei den im Versuch folgenden intravitalmikroskopischen Aufnahmen vom übrig gebliebenen Bindegewebe befreit. Beide Arbeitsschritte erfolgten mithilfe von sterilem Mikrooperationsbesteck. Das final präparierte Beobachtungsfeld wurde mit einem Durchmesser von ca. 15mm bewusst etwas größer gewählt als das später tatsächliche Beobachtungsfeld von etwa 11mm Durchmesser (Abb. 11F). Dadurch wurden einerseits Kompressionen der Rückenhautkammer auf das darunter liegende Gewebe und somit einer schlechteren Durchblutung vorgebeugt und andererseits limitierte dies das Einwachsen von Granulationsgewebe in das Beobachtungsfenster, wodurch sonst im Verlauf die Sicht unter dem Intravitalmikroskop hätte behindert werden können. Während der gesamten Präparation wurde die Rückenhautkammer regelmäßig mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Mikroblutungen wurden mittels feuchter Wattestäbchen und Kompressen gestillt. Im nächsten Schritt wurde die Vorderseite der Rückenhautkammer mit insgesamt drei Schrauben mit der Hinterseite fest verbunden. Es war sehr wichtig beim Anziehen der Schrauben mit dem Schraubenzieher darauf zu achten, dass diese nicht zu fest angezogen wurden, da ansonsten die Blutzufuhr in der Rückenhautkammer unterbrochen worden und das dortige Gewebe nekrotisiert wäre. Das Beobachtungsfenster wurde

schließlich nach erneuter Befeuchtung mit einem Deckglas luftabschlussfrei verschlossen und mittels Sprengring fixiert. Sowohl Deckglas als auch Sprengring konnten während des gesamten Versuchszeitraums jederzeit abgenommen und gewechselt werden, wodurch ein Zugang zur Rückenhautkammer immer gewährleistet war. Die Dauer der Präparation betrug insgesamt in etwa 50 Minuten, danach erwachten die Tiere aus ihrer Narkose. Den Mäusen wurde nach der Rückenhautkammer-Präparation eine Erholungsphase von drei Tagen gegönnt, in der sie - wie auch über den gesamten Versuchszeitraum - ein normales Fress- und Orientierungsverhalten zeigten, was auf eine gute Verträglichkeit der Rückenhautkammer rückschließen lässt.

3.4.4 Implantation der Ti- & TiAg-Implantate

Die Implantation der einzeln steril verpackten Implantate erfolgte am Tag null, wobei diese mit einer Dicke von 0,1mm so gewählt waren, dass sie zu keiner mechanischen Behinderung der Mikrozirkulation führten. Nach Entfernung des Deckglases erfolgte die Platzierung des Implantates mittig in der Rückenhautkammer (Abb. 12) und es folgte der Verschluss mithilfe eines frischen Deckglases und Sprengring. Im direkten Anschluss wurde mit den IVM-Aufnahmen begonnen. Von weiteren Eingriffen und Manipulationen an der Rückenhautkammer wurde im gesamten restlichen Versuchszeitraum abgesehen.

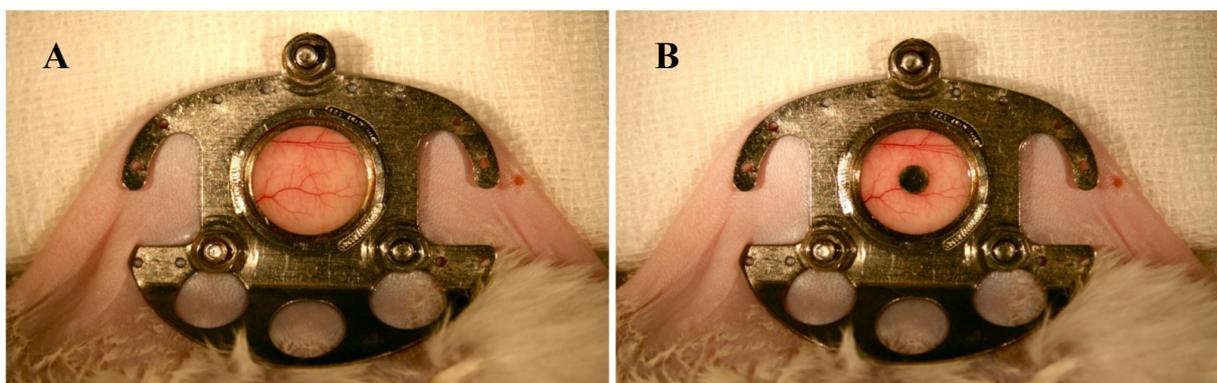


Abb. 12: Final präparierte Rückenhautkammer vor (A) und nach (B) Platzierung eines Implantates.

Die Implantation der Plättchen erfolgte dabei verblindet, es war über den gesamten Versuchszeitraum also nicht möglich zwischen Ti- und TiAg-Gruppe zu unterscheiden. Erst nach Analyse der Werte fand eine Entblindung und somit eine konkrete Zuordnung der einzelnen Versuchstiere zu der jeweiligen Gruppe statt.

3.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Aufbau des IVM Systems

Zur Analyse der Mikrozirkulation kam in dieser Studie die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Dazu wurden die Versuchstiere narkotisiert und seitlich, mit dem Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer nach oben auf einer speziellen Bühne fixiert (Abb. 13 B & C). Es herrschte während der gesamten Versuchszeit eine konstante Raumtemperatur von 21-23°C.

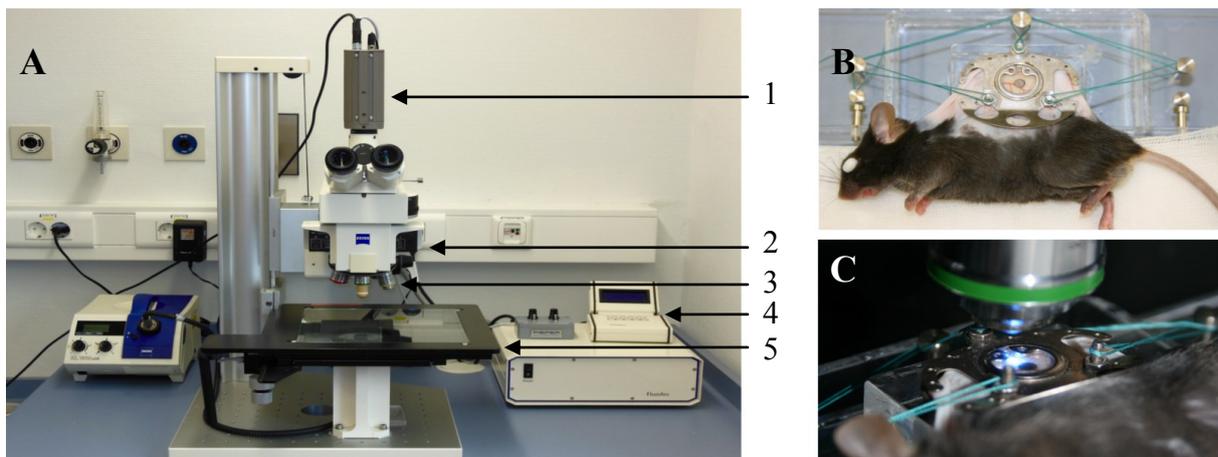


Abb. 13: Aufbau des IVM-Systems (A) mit Mikroskop und CCD-Kamera (1), Filtersystem (2), Objektivrevolver (3), Belichtungssteuerungs-Einheit (4) und Trägertisch (5). Das zu untersuchende Tier wurde auf einer speziellen Bühne für die IVM-Aufnahmen fixiert (B & C).

Der Arbeitsplatz bestand aus einem Intravitalmikroskop (Axiotech® vario 100, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit CCD-Videokamera (FK 6990 IQ-S, Piper, Schwerte, Deutschland), Trägertisch, Filtersystem, Objektivrevolver und Belichtungssteuerung (Abb. 13 A). Zur Anregung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden sowohl ein blauer Filterblock (Exzitation: 450-490nm; Emission: >510nm) als auch ein grüner Filterblock

(Exzitation: 534-558nm; Emission: >580nm) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Lampe (HBO 100W, Osram GmbH, München, Deutschland), deren Intensität sich mithilfe einer Belichtungssteuerung stufenlos einstellen ließ. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 20-fachen Vergrößerung des Objektivs (LUC Plan FL x 20/0,45W, Olympus GmbH). Die Einzelmessungen wurden in Videosequenzen von jeweils etwa 30 Sekunden aufgezeichnet. Zu diesem Zweck diente eine schwarz-weiß CCD-Videokamera (CCD = engl. charge-coupled device, dt. ladungsgekoppeltes Bauelement), welche die Sequenzen auf einen Monitor übertrug, über den live die Positionen verschiedener Beobachtungsfelder (ROI = region of interest) innerhalb der Rückenhautkammer festgelegt und verfolgt werden konnten. Ein Echtzeitgenerator (AG-7350, Panasonic, Deutschland) leitete diese Bildinformation weiter an einen DVD-Recorder, auf dem die Aufnahmen schlussendlich auf DVDs gesichert wurden.

3.5.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Analyse der Blutzirkulation wurden 0,1ml Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran, 2%, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 0,1ml Rhodamin 6 G (1%, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verabreicht. Die Applikation dieser Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte retrobulbär, da dort durch gute Vaskularisation eine schnelle Aufnahme der Farbstoffe gewährleistet ist.

Der physikalische Vorgang, bei dem ein Körper zuvor zugeführte Energie als Strahlung in Form von Licht wieder abgibt, wird als Lumineszenz bezeichnet. Dabei werden in Abhängigkeit der Dauer der Lichtemission nach Beenden der energetischen Anregung zwei Unterformen unterschieden: Bei der Phosphoreszenz bleibt die Lichtemission über einen bestimmten Zeitraum bestehen, wohingegen diese bei der Fluoreszenz zeitgleich mit Beenden der Anregung, genauer innerhalb von 10^{-8} Sekunden endet. Es werden je nach Energiequelle u.a. Röntgen-, Kathoden- oder wie in dieser Studie Photolumineszenz voneinander abgegrenzt, bei der ein Elektron durch Absorption eines Lichtphotons Energie aufnimmt. Dadurch wird das entsprechende Elektron aus seinem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau angehoben und damit in einen angeregten Zustand versetzt. Dieser Zustand ist aus energetischen Gründen instabil, weshalb das Elektron die Mehrenergie wieder in Form

eines Photons emittiert und dabei in seinen Grundzustand zurückkehrt [Damjanovich et al 2008]. Dieser Mechanismus liegt den Fluoreszenzfarbstoffen zugrunde, welche verschiedene Strukturen des Organismus binden und diese dadurch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen können. Außerdem besitzen sie die Eigenschaft, dass sie nur durch einen bestimmten Wellenlängenbereich des Lichtes angeregt werden und daraufhin ebenfalls in für sie charakteristischen Wellenlängen Licht emittieren. Die Fluoreszenzmikroskopie hat einen hohen Stellenwert in der Biowissenschaft, da sie eine quantitative Analyse biologischer Prozesse mit einer hohen Sensitivität und Spezifität ermöglicht [Eggeling et al 2005]. Die in dieser Arbeit benutzten Fluoreszenzfarbstoffe werden im Folgenden näher erläutert:

FITC-Dextran

FITC-Dextran ist ein Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe eine erhöhte Kontrastierung zwischen Intra- und Extravasalraum gelingt. Dadurch wird die Analyse mikrozirkulatorischer Parameter wie u.a. der funktionellen Kapillardichte, des Gefäßdurchmessers und der intravasalen Fließgeschwindigkeit möglich [Svensjö et al 2012, Schröder et al 1976]. Die Exzitation dieses Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt durch blaues Licht mit einer Wellenlänge zwischen 450 und 490nm bei einem Exzitationsmaximum von 490nm. Das daraufhin emittierte gelb-grüne Licht hat ein Emissionsmaximum von 520nm.

FITC-Dextran besteht aus dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff FITC sowie dem Polymer Dextran. Diese beiden Moleküle sind irreversibel über eine Thiocarbamoyl-Bindung miteinander verknüpft, wodurch FITC-Dextran im Gegensatz zu reinem FITC, welches schneller über die Niere ausgeschieden wird, eine längere intravasale Verweildauer besitzt [Schröder et al 1976]. Diese Eigenschaft beruht auf dem relativ großen Molekulargewicht des Dextrans von 150kDa, wodurch eine Extravasation unter physiologischen Bedingungen nicht stattfindet und FITC-Dextran etwa vier Stunden intravasal verbleibt. Dort bindet es weder an Endothelzellen noch an individuelle Blutzellen, sondern färbt lediglich das Blutplasma an. Es wird hepatisch metabolisiert und renal eliminiert [Kubulus et al 2004].

Rhodamin 6G

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G ist ein nicht selektiver Leukozyten-Marker. Er färbt Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten an und wurde erstmals 1941 durch Johannes als ein spezifischer, vitaler Farbstoff für Mitochondrien beschrieben [Finkenauer et al 1999, Johannes 1941, Bereiter-Hahn et al 1983]. Er wird mit einer Wellenlänge von 515-560nm bei einem Exzitationsmaximum von 525nm (grünes Licht) angeregt und besitzt ein Emissionsmaximum von 555nm (rot-gelbes Licht).

Bei physiologischem pH-Wert besitzt Rhodamin 6G lipophile Eigenschaften [Finkenauer et al 1999, Johannes 1941] und färbt bei einer Konzentration von bis zu 10^{-7} mmol Mitochondrienmembranen und darüber hinaus zusätzlich das endoplasmatische Retikulum der Leukozyten an [Bereiter-Hahn et al 1983]. Durch die Applikation einer Konzentration von 0,06-0,2mg/kg KG können praktisch alle Granulozyten und Monozyten über einen Zeitraum von 60 Minuten markiert werden [Baatz et al 1995].

3.5.3 IVM-Beobachtungsfelder

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen mit entsprechender Dokumentation erfolgten an den fünf bereits erläuterten Untersuchungszeitpunkten (d0, 1h, d1, d3, d7). Die Auswahl der Beobachtungsfelder, der sogenannten ROIs (region of interest), erfolgte aus vier Quadranten innerhalb der Rückenhautkammer, um eine repräsentative Beurteilung zu gewährleisten. Zuerst wurden zur Untersuchung der Kapillardichte vier repräsentative, zufällig ausgewählte Kapillarfelder aufgenommen. Zur Analyse aller weiteren Parameter wurden zentrale und periphere Beobachtungsfelder verwendet. Zentral bedeutete dabei, dass der zu untersuchende Bereich in direkter Lagebeziehung zum mittig in der Rückenhautkammer positionierten Implantat gelegen war. Periphere ROIs waren hingegen näher am Rande der Rückenhautkammer lokalisiert. Es wurden ebenfalls sowohl zentral als auch peripher jeweils vier Beobachtungsfelder untersucht, somit pro Parameter insgesamt acht Aufnahmen. Es wurden Venolen mit einem Durchmesser von 30 - 90µm analysiert, welcher senkrecht zum Gefäßverlauf gemessen wurde. Zusätzlich war ein nahezu geradliniger Verlauf der Venolen für die Messung der Fließgeschwindigkeit und zur Leukozyten Zählung von Vorteil. Die Verläufe der Venolen, inklusive ihrer Zu- und Abflüsse sowie der Fließrichtung wurden

skizziert und ihre Position in der Rückenhautkammer auf Dokumentationsblättern markiert. Dies diente dazu, an jedem IVM-Untersuchungszeitpunkt die Venolen wiederzufinden und erneut zu analysieren. Sämtliche ROIs wurden über einen Zeitraum von mindestens 20 Sekunden aufgenommen. Zusätzlich zu diesen eben erläuterten Aufnahmen wurden mit einem Stereomikroskop Übersichtsaufnahmen der Rückenhautkammer angefertigt, um makroskopische Veränderungen der Rückenhautkammer feststellen zu können.

3.5.4 Auswertung mittels CapImage[®]-Analyse-Software

Die an den Untersuchungstagen aufgenommenen IVM-Aufnahmen wurden off-line mithilfe der Computer-assistierten Analyse-Software CapImage[®] (Version 8.0, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Hierbei wurden für alle Parameter zusammenhängende Videosequenzen von 20 Sekunden untersucht. Insgesamt wurden dabei für jeden Untersuchungstag zur Auswertung der funktionellen Kapillardichte vier Aufnahmen analysiert, für die Parameter Durchmesser, Extravasation, Erythrozytenfließgeschwindigkeit sowie zur Analyse der Leukozyten jeweils acht (vier zentrale und vier periphere) Aufnahmen. Dabei wurde darauf geachtet, dass an jedem Analysetag dieselben Venolen zur Auswertung der Parameter gewählt wurden. Die untersuchten Parameter werden im Folgenden näher erläutert:

Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte beschreibt das Ausmaß der mikrozirkulatorischen Perfusion eines Gewebes. Zur Berechnung wurden in einem zuvor platzierten Rechteck bei laufender Videoaufnahme alle perfundierten Kapillaren nachgezeichnet (Abb. 14A). Die CapImage[®]-Software errechnete nun die funktionelle Kapillardichte, definiert als Länge aller perfundierten Kapillaren im markierten Beobachtungsfeld in cm/cm^2 .

Durchmesser

In der vorliegenden Studie wurden u.a. zur besseren Vergleichbarkeit der Venolen zu Beginn und im Verlauf nur Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 30 und 90µm ausgewählt. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran war eine genaue Abgrenzung der Gefäßwand zur Umgebung gewährleistet, wodurch der Durchmesser eindeutig bestimmt werden konnte. Hierzu wurden fünf zum Gefäßverlauf senkrechte Linien eingezeichnet, aus deren Mittelwert sich der Durchmesser in µm ergab (Abb. 14B).

Extravasation

Die Extravasation ist ein Maß für Endothelschäden, durch die Blutplasma nach extravasal austreten kann. Dargestellt werden konnte dieser Parameter ebenfalls mithilfe von FITC-Dextran, wodurch bei vorhandener Gefäßwandschädigung eine verminderte Kontrastierung des Intra- und Extravasalraumes resultierte. Zur Analyse wurden mittlere Grauwerte eines direkt an das Gefäß angrenzenden extravasalen Areals (G_{mean1}) und eines intravasalen Areals (G_{mean2}) verwendet. Die entsprechenden Areale wurden in der CapImage[®]-Software als Kreise festgelegt (Abb. 14C). Errechnet wurde die Extravasation (E1/E2) über den Quotienten aus $G_{\text{mean1}}/G_{\text{mean2}}$.

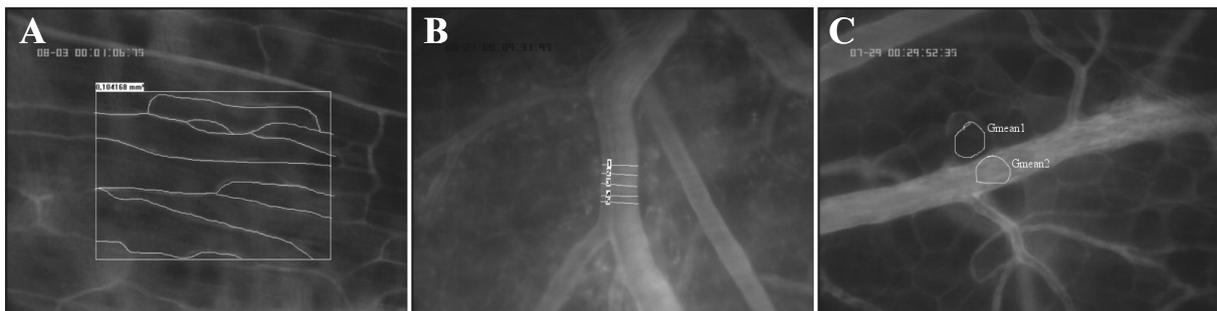


Abb. 14: Intravitalmikroskopische Darstellung der Gefäße und Auswertung der zu messenden Parameter mittels CapImage[®]-Software: Funktionelle Kapillardichte (A), Durchmesser (B) sowie Extravasation (C).

Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Line-Shift-Methode diente der Berechnung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Dazu wurde mithilfe der CapImage[®]-Software in Fließrichtung, parallel zum Gefäßverlauf eine Gerade in die Venole eingezeichnet (Abb. 15A). Anhand dieser Messlinie berechnete die Software über eine vorgegebene Zeitspanne von zehn Sekunden ein Grauwerte-Muster, in dem vorbeifließende Erythrozyten als dunkelgraue schräge Linien und das Blutplasma als hellgraue schräge Linien dargestellt wurden (Abb. 15B). Die Steigung dieser dunkelgrauen Linien spiegelte die Geschwindigkeit der Erythrozyten wieder, welche durch die CapImage[®]-Software anhand von zehn durch den Untersucher markierten Linien errechnet wurde [De Vriese et al 2000]. Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit ergab sich nun in $\mu\text{m/s}$.

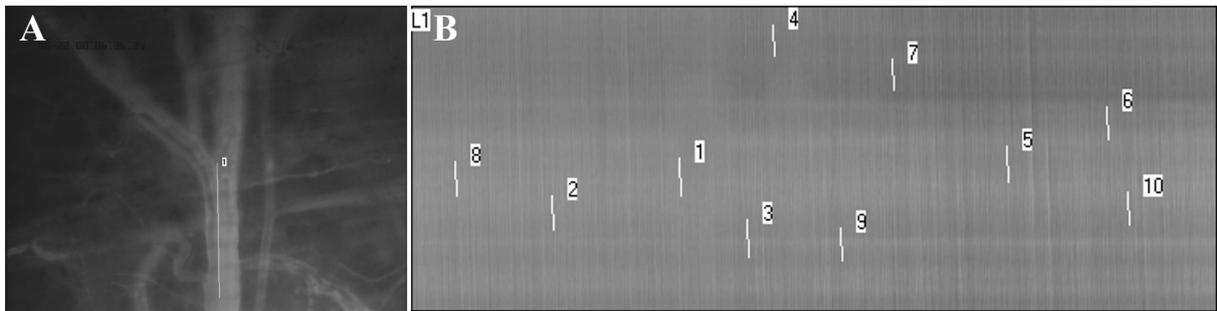


Abb. 15: Intravitalmikroskopische Darstellung der Gefäße und Auswertung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit mittels CapImage[®]-Software. In die Mitte des Gefäßes wurde in Fließrichtung eine Messlinie gelegt (A) und anschließend die gemessenen Daten in einem Line-Shift-Diagramm dargestellt (B).

Rollende Leukozyten

Alle Leukozyten wurden mit Rhodamin 6G angefärbt, wobei anhand ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel zwischen rollenden, adhärenen sowie frei fließenden Leukozyten differenziert wurde. Als rollende Leukozyten wurden die Zellen definiert, die sich im Rahmen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion am Endothel mit einer Fließgeschwindigkeit von weniger als zwei-fünftel der mittleren Geschwindigkeit entlang bewegten und dies auch innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes von 20 Sekunden durchgängig taten (Abb. 16). Ihr Anteil wurde in Prozent von der Gesamtzahl der Leukozyten angegeben.

Adhärente Leukozyten

Es folgte die Auszählung der adhärennten Leukozyten. Als solche wurden nur die Leukozyten bezeichnet, die über den gesamten Zeitraum der vorgegebenen analysierten 20 Sekunden am Endothel hafteten und sich weder bewegten noch von diesem ablösten (Abb. 16). Der in Anzahl pro Quadrat-Millimeter der Endotheloberfläche (n/mm^2) angegebene Wert wurde aus dem Durchmesser und der Länge des untersuchten Gefäßsegmentes unter der Annahme einer zylindrischen Gefäß-Geometrie errechnet.

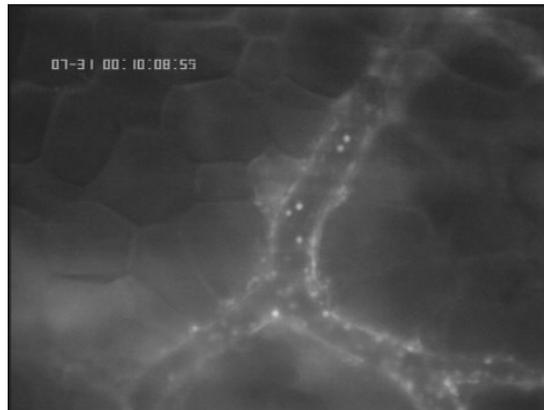


Abb. 16: Intravitalmikroskopische Darstellung der Gefäße und Auswertung der rollenden sowie adhärennten Leukozyten mittels CapImage[®]-Software.

Die nun folgenden drei Parameter wurden aus den zuvor mittels CapImage[®]-Software ausgewerteten Daten errechnet:

Blutvolumenfluss

Der Blutvolumenfluss (VQ) gibt die Menge an Blut an, die pro Zeiteinheit einen bestimmten Gefäßabschnitt passiert. Berechnet wurde sie mithilfe der folgenden Formel:

$$VQ \text{ (pL/s)} = (\pi (d/2)^2 (v/1,6)) / 1000$$

Hierbei bezeichnet d den Gefäßdurchmesser und v die Fließgeschwindigkeit. 1,6 ist der Baker-Wayland-Faktor zur Korrektur eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils in Blutgefäßen mit einem Durchmesser von über $20\mu\text{m}$. Parabol bedeutet hier, dass die Fließgeschwindigkeit im Randbereich des Gefäßes geringer ist als in seinem Zentrum.

Wandscherrate

Die Wandscherrate ist assoziiert mit einer gestörten Endothelfunktion und wurde berechnet, da an den inneren Gefäßwänden auftretende Scherkräfte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflussen können [Woo Park et al 2013]. Die zur Berechnung verwendete Formel lautet:

$$\gamma = 8 (v/d)$$

Der errechnete Wert wurde in s^{-1} angegeben.

Zellfluss

Der Zellfluss innerhalb der Venolen wurde ebenfalls in einem Zeitraum von 20 Sekunden untersucht. Dieser umfasste die gesamte Anzahl an rollenden sowie an frei fließenden Leukozyten pro Minute (n/min).

3.6 Blutentnahme und Implantatasservierung

Am Ende eines jeden Versuches fand zunächst eine Blutentnahme an der narkotisierten Maus statt. Diese erfolgte retrobulbär und wurde mithilfe eines automatischen Hämatologie-Analysators (Sysmex, KX-21) untersucht. Es folgte die Tötung der Maus und eine anschließende Gewebeentnahme. Dafür wurde das Implantat vorsichtig aus der Rückenhautkammer entfernt und in Isopropanol gelagert. Die entnommenen Implantate wurden zur weiteren Analyse ihrer möglicherweise veränderten Oberflächenbeschaffenheit mithilfe eines EDA Detektors (EDAX mit Iridium Ultra Software) untersucht.

3.7 Histologische Analyse

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Analyse wurden Trapez-förmige Gewebeausschnitte aus dem Bereich der Rückenhautkammer so entnommen, dass sie in Bezug auf das zuvor entfernte Implantat repräsentative Anteile sowohl zentral als auch peripher enthielten.

Das Gewebe wurde zunächst in einer 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung in der Histokinette (TP 1020, Leica, Benzheim) über eine aufsteigende Alkoholreihe und die Einbettung durch eine Einbettmaschine (EG 1160, Leica,

Benzheim) in Paraffin. Aus den so entstandenen Paraffinblöcken wurden nun mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM 2145, Leica, Benzheim) 4µm dicke Serienschnitte angefertigt. Gefärbt wurden diese histologischen Schnitte zunächst mit Hämatoxylin und Eosin, um eine Übersicht über das entnommene Gewebe zu erlangen. Unter dem Licht-Mikroskop (BX 51, Olympus, Hamburg, Deutschland) konnten Cutis, Subcutis sowie Musculus panniculus carnosus untersucht werden (Abb. 17).

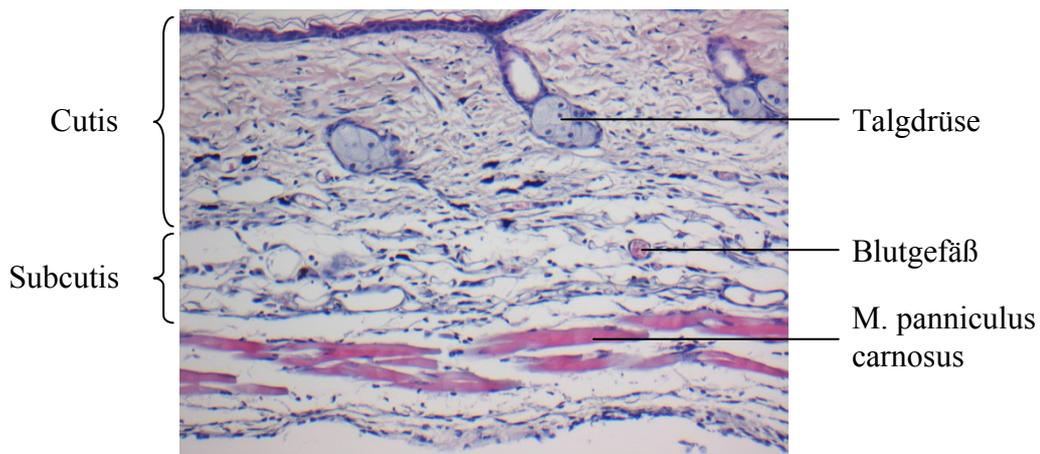


Abb. 17: Repräsentative Aufnahme eines HE gefärbten Präparates der Rückenhautkammer.

CAE-Färbung

Um eine möglicherweise abgelaufene inflammatorische Reaktion besser beurteilen zu können, wurden außerdem zwei weitere Färbungen durchgeführt. Dabei diente die Chloracetat-Esterase-Färbung (CAE) als Übersichtsfärbung, indem sie alle in das Gewebe infiltrierenden Leukozyten über den Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase markierte.

F4/80-Färbung

Zur näheren Differenzierung der Zellen wurden infiltrierende Makrophagen immunhistochemisch über Markierung des F4/80-Antigens gefärbt. Dazu erfolgte eine Inkubation der Gewebsschnitte mit einem primären Antikörper (Ratte-anti-F4/80-Maus, MCA 497, 1:10, Serotek, München, Deutschland) bei 4°C über Nacht und anschließend eine Inkubation des sekundären, alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Anti-Ratten-Antikörper

(Ziege, SC 2011, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland). Die AP-Bindungsstellen wurden mittels Permanent Rot (Dako, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen.

3.8 Statistische Analyse

Die zur statistischen Analyse erhobenen Werte wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel[®] eingegeben. Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben und mit der SigmaPlot[®] Software (Version 10.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen dargestellt. Zur Erfassung von möglichen Unterschieden zwischen den drei untersuchten Versuchsgruppen sowie zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurde mithilfe der statistischen Analyse-Software SigmaStat[®] (Version 3.5, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) ein Varianzhomogenitätstest mittels Two-Way repeated measure ANOVA und multiplen Holm-Sidak Post Test angewandt. In den Abbildungen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen sowie zwischen den Untersuchungszeitpunkten angegeben (a, b, *, #). Definiert als signifikant waren dabei errechnete Werte ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine und makroskopische Beobachtungen

Die Rückenhautkammer-Präparation im Allgemeinen sowie die Implantation der reinen Ti- als auch der TiAg-Folien wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Sie zeigten ein normales Orientierungs- sowie Fress- und Trinkverhalten und waren in ihrer körperlichen Verfassung nicht beeinträchtigt. Makroskopisch zeigte die Rückenhautkammer aller drei Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen hinsichtlich einer Inflammation oder der Ausbildung eines Ödems, keine Blutungen innerhalb der Beobachtungsfelder sowie außerdem keine Anzeichen einer gestörten Perfusion (Abb. 18).

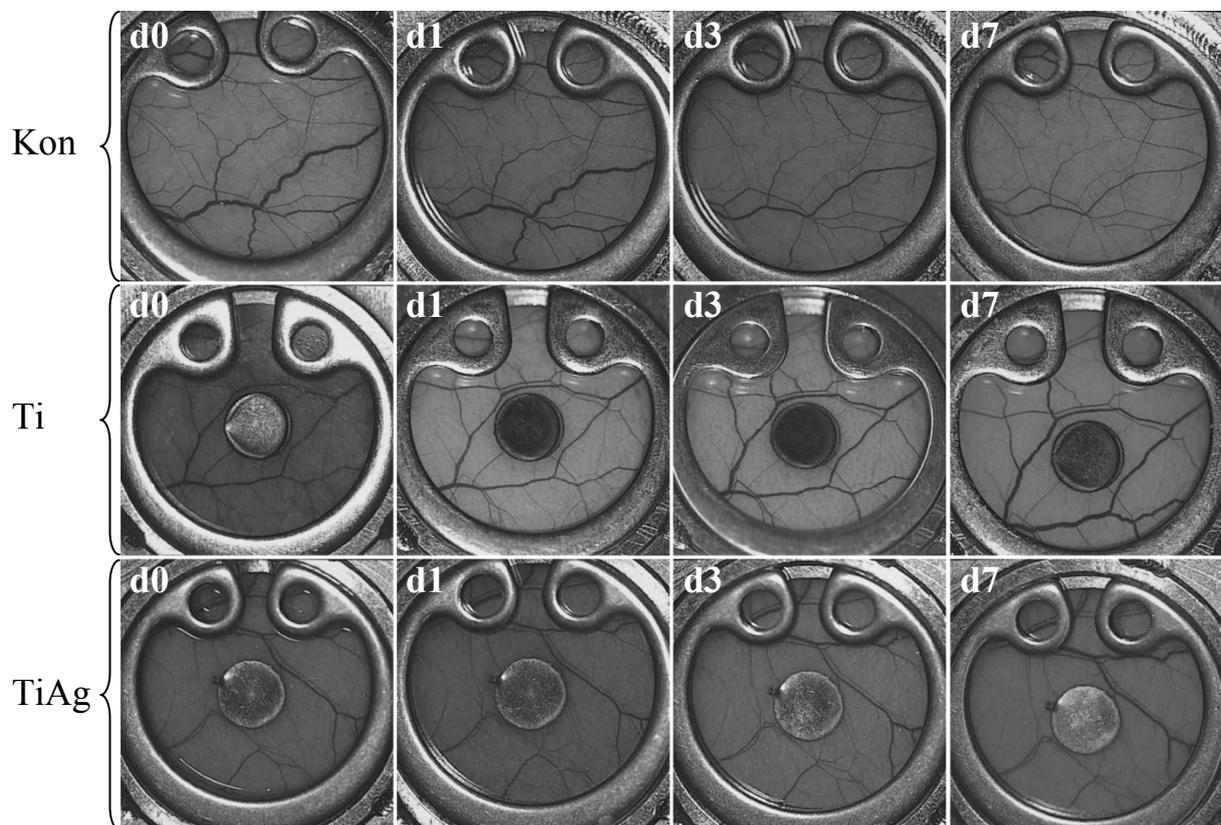


Abb. 18: Gegenüberstellung der makroskopischen Befunde der Kontrollgruppe (Kon), der Ti-Gruppe (Ti) und der TiAg-Gruppe (TiAg) am Implantationstag (d0), am Tag eins (d1) sowie an den Tagen drei (d3) und sieben (d7) nach Implantation.

4.2 Mikrohämodynamik

4.2.1 Gefäßdurchmesser, Zellfluss, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Blutvolumenfluss, Wandscherrate

Die Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter Gefäßdurchmesser, Fließgeschwindigkeit, Zellfluss, Blutvolumenfluss sowie Wandscherrate der postkapillären Venen und der Sammelvenen zeigten nur leichte Schwankungen bzw. nahezu konstante Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg sowie in allen drei Versuchsgruppen im Vergleich (Tab. 1 & 2).

		Untersuchungs-Zeitpunkte				
		Zentral				
		d0	1h	d1	d3	d7
Durchmesser (µm)	Kon	61 ± 2	61 ± 2	60 ± 3	59 ± 3	59 ± 3
	Ti	59 ± 3	60 ± 2	62 ± 2	61 ± 4	63 ± 5
	TiAg	57 ± 1	58 ± 1	59 ± 2	59 ± 3	55 ± 4
Fließgeschwindigkeit (µm/s)	Kon	698 ± 48	620 ± 23	685 ± 50	652 ± 23	654 ± 13
	Ti	645 ± 42	603 ± 30	683 ± 31	701 ± 16	646 ± 12
	TiAg	681 ± 23	697 ± 29	662 ± 21	706 ± 20	646 ± 23
Blutvolumenfluss (pL/s)	Kon	1449 ± 174	1214 ± 95	1352 ± 194	1233 ± 128	1217 ± 125
	Ti	1193 ± 126	1169 ± 116	1374 ± 147	1440 ± 185	1534 ± 256
	TiAg	1128 ± 50	1188 ± 82	1186 ± 111	1282 ± 130	1070 ± 172
Zellfluss (n/min)	Kon	158 ± 20	151 ± 17	119 ± 19	164 ± 22	136 ± 12
	Ti	135 ± 18	142 ± 16	134 ± 17	147 ± 10	147 ± 7
	TiAg	195 ± 8	199 ± 10	152 ± 17	157 ± 13	128 ± 11
Wandscherrate (s ⁻¹)	Kon	100 ± 5	86 ± 4	96 ± 8	96 ± 6	95 ± 6
	Ti	93 ± 9	82 ± 5	89 ± 4	98 ± 5	95 ± 7
	TiAg	97 ± 4	98 ± 4	93 ± 4	99 ± 5	101 ± 10

Tab. 1: Gefäßdurchmesser, Fließgeschwindigkeit, Zellfluss, Blutvolumenfluss und Wandscherrate der Kontrollgruppe, Ti-Gruppe sowie der TiAg-Gruppe im Vergleich. Gezeigt sind die Ergebnisse innerhalb der zentralen Untersuchungsfelder an den Zeitpunkten Tag null (d0), eine Stunde (1h) sowie Tag eins (d1), Tag drei (d3) und Tag sieben (d7) nach Implantation dargestellt als MW ± SEM.

		Untersuchungs-Zeitpunkte				
		Peripher				
		d0	1h	d1	d3	d7
Durchmesser (µm)	Kon	62 ± 2	61 ± 2	60 ± 3	60 ± 3	56 ± 3
	Ti	61 ± 3	61 ± 3	64 ± 3	61 ± 4	59 ± 5
	TiAg	62 ± 3	63 ± 3	63 ± 3	62 ± 4	60 ± 6
Fließgeschwindigkeit (µm/s)	Kon	720 ± 61	616 ± 45	739 ± 52	635 ± 13	690 ± 23
	Ti	653 ± 39	591 ± 39	710 ± 51	693 ± 18	621 ± 15
	TiAg	684 ± 43	676 ± 41	696 ± 29	683 ± 30	688 ± 13
Blutvolumenfluss (pL/s)	Kon	1491 ± 196	1198 ± 151	1401 ± 163	1050 ± 105	1132 ± 138
	Ti	1243 ± 37	1139 ± 35	1525 ± 133	1390 ± 179	1352 ± 214
	TiAg	1341 ± 142	1360 ± 142	1443 ± 169	1333 ± 144	1414 ± 334
Zellfluss (n/min)	Kon	147 ± 16	158 ± 15	129 ± 17	141 ± 16	135 ± 9
	Ti	159 ± 19	162 ± 15	126 ± 17	132 ± 9	132 ± 11
	TiAg	193 ± 11	182 ± 10	174 ± 25	169 ± 16	131 ± 10
Wandscherrate (s ⁻¹)	Kon	97 ± 7	84 ± 5	101 ± 8	96 ± 5	99 ± 6
	Ti	93 ± 9	83 ± 8	94 ± 9	97 ± 6	101 ± 12
	TiAg	91 ± 7	98 ± 7	92 ± 4	97 ± 6	99 ± 9

Tab. 2: Gefäßdurchmesser, Fließgeschwindigkeit, Zellfluss, Blutvolumenfluss und Wandscherrate der Kontrollgruppe, Ti-Gruppe sowie der TiAg-Gruppe im Vergleich. Gezeigt sind die Ergebnisse innerhalb der peripheren Untersuchungsfelder an den Zeitpunkten Tag null (d0), eine Stunde (1h) sowie Tag eins (d1), Tag drei (d3) und Tag sieben (d7) nach Implantation dargestellt als MW ± SEM.

Insgesamt wurden in den drei Gruppen Gefäße mit minimal 30µm und maximal 90µm Durchmesser vermessen. Die analysierten Werte des venolären Gefäßdurchmessers lagen dabei in zentralen Untersuchungsfeldern im Durchschnitt bei 55 - 62µm und in peripheren bei 56 - 64µm. Innerhalb der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf und ebenso im Vergleich zueinander blieben die ermittelten Gefäßdurchmesser dabei sehr konstant und ohne signifikante Unterschiede.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit lag im Durchschnitt bei 669µm/s und zeigte sich in allen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg nahezu konstant. Es wurden lediglich nur einzelne, nicht signifikante Unterschiede mit teilweisen Spitzenwerten innerhalb der Kontrollgruppe von etwa 1100µm/s in der Peripherie gemessen, verglichen mit 400µm/s minimal in der Peripherie der Ti-Gruppe. Insgesamt konnten jedoch keine Unterschiede zwischen peripheren und zentralen Untersuchungsfeldern festgestellt werden.

Auch die Analyse des Blutvolumenflusses ergab ähnliche Ergebnisse: Lediglich initial nach Implantation (d0) sowohl der Ti- als auch der TiAg-Folien wurde eine leichte Abnahme des Volumenflusses im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Außerdem fand sich in der Ti-Gruppe in den zentralen Untersuchungsfeldern ein leichter Anstieg der Werte von Tag eins bis Tag sieben, dabei waren jedoch alle Schwankungen nicht signifikant ausgeprägt. Insgesamt wurde in allen drei Gruppen über den gesamten Zeitraum im Durchschnitt ein Volumenfluss von etwa 1290pL/s gemessen.

Hinsichtlich des Zellflusses war die Anzahl der fließenden Leukozyten der TiAg-Gruppe an den frühen Zeitpunkten nach Implantation sowohl zentral als auch peripher höher als im Vergleich zur Ti- und Kontrollgruppe. Dabei fand sich jedoch eine Abnahme der Zellzahl im Verlauf, sodass bis zum Tag sieben die analysierten Werte in etwa ähnlich mit denen der beiden Vergleichsgruppen waren. Beim separaten Vergleich der einzelnen Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Versuchsgruppe zueinander wurden folgende signifikante Unterschiede in Bezug auf den Zellfluss in den zentralen Gesichtsfeldern nachgewiesen: Innerhalb der Kontrollgruppe beim Vergleich der Untersuchungstage eins und drei, innerhalb der TiAg-Gruppe beim Vergleich der Zeitpunkte direkt nach Implantation mit Tag sieben sowie eine Stunde nach Implantation ebenfalls mit Tag sieben. Die Analyse der Wandscherrate war hingegen wieder unauffällig und zeigte nur marginale Schwankungen. Es wurden zentral durchschnittlich zwischen 93 und 101s⁻¹ in der TiAg-Gruppe verglichen mit 89 - 98s⁻¹ in der Ti- und 86 - 100s⁻¹ in der Kontrollgruppe gemessen. In der Peripherie wurden ähnliche Daten nachgewiesen.

Zusammenfassend hatten sowohl der Einflussfaktor Zeit als auch die Implantation keine bedeutsamen Auswirkungen auf die gemessenen mikrovaskulären Parameter. Die Mikrozirkulation veränderte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht merklich, sodass Unterschiede zwischen unbeschichtetem Titan und beschichtetem Titan mit der untersuchten TiAg-Verbundbeschichtung nicht festgestellt wurden.

4.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Am Tag der Implantation (d0) zeigte sich in allen drei untersuchten Gruppen eine annähernd gleiche funktionelle kapillare Dichte von etwa durchschnittlich $310\text{cm}/\text{cm}^2$, wodurch eine gute, suffiziente Blutversorgung der Muskulatur gewährleistet war (Abb. 19). Nach der Implantation konnte insbesondere in der Ti-Gruppe ein geringer Anstieg der gemessenen Werte beobachtet werden, welcher sich jedoch im Verlauf wieder in Richtung der Ausgangswerte normalisierte. Hinweise auf eine mechanische Beeinträchtigung der muskulären Perfusion sowohl durch die Ti- als auch durch die TiAg-Implantate ergaben sich nicht, da es zu keiner Abnahme der funktionellen Kapillardichte innerhalb der frühen Untersuchungszeitpunkte kam. Durchschnittlich wurden über den gesamten Zeitraum in allen Gruppen Werte zwischen 305 und $320\text{cm}/\text{cm}^2$ gemessen, in der Ti-Gruppe $317\text{cm}/\text{cm}^2$ und in der TiAg-Gruppe $310\text{cm}/\text{cm}^2$. Dies weist darauf hin, dass die getestete Silber-Verbundbeschichtung offensichtlich keinen schädigenden Effekt auf die kapilläre Perfusion ausübt.

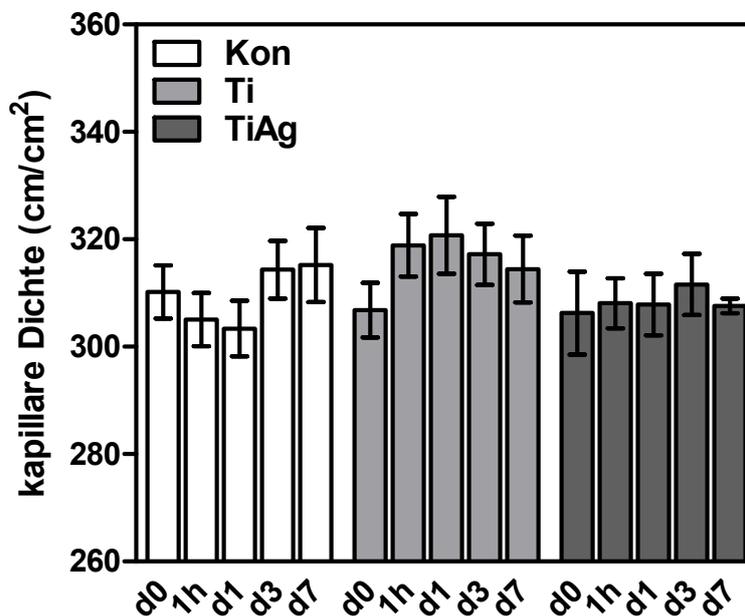


Abb. 19: Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte mittels der IVM-Aufnahmen am Implantationstag (d0), nach einer Stunde (1h) und 24 Stunden (d1) sowie am dritten (d3) und siebten Tag (d7). Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen: Die Kontrollgruppe (weiße Balken) erhielt nach der Rückenhautkammer-Präparation kein Implantat, wobei die Ti-Gruppe (hellgraue Balken) ein reines Titan-Implantat und die TiAg-Gruppe (dunkelgraue Balken) ein TiAg-beschichtetes Implantat erhielt. MW \pm SEM, Two-way RM ANOVA mit Holm-Sidak Post Test.

4.2.3 Extravasation

Die am Tag null gemessene Gefäßpermeabilität zeigte in allen drei Gruppen eine makromolekulare Extravasation von durchschnittlich 0,5. Im zeitlichen Verlauf steigerten sich die Werte sowohl zentral als auch peripher in allen Versuchsgruppen graduell auf durchschnittlich 0,6 - 0,7 am Tag sieben (Abb. 20).

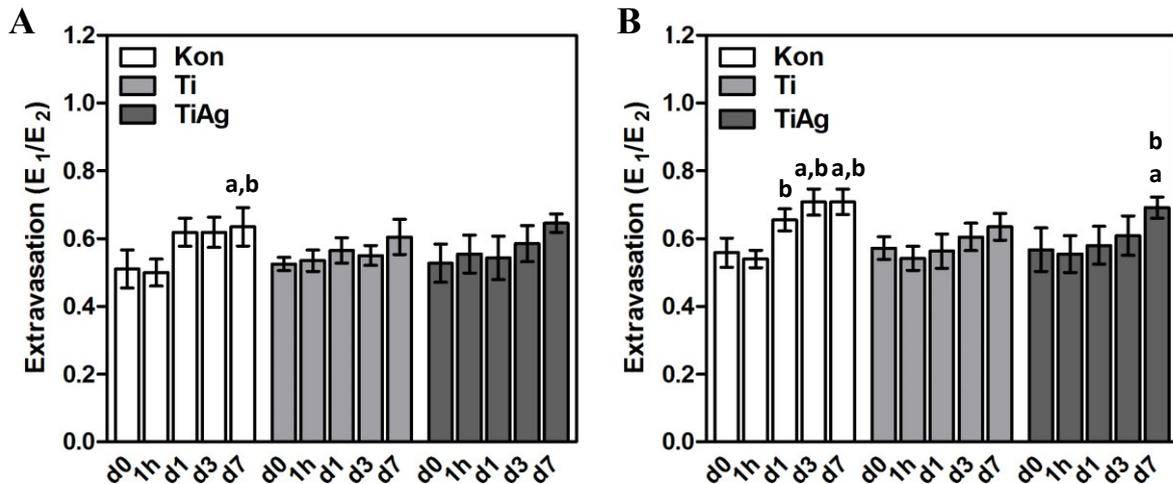


Abb. 20: Quantitative Analyse der Extravasation mittels der IVM-Aufnahmen in zentralen (A) und peripheren (B) Untersuchungsfeldern am Implantationstag (d0), nach einer Stunde (1h) und 24 Stunden (d1) sowie am dritten (d3) und siebten Tag (d7). Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen: Die Kontrollgruppe (weiße Balken) erhielt nach der Rückenhamerkammer-Präparation kein Implantat, wobei die Ti-Gruppe (hellgraue Balken) ein reines Titan-Implantat und die TiAg-Gruppe (dunkelgraue Balken) ein TiAg-beschichtetes Implantat erhielt. MW \pm SEM, Two-way RM ANOVA mit Holm-Sidak Post Test. ^a $p < 0,05$ vs. d0, ^b $p < 0,05$ vs. 1h.

Es konnten dabei signifikante Unterschiede der Messungen innerhalb der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf, jedoch nicht im Vergleich der Versuchsgruppen zueinander gemessen werden. So zeigten sich in zentralen Untersuchungsfeldern der Kontrollgruppe ein deutlicher Anstieg am Tag sieben (d7), verglichen mit dem Ausgangszeitpunkt der IVM-Aufnahmen (d0) sowie eine Stunde danach (1h). In der Peripherie wurden ähnliche Verläufe beobachtet: Hier wurde innerhalb der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Extravasation eine Stunde nach IVM-Start (1h) verglichen mit dem darauffolgenden Tag (d1) beobachtet. Außerdem fand sich eine Signifikanz beim Vergleich der Zeitpunkte d3 und d7 mit jeweils dem Ausgangspunkt (d0) sowie einer Stunde danach (1h). Auch innerhalb der TiAg-Gruppe

stiegen die Werte bis zum Tag sieben (d7) in Bezug zum Implantationszeitpunkt (d0) sowie einer Stunde (1h) danach signifikant an.

Insgesamt konnte jedoch eine durchschnittliche Gefäßpermeabilität aller Versuchsgruppen von 0,6 berechnet werden. Die analysierten Daten überschritten zu keinem Zeitpunkt Werte von über 0,8 - 1,0. Daher kann davon ausgegangen werden, dass trotz der Metallimplantation das Gefäßendothel über den gesamten Versuchszeitraum hinweg intakt blieb. Außerdem zeigte ein Vergleich der Ti- mit der TiAg-Gruppe sehr ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche Werte mit einer maximalen Extravasation am Tag sieben.

4.3 Inflammation

Bei der Analyse der inflammatorischen Parameter zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum hinweg in allen drei Gruppen ein sehr ähnlicher und gleichmäßig verteilter Anteil der rollenden Leukozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten (Abb. 21).

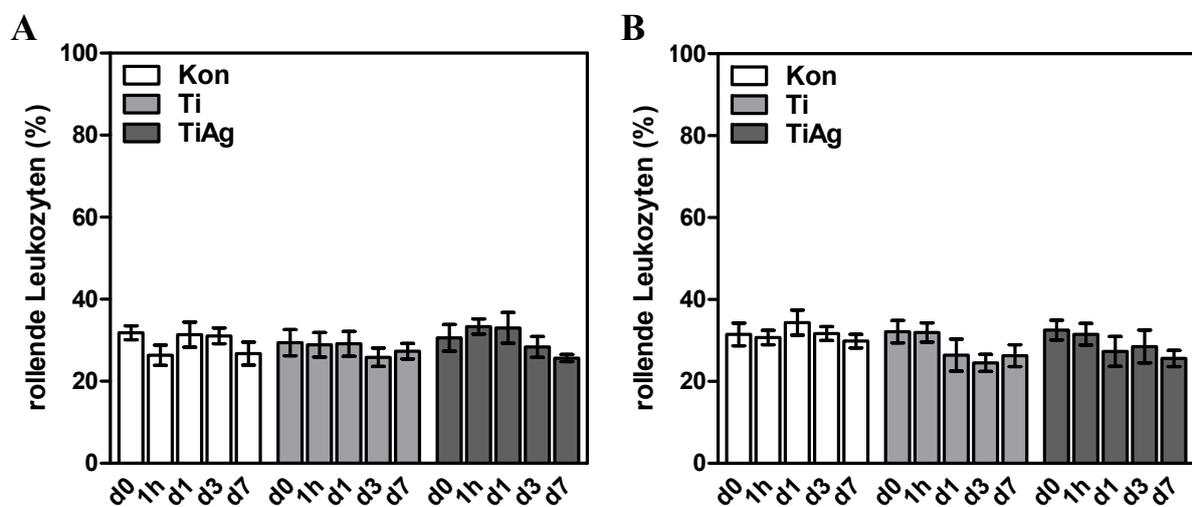


Abb. 21: Quantitative Analyse der rollenden Leukozyten mittels der IVM-Aufnahmen in zentralen (A) und peripheren (B) Untersuchungsfeldern am Implantationstag (d0), nach einer Stunde (1h) und 24 Stunden (d1) sowie am dritten (d3) und siebten Tag (d7). Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen: Die Kontrollgruppe (weiße Balken) erhielt nach der Rückenhautkammer-Präparation kein Implantat, wobei die Ti-Gruppe (hellgraue Balken) ein reines Titan-Implantat und die TiAg-Gruppe (dunkelgraue Balken) ein TiAg-beschichtetes Implantat erhielt. MW \pm SEM, Two-way RM ANOVA mit Holm-Sidak Post Test.

Am Tag null betrug der mittlere Anteil der rollenden Leukozyten in zentralen und peripheren Untersuchungsfeldern in allen drei Versuchsgruppen zusammen etwa 30%. Dies änderte sich bis zum Ende des Versuches am Tag sieben mit 27% nicht signifikant und nahm tendenziell in allen drei Gruppen eher ab. Beim Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte sich in der Ti-Gruppe in zentralen Felder an allen Untersuchungstagen ein Anteil der sogenannten „Roller“ von durchschnittlich 28%, verglichen mit 30% in der TiAg-Gruppe. Auch peripher lagen die errechneten Werte bei 28% (Ti) und 30% (TiAg). Innerhalb der Kontrollgruppe zeigten sich ähnliche Durchschnittswerte von 30% zentral und 32% peripher, wodurch keine Unterschiede zu den beiden Implantatgruppen nachgewiesen wurden.

Die Auswertung der adhärennten Leukozyten zeigte in der Ti-Gruppe einen vorübergehenden Anstieg der zentral und peripher gemessenen Werte zusammen auf durchschnittlich 258n/mm^2 direkt nach Implantation (d0), bei einem Maximalwert einzelner Versuchstiere von zentral 410n/mm^2 und peripher 466n/mm^2 (Abb. 22). Nach diesem initialen Anstieg fiel die Anzahl der sogenannten „Sticker“ insgesamt jedoch sukzessiv auf 124n/mm^2 am Tag drei und 127n/mm^2 bis zum Tag sieben ab und zeigte damit wieder ein vergleichbares Level zur Kontrollgruppe. Die Messungen innerhalb der TiAg-Gruppe waren hingegen zu jedem Zeitpunkt vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung erbrachte signifikante Unterschiede sowohl hinsichtlich des Faktors Implantation als auch in Bezug auf den zeitlichen Verlauf. In den zentralen Beobachtungsfeldern zeigten sich innerhalb der Ti-Gruppe Signifikanzen beim Vergleich des Zeitpunktes direkt (d0) sowie eine Stunde (1h) nach Implantation mit jeweils den Tagen drei (d3) und sieben (d7). Hier nahmen die Werte, wie oben bereits beschrieben, deutlich ab. Beim Vergleich der Ti- mit der Kontrollgruppe zeigte sich ein deutlicher Unterschied am Tag null (d0): Die adhärennten Leukozyten betragen hier zentral durchschnittlich 149n/mm^2 in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 286n/mm^2 in der Ti-Gruppe. Eine Stunde nach Implantation (1h) bestand darüberhinaus ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Ti- mit der TiAg-Gruppe. Auch in den peripheren Gesichtsfeldern waren die Werte der gemessenen „Sticker“ in der Ti-Gruppe insbesondere am Tag null signifikant höher als in der TiAg-Gruppe. Innerhalb der Ti-Gruppe zeigte sich zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen Tag null (d0) und drei (d3). Hier nahm die Anzahl der Zellen von initial 230n/mm^2 auf 126n/mm^2 ab (Abb. 22).

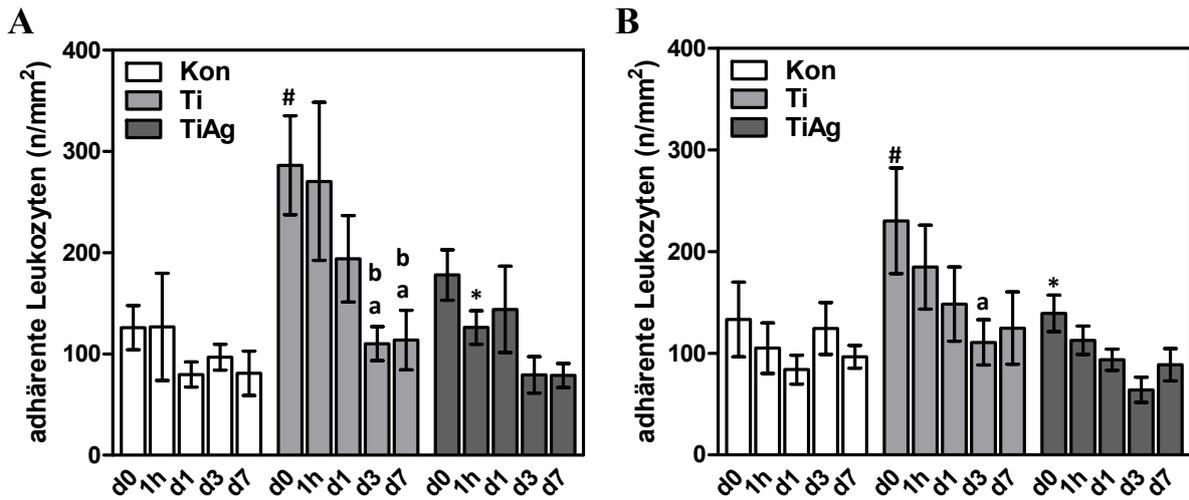


Abb. 22: Quantitative Analyse der adhärenen Leukozyten mittels der IVM-Aufnahmen in zentralen (**A**) und peripheren (**B**) Untersuchungsfeldern am Implantationstag (d0), nach einer Stunde (1h) und 24 Stunden (d1) sowie am dritten (d3) und siebten Tag (d7). Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen: Die Kontrollgruppe (weiße Balken) erhielt nach der Rückenhautkammer-Präparation kein Implantat, wobei die Ti-Gruppe (hellgraue Balken) ein reines Titan-Implantat und die TiAg-Gruppe (dunkelgraue Balken) ein TiAg-beschichtetes Implantat erhielt. MW \pm SEM, Two-way RM ANOVA mit Holm-Sidak Post Test. ^a $p < 0,05$ vs. d0, ^b $p < 0,05$ vs. 1h, ^{*} $p < 0,05$ TiAg- vs. Ti-Gruppe am entsprechenden Zeitpunkt, [#] $p < 0,05$ vs. Kon-Gruppe am entsprechenden Zeitpunkt.

Generell wurde innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes eine tendenzielle Abnahme der adhärenen Leukozyten in der Ti- als auch in der TiAg-Gruppe beobachtet. Da dieser Trend ebenso in der Kontrollgruppe zu sehen war, kann auch von einer physischen Erholung der Mäuse von der Rückenhautkammer-Präparation ausgegangen werden. Auch systemisch blieb die Anzahl der Leukozyten in allen drei Untersuchungsgruppen nahezu konstant auf physiologischem Niveau. Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die untersuchte Silberlegierung keinen negativen Effekt auf die Leukozyten-Aktivierung ausgeübt hat und damit eine gute Biokompatibilität aufwies.

4.4 Histologie

In den histologischen Schnitten zeigte sich nach H&E-Färbung sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den beiden Implantatgruppen eine nur sehr geringe zelluläre Infiltration des Muskelgewebes (Abb. 23). Sehr ähnliche Ergebnisse konnten nach CAE-Färbung festgestellt werden: Auch hier war eine inflammatorische Reaktion im Bereich der Implantationsstelle kaum vorhanden und es zeigte sich kein Unterschied der Implantate mit der TiAg-Verbundbeschichtung im Vergleich zu den reinen Ti-Implantaten. Eine Infiltration F4/80-immunhistochemisch markierter Zellen war insbesondere in der Dermis und Subkutis nur gering ausgeprägt. Der Vergleich der Kontrollgruppe mit den Implantatgruppen zeigte außerdem eine ähnlich geringe Inflammation wie die Analyse der Ti- und TiAg-Implantate zueinander.

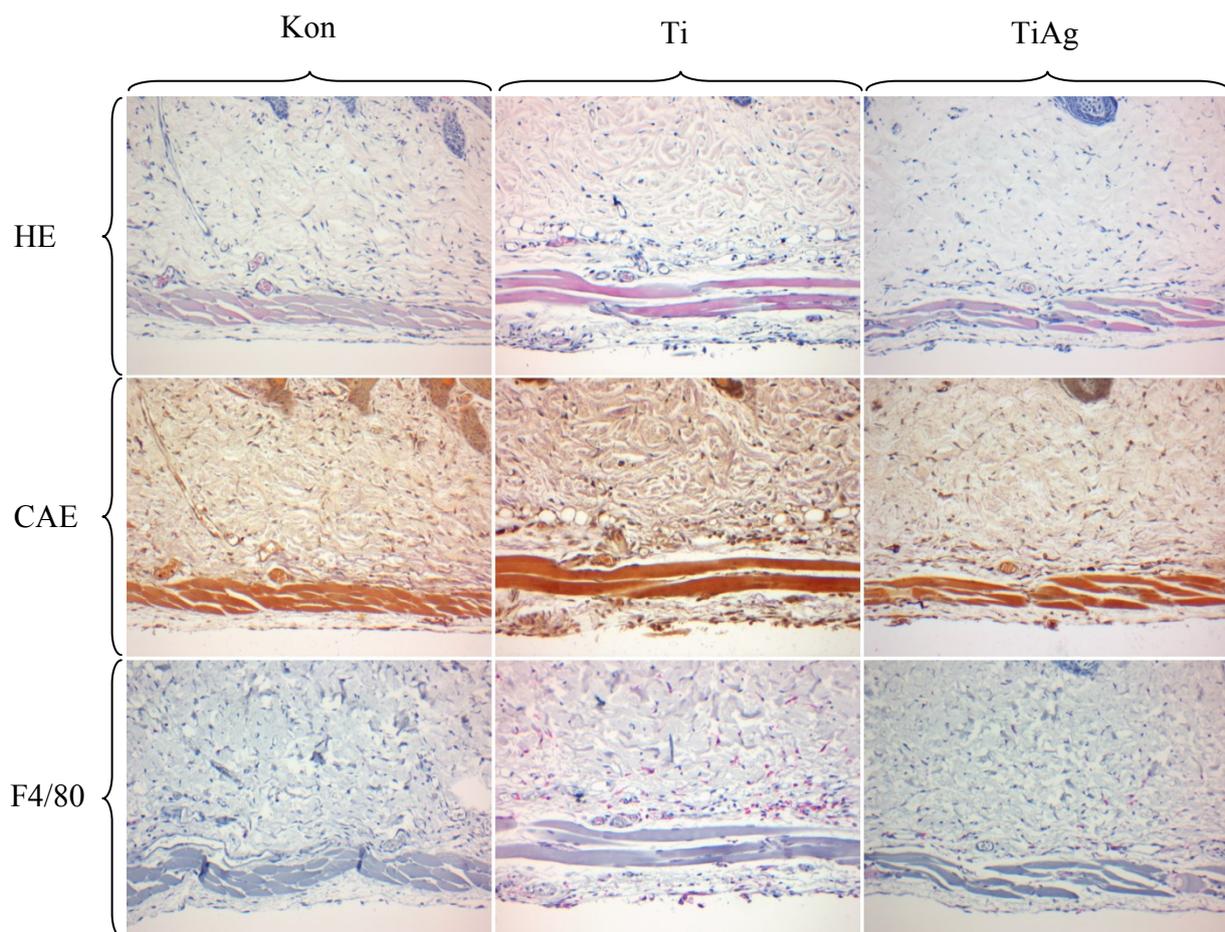


Abb. 23: Histologische Bilder der Kontroll-, Ti- und TiAg-Gruppe nach Färbung mit HE (obere Reihe) und CAE (mittlere Reihe) sowie Immunhistochemie gegen F4/80 (untere Reihe).

4.5 EDA-Analyse der Implantat-Oberfläche

Eine EDA-Analyse der Ti- und TiAg-beschichteten Implantate erfolgte durch die Firma CGS Medical GmbH vor und nach der Implantation, um einerseits die Silberfreisetzung der TiAg-Plättchen zu quantifizieren und andererseits die Integrität der Beschichtung zu beurteilen. Die reinen Ti-Plättchen zeigten vor und nach dem Versuch einen Ti-Gehalt von 100%. Die mittels PVD beschichteten TiAg-Implantate zeigten vor Implantation direkt an der Oberfläche einen Silberanteil von etwa 72Gew% sowie nur geringere Anteile von Titan (~23Gew%) und Aluminium (~5Gew%) (Abb. 24A). Nach Explantation betrug der Silbergehalt noch $36,5 \pm 16,3$ Gew%, bei relativer Zunahme des Titan- und Aluminiumgehaltes. Dies zeigt eine moderate, aber suffiziente Silberfreisetzung über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Diese Oberflächenveränderung der TiAg-Implantate im Vergleich zu den reinen Ti-Plättchen wurden ebenso rasterelektronenmikroskopisch bestätigt (Abb. 24B).

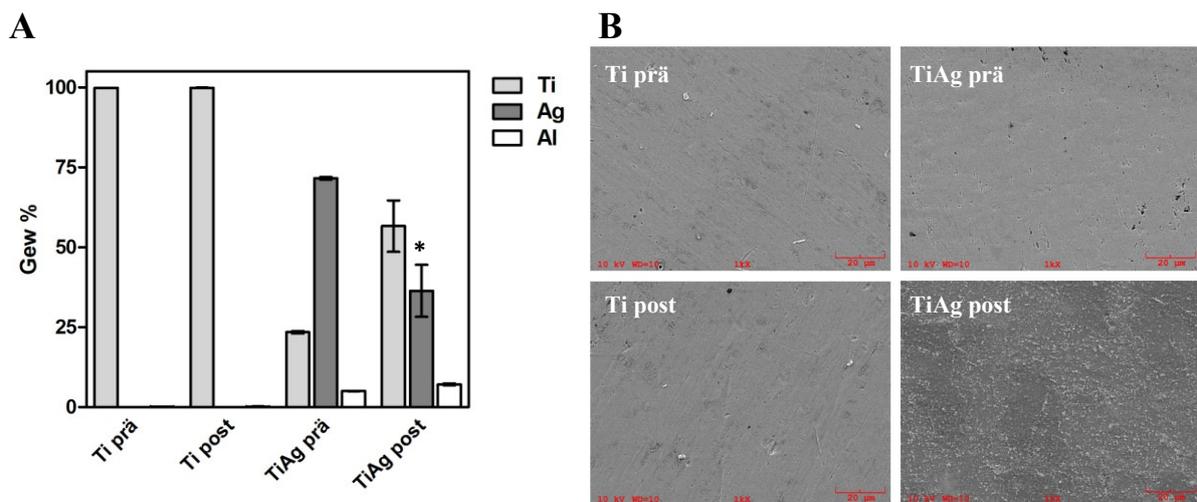


Abb. 24: Zusammensetzung der Ti- und TiAg-Implantate vor (prä) Implantation und nach (post) Explantation (**A**) sowie deren Oberflächenbeschaffenheit im rasterelektronenmikroskopischen Bild (**B**; CGS Medical GmbH, Thorsten Zufraß). MW \pm SEM, * $p < 0,05$ prä vs. post Ag Gew% der TiAg-Gruppe.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Modell der Rückenhautkammer

Die Implantation von Biomaterialien jeglicher Art in den menschlichen Körper spielt in der modernen Medizin eine große Rolle. Um neuartige Implantatmaterialien zu testen, bedarf es einer Untersuchungsmethode, die eine direkte Analyse der Interaktion zwischen einem Implantat mit dem umgebenden Gewebe ermöglicht. Hierbei ist das Modell der Rückenhautkammer ein häufig angewandtes, etabliertes Modell zur Untersuchung einer frühen inflammatorischen Reaktion sowie der Mikrozirkulation und Angiogenese des Organismus als Reaktion auf einen Fremdkörper im Tiermodell z.B. der Ratte, des Hamsters oder der Maus [Laschke et al 2011]. Dieses Verfahren wird u.a. zur Testung von Gefäßprothesen [Menger et al 1990a & b, Jeanmonod et al 2013, Jeanmonod et al 2014], von Kunststoffnetzen zur operativen Versorgung von z.B. Hernien [Roller et al 2008, Laschke et al 2009], zur Analyse von Knochenersatzmaterialien im Rahmen einer Therapie von Frakturen, benignen Knochentumoren oder Knochenzysten [Laschke et al 2007, Abshagen et al 2009, Roetman et al 2010, Laschke et al 2011] sowie außerdem - wie auch in der vorliegenden Arbeit - zur Untersuchung neuartiger Metallimplantate verwendet [Kraft et al 2000, Kraft et al 2005, Pennekamp et al 2006]. Die Präparation sowie das Tragen der Rückenhautkammer selbst werden von den Tieren gut toleriert, was sich in einem normalen Orientierungs- und Fressverhalten widerspiegelt. Durch jede Operation wird jedoch eine traumatisch bedingte proinflammatorische Reaktion mit sekundärer Beeinflussung der Mikrozirkulation induziert, was zu einer Verfälschung der zu untersuchenden Parameter führen kann. Der Vorteil des Rückenhautkammer-Modells liegt darin, dass die mikroskopischen Untersuchungen erst einige Tage nach der Präparation erfolgen, wodurch eine Regeneration des betroffenen Gewebes gewährleistet und eine Untersuchung unter nahezu physiologischen Bedingungen möglich ist [Laschke et al 2011]. Das Modell der Rückenhautkammer ist darüberhinaus ein *in vivo* Modell, welches ermöglicht, mikroskopische Analysen am lebenden Tier durchzuführen und somit funktionelle Parameter wie die Mikrozirkulation und Zell-Zell-Interaktionen zu untersuchen. Die Erhebung dieser Parameter erfolgt im Gegenteil zu Verfahren, die sich auf die histologische und

immunhistochemische Auswertung und somit auf einen einzigen Zeitpunkt beschränken, kontinuierlich und ermöglicht dadurch eine Beurteilung im Verlauf. Durch ein abnehmbares Deckglas ist die Rückenhautkammer außerdem jederzeit zugänglich, wodurch die Implantation zu untersuchender Materialien ohne eine weitere Operation geschehen kann. Der Versuchszeitraum beschränkt sich dabei auf 2 - 3 Wochen, da nach längerer Zeit die Elastizität der Haut durch das Gewicht der Kammer abnimmt, wodurch es zu einem Abkippen der Kammer mit Beeinflussung der Perfusion kommen kann. Aus diesem Grund sind Langzeitstudien mit diesem Modell nicht möglich.

In der vorliegenden Studie lag der Fokus jedoch auf der Untersuchung früh auftretender Gewebereaktionen nach Implantation der Metallplättchen, wie z.B. der Beeinflussung der mikrovaskulären Durchblutung, da diese einen entscheidenden Faktor für eine erfolgreiche Implantat-Integration darstellt [Laschke et al 2006, Naik et al 2007]. Da die Rückenhautkammer nur eine begrenzte Fläche zur Untersuchung bietet, dürfen die zu untersuchenden Implantate lediglich eine maximale Dicke von 1mm bei einem maximalen Durchmesser von 3mm aufweisen, damit einerseits einer Gefäßkomprimierung mit konsekutiver Beeinflussung der Mikrozirkulation vorgebeugt wird und andererseits eine ausreichend große Fläche zur mikroskopischen Analyse vorhanden ist [Laschke et al 2011]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie runde Plättchen mit einem Durchmesser von 3mm und einer Dicke von 0,1mm verwendet. Insgesamt bietet das Modell der Rückenhautkammer damit sehr gute Voraussetzungen, um neue medizinische Implantatmaterialien hinsichtlich ihrer Gewebe- und Gefäßkompatibilität zu testen.

5.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung biologischer zellulärer Vorgänge ist essentiell, um die Pathophysiologie von Krankheitsprozessen näher verstehen und somit auch neuartige medizinische Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. Obwohl viele Erkenntnisse mithilfe von *ex vivo* und *in vitro* Experimenten erbracht werden, können sie komplexe Prozesse auf zellulärer Ebene, wie z.B. den Ablauf einer inflammatorischen Reaktion nicht ausreichend darstellen [Weigert et al 2010, Gravins 2012]. Hier liegt der Vorteil klar bei *in vivo* Modellen, bei denen mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie physiologische zelluläre Abläufe sowie Zell-Zell-Interaktionen quantitativ, qualitativ und dynamisch untersucht werden können [Gravins 2012, Masedunskas et al 2012, Cao et al 2012]. Dabei ist es möglich, einerseits Prozesse innerhalb eines Gewebes und einzelne Zellen zu untersuchen [Weigert et al 2010, Pittet & Weissleder 2011] und andererseits auch intrazelluläre Organelle [Weigert et al 2010, Cao et al 2012] in verschiedenen Organen wie u.a. der Leber [Chadi et al 2015, Khandoga et al 2014], der Niere [Dunn et al 2002, Sandoval et al 2004], des Pankreas [Vollmar et al 1994], des Herzens [Vollmar et al 1995], des Gehirns [Tang et al 2015, Li et al 2015] oder des Skelettmuskels [Menger et al 1990a & b, Butschkau et al 2013] sowie in Tumorgewebe [Alexander et al 2008, Orth et al 2011] darzustellen. Durch die retrobulbäre Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen gelingt die Darstellung der zu untersuchenden Strukturen. Dabei ermöglicht FITC-Dextran eine Anfärbung des Gefäßnetzwerkes mit Arteriolen, Venolen, Sammelvenolen und Kapillaren und somit die Erhebung funktioneller Parameter wie der kapillaren Dichte oder der Extravasation. Rhodamin 6G hingegen markiert zirkulierende Leukozyten und dient somit u.a. einer quantitativen Bewertung einer Inflammation. Neben den Vorteilen und Möglichkeiten, die Fluoreszenzfarbstoffe mit sich bringen, weisen sie jedoch auch negative Eigenschaften wie die Induktion einer phototoxischen Reaktion auf. Diese kann einerseits durch eine hohe Licht-Intensität und lange Belichtungsdauer eines Untersuchungsfeldes hervorgerufen werden und andererseits durch die Fluoreszenzfarbstoffe selbst [Saetzler et al 1997]. Durch den dabei ausgelösten oxidativen Stress kommt es zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen, welche zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Gefäßnetzes mit konsekutiver Beeinflussung der Mikrozirkulation führen können [Steinbauer et al 2000, Penning & Dubbelman 1994]. Darüber hinaus konnten

weitere, durch die phototoxische Reaktion hervorgerufene Effekte wie eine Thrombozyten-Aktivierung [Herrmann 1983] mit Thrombusbildung [Sato & Ohshima 1984, Schuschke et al 1989], eine Schädigung des Endothels [Povlishock et al 1983] mit sekundärer Extravasation von Makromolekülen [Reed & Miller 1988] sowie Vasospasmen [Saetzler et al 1997] und eine vermehrte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Saetzler et al 1997] beobachtet werden. Diese negativen Auswirkungen der Fluoreszenzfarbstoffe benötigen jedoch eine weit höhere Lichtdosis als während einer IVM-Standardmessung üblich [Steinbauer et al 2000]. Um das Risiko dennoch zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Belichtungszeit eines einzelnen Untersuchungsfeldes auf 20-30 Sekunden sowie die gesamte Untersuchungsdauer auf ein Minimum beschränkt.

5.1.3 Silberanwendung in der Medizin

Silber wurde schon in der Antike von den Menschen nicht nur aufgrund seiner physikalischen und mechanischen Eigenschaften, sondern ebenso bereits aus medizinischen Gründen genutzt. Dabei kam es u.a. zur Prävention von Infektionen, zur Konservierung von Nahrungsmitteln und Wasser und später auch in der Therapie verschiedener Krankheitsbilder zum Einsatz [Alexander 2009, Edwards-Jones 2009]. Die Verwendung von Silber in der Medizin hat auch bis heute nicht an Bedeutung verloren. Das Edelmetall wird aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften u.a. als Bestandteil intravenöser Katheter oder Herzschrittmacher verwendet sowie in der Chirurgie als Implantatmaterial, um eine Besiedlung mit Mikroorganismen wie z.B. Bakterien und somit eine Infektion zu verhindern. Dies ist deshalb von großer Bedeutung, da eine Implantatinfektion in der Regel einen erneuten operativen Eingriff mit höheren Komplikationsraten und einen Implantatwechsel zur Folge hat sowie insgesamt ein schlechteres klinisches Outcome aufweist [Pulido et al 2008, Bozic et al 2005, Gaine et al 2000, Segawa et al 1999]. Ist es nämlich bereits zu einer Infektion gekommen, ist deren Therapie äußerst schwierig. Dies liegt einerseits an der Ineffektivität der Antibiotika gegenüber bakteriellen Biofilmen. Darüber hinaus ist eine antibiotische Therapie aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen durch eine häufige und ansteigende Gabe der Antibiotika vermehrt schwierig [Knetsch & Koole 2011, Chen & Schluesener 2008]. Der kompetitive Prozess zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen um die Implantatoberfläche wird als

„race for the surface“ bezeichnet [Subbiahdoss et al 2009, Gristina 1987, Gristina et al 1988]. Bei diesem Prozess kann durch verschiedene Modifizierungen der Implantatoberfläche eine bakterielle Besiedlung verhindert werden. Eine Möglichkeit dabei ist der Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen wie Silber, welche auf die Implantatoberfläche aufgebracht werden und über den Mechanismus der „active release“ Strategie antimikrobiell wirken [Knetsch & Koole 2011, Hetrick & Schoenfisch 2006]. Bei diesem Mechanismus besitzt Silber im Gegensatz zu Antibiotika den Vorteil, dass es aufgrund seiner oligodynamischen Eigenschaften über einen langen Zeitraum kontinuierlich Ag^+ -Ionen freisetzt und darüber hinaus bisher noch keine Resistenzen gegenüber Silber beschrieben wurden [Lansdown 2006, Gosheger et al 2004, Jansen et al 1994]. Die dadurch schon initiale Möglichkeit einer Infektionsprävention ermöglicht eine gute Wundheilung und Osseointegration des Implantates.

Neben dieser positiven Wirkung von Silber besitzt es jedoch auch einige negative Eigenschaften. Zu diesen zählt u.a. das Krankheitsbild der Argyrie, das nach einer Silberaufnahme über einen längeren Zeitraum auftritt. Dabei kommt es einerseits zu einer generalisierten, irreversiblen Ablagerung von Silber in der Haut, den Schleimhäuten und anderen Organen sowie andererseits zu einer lokalen Ablagerung wie z.B. am Auge [Alexander 2009]. Neben diesen beiden nicht lebensbedrohlichen Krankheitsbildern besitzt Silber jedoch auch seltener auftretende Komplikationen wie z.B. eine toxische Schädigung der Leber und der Nieren, über die Silber vorwiegend ausgeschieden wird. Darüber hinaus können allergische Reaktionen auftreten, was bei Vorkenntnis eine klare Kontraindikation für die Anwendung von silberhaltigen Materialien darstellt [Alexander 2009, Lansdown 2006]. Bei der Therapie von Brandwunden bei Kindern mit Silber gibt es außerdem Berichte über das Auftreten einer Neutropenie sowie eines Erythema multiforme, welche aber beide selbstlimitierend und ohne toxische Konsequenzen verliefen [Lansdown 2006]. Diese Nebenwirkungen wurden außerdem vorwiegend bei der Nutzung von reinem metallischen Silber, Silber-Sulfid-Partikeln und Silber-Nitrat-Lösungen sowie bei hohen Dosen und bei der Anwendung über einen langen Zeitraum beobachtet [Alexander 2009, Lansdown 2006]. Negative systemische Effekte werden in der Literatur dabei erst ab hohen Dosen von $>4 - 6\text{g}$ totalem Silbergehalt beschrieben, welche jedoch von den in der Medizin gebrauchten

Materialien in der Regel nicht erreicht wird [Hussmann et al 2013, Gosheger et al 2004]. Negative lokale Effekte beobachteten Kraft et al. im Rückenhautkammer-Modell des Hamsters nach Implantation von purem Silber um das Implantat herum, was sich durch die Ausbildung eines Ödems und einer erhöhten inflammatorischen Reaktion zeigte [Kraft et al 2000]. Andere Studien bestätigen diese Beobachtungen allerdings nicht. Gosheger et al. testeten im Rattenmodell mit Silber beschichtete Endoprothesen im Vergleich zu nicht beschichteten, nachdem diese jeweils mit *Staphylococcus aureus* infiziert worden waren. Dabei werteten sie die jeweiligen Infektionsraten sowie die Silberkonzentrationen im Blut und in den Organen aus. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hinzunahme von Silber eine signifikant geringere Infektionsrate (7%) im Vergleich zu der Titangruppe (47%) erreicht wurde. Außerdem zeigten die Tiere der Silbergruppe eine signifikant geringere Inflammation gemessen an der Anzahl der Leukozyten sowie am CRP-Wert. Im Blut und in den untersuchten Organen wurden erhöhte Silberkonzentrationen festgestellt, jedoch führten diese weder zu einer Veränderung der Blutparameter noch der Organhistologie [Gosheger et al 2004]. Auch die Implantation von Silber beschichteten Endoprothesen bei Patienten mit ossär metastasierten Tumoren sowie primär ossären Tumorerkrankungen zeigte ähnliche Ergebnisse: Die untersuchten Patienten wiesen weder lokale noch systemische Anzeichen einer Argyrose auf. Die Silberkonzentrationen im Serum stiegen in den ersten zwei Jahren postoperativ auf mittlere Werte zwischen 1,93 und 12,98ppb mit einem maximalen Wert von 56,4ppb. Die Laboruntersuchungen zeigten bei diesen Silber-Blutkonzentrationen keine signifikanten Veränderungen der Leber- und Nierenwerte. Auch histologisch konnten eine chronische Inflammation und nekrotisches Gewebe ausgeschlossen werden [Harden et al 2007a]. Die Silberkonzentration im Blut lag folglich deutlich unter dem toxischen Niveau von 300ppb, ab dem in der Literatur toxische Nebenwirkungen beschrieben werden [Hauschild et al 2015, Harden et al 2007a, Gosheger et al 2004]. In einer weiteren Studie wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, mittels PVD eine Silberbeschichtung auf Titan-Prothesen aufgebracht. Dabei konnten ebenfalls nicht toxische Silberkonzentrationen im Serum von im Mittel zwischen 0,2 und 1,82ppb gemessen werden, ohne dass lokale oder systemische Nebenwirkungen auftraten [Hauschild et al 2015]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden weder negative lokale noch systemische Reaktionen auf die neuartigen

TiAg-Implantate nachgewiesen. Hussmann et al. untersuchten darüber hinaus das klinische Outcome von Patienten nach Implantation von mit Silber beschichteten Prothesen im Vergleich zu denen, die unbeschichtete Implantate erhalten hatten. Hier zeigte sich eine signifikant geringere Reinfektionsrate und eine ebenso signifikant geringere Hospitalisationszeit nach der Versorgung mit Silber beschichteten Prothesen [Hussmann et al 2013].

Insgesamt weist Silber somit im Allgemeinen eine gute systemische und lokale Verträglichkeit auf. Wenn es in einer angemessenen Dosis und über einen begrenzten Zeitraum hinweg angewandt wird, sind außerdem keine toxischen Effekte im menschlichen Organismus zu erwarten. Darüber hinaus konnten experimentell positive Effekte einer signifikant geringeren Infektionsrate nachgewiesen werden. Durch diese Voraussetzungen wäre somit eine adäquate Wundheilung und ossäre Integration nach Implantation von Fremdmaterialien in den menschlichen Körper gegeben.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde die mikrovaskuläre Reaktion auf eine neuartige TiAg-Verbundbeschichtung von Implantaten im Rückenhautkammer-Modell der Maus untersucht. Silber dient in diesem Zusammenhang als antimikrobielle Substanz, um eine bakterielle Besiedlung zu verhindern und damit eine verbesserte Gewebeintegration zu gewährleisten. Der antimikrobielle Effekt von Silber wird dabei über eine konstante Freisetzung von Silber-Ionen vermittelt, welche an der bakteriellen Zellmembran mit Sulfhydryl- und Phosphoryl-Gruppen sowie mit der intrazellulären RNA und DNA der Mikroorganismen interagieren. Dadurch wird einerseits deren Zellmembran geschädigt und andererseits die Proteinbiosynthese und DNA-Replikation beeinflusst. Die Summation dieser Prozesse hat schlussendlich den Zelltod der Bakterien zur Folge [Lee et al 2014, Morones-Ramirez et al 2013, Gordon et al 2010, Knetsch & Koole 2011, Li et al 2010, Atiyeh et al 2007, Lansdown 2006]. Titan hingegen wird v.a. aufgrund seiner guten Biokompatibilität, der hohen Korrosionswiderstandsfähigkeit und seiner mechanischen Eigenschaften häufig und bevorzugt in Biomaterialien in reiner Form oder in Verbindung mit anderen Materialien wie Silber verwendet [Fiedler et al 2011, Zhao et al 2009, Strietzel et al 1998].

Bei der hier untersuchten TiAg-Verbundbeschichtung wurden mittels rotierender Ti- und Ag-Quellen des PVD-Systems abwechselnd Ti- und Ag-Schichten mit zur Oberfläche graduell ansteigendem Ag-Anteil in einem Verbundsystem aufgebracht. Dies soll eine verlängerte Silber-Ionen Freisetzung ermöglichen, mit einer damit einhergehenden längeren antimikrobiellen Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verhinderung einer zu starken Delamination über die Zeit. Durch die Kombination von Silber mit Titan soll darüber hinaus eine lang anhaltende Stabilität bei hohem Korrosionswiderstand erreicht werden.

Diese Eigenschaften wurden bereits in anderen Studien zu TiAg-Verbindungen gezeigt. Oh et al. konnten beispielsweise durch die Hinzunahme von Silber einen Anstieg der Festigkeit des Materials um 33% sowie eine erhöhte Korrosionswiderstandsfähigkeit im Vergleich zu purem Titan erreichen [Oh et al 2005]. Diese Beobachtungen einer verbesserten Korrosionswiderstandsfähigkeit und einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften konnten auch in anderen Studien bestätigt werden [Zhang et al 2009, Oh et al 2006]. Es wurde außerdem gezeigt, dass von einer TiAg-Beschichtung nicht nur initial, sondern auch im weiteren Verlauf kontinuierlich auf einem etwa gleichbleibendem Niveau Ag^+ -Ionen freigesetzt werden [Gao et al 2014].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus v.a. auf die Fragestellung nach der Biokompatibilität der TiAg-Verbundbeschichtung gelegt. Die antimikrobielle Wirksamkeit dieser neuartigen Verbundbeschichtung wurde hingegen nicht untersucht. Diese Eigenschaft von Silber-Beschichtungen im Allgemeinen untersuchten jedoch schon einige vorherige Studien, die deren antibakterielle Wirkung belegen konnten. Dabei sind Silber-Legierungen effektiver als eine alleinige Silber-Beschichtung, da letztere über Protein-Anionen leicht in ihrer Wirkung deaktiviert werden kann [Monteiro et al 2009, Stobie et al 2008, Furno et al 2004]. In einer Studie von Zheng et al. wurde eine TiNi-basierte Legierung mit Silber untersucht und mit einer reinen TiNi-Verbindung hinsichtlich seiner antimikrobiellen Wirkung verglichen. Dafür wurden diese beiden Verbindungen gegenüber drei verschiedenen Bakterienstämmen getestet. Durch die Hinzunahme von Silber und die bakterizide Wirkung der Ag^+ -Ionen konnte eine signifikante Verringerung der Bakterienanzahl auf der Oberfläche erzielt werden, bei höherer Materialfestigkeit sowie gleicher Korrosionswiderstandsfähigkeit und Biokompatibilität [Zheng et al 2011]. Auch der Vergleich von mit Silber beschichteten

Titan-Vanadium-Prothesen mit nicht beschichteten Titan-Prothesen zeigte einen klaren antimikrobiellen Vorteil durch die Hinzunahme von Silber. Hierbei wurden Patienten prospektiv über fünf Jahre hinsichtlich periprothetisch auftretender Infektionen untersucht. Die Inzidenz der Infektion konnte durch die Silber-Beschichtung auf 5,9% im Vergleich zu den Titan-Prothesen (17,6%) gesenkt werden. Patienten mit einer periprothetischen Infektion der Ti-Prothese mussten in 38,5% der Fälle schlussendlich amputiert oder mit einer Rotationsplastik versorgt werden. Patienten, die eine mit Silber beschichtete Titan-Vanadium-Prothese erhalten hatten, benötigten innerhalb des untersuchten Zeitraumes eine solche radikale operative Maßnahme nicht. Hier reichten eine alleinige antibiotische Behandlung (66,7%) oder kleinere Revisionsoperationen (33,3%) aus [Hardes et al 2010]. Auch die Kombination von Silber mit einer Ti_6AlV_4 -Verbindung zeigte eine vielversprechende antibakterielle Wirkung [Fiedler et al 2011]. Ebenso gibt es Untersuchungen zu TiAg-Legierungen, welche deren antimikrobielle Wirksamkeit belegen [Zhao et al 2009]: In einer *in vitro* Studie zu einer solchen Verbindung wurde, ebenfalls wie in der vorliegenden Arbeit, mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD) eine ca. 2 μ m dicke TiAg-Schicht auf eine Titanoberfläche aufgebracht. Der Silbergehalt dieser Oberflächenbeschichtung betrug dabei zwischen 0,7 und 9%. Im weiteren Verlauf wurden auf dieser TiAg-Oberfläche sowie auf einer reinen Ti-Oberfläche als Kontrolle Bakterienkulturen (*Staphylococcus epidermidis* & *Klebsiella pneumoniae*) angelegt. Von der TiAg-Legierung wurden dabei kontinuierlich Ag^+ -Ionen in einer nicht toxischen Konzentration von 0,5 - 2,3ppb freigesetzt, wodurch *in vitro* ein suffizienter antimikrobieller Effekt ausgeübt wurde: Die bakterielle Besiedlung der TiAg-Oberfläche konnte dadurch signifikant gegenüber der Kontroll-Oberfläche (100%) um 43 - 52% (*Staphylococcus epidermidis*) sowie 32 - 64% (*Klebsiella pneumoniae*) gesenkt werden [Ewald et al 2006]. Eine weitere *in vitro* Studie, bei der ein Titan-Trägermaterial mit einer 2, 4 sowie 6 Gew% Silber dotierten Hydroxyapatit-Beschichtung analysiert wurde, zeigte ähnliche Resultate: Hier wurde nach Testung der Schicht mit *Pseudomonas aeruginosa* eine signifikante Reduktion der Oberflächenadhäsion dieser Bakterien beobachtet und somit die antimikrobielle Wirkung von Silber bestätigt [Roy et al 2012]. Auch Gao et al. konnten in der bereits erwähnten Studie eine ausreichende Ag^+ -Ionen-Freisetzung nachweisen und gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* eine suffiziente und lang anhaltende

antibakterielle Wirkung erreichen. Ebenso zeigte sich in dieser Studie nahezu keine Zytotoxizität, sondern eine positive Auswirkung auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung insbesondere der Osteoblasten [Gao et al 2014]. Andere Studien konnten diese Beobachtungen ebenfalls bestätigen [Hardes et al 2007b, Ewald et al 2006]. Eine Untersuchung zu Ti-Hüftprothesen, die mittels PVD mit Silber beschichtet wurden, analysierte außerdem explizit die ossäre Integration dieser Implantate. Dabei konnte *in vivo* sowie radiologisch, histologisch und biomechanisch eine stabile ossäre Integration gezeigt werden [Hauschild et al 2015]. In einer angemessenen Konzentration zeigt Silber somit keine zytotoxischen Nebenwirkungen auf Osteoblasten und behindert eine Osseointegration folglich nicht.

Die antimikrobielle Wirksamkeit von TiAg-Legierungen sowie die positiven Auswirkungen durch die Hinzunahme von Silber u.a. auf die Korrosionswiderstandsfähigkeit und Materialfestigkeit ist somit durch bisherige Studien bereits untersucht und gezeigt worden. Der Einfluss einer solchen Oberflächenmodifikation auf das Muskelgewebe *in vivo* wurde bisher hingegen weniger erforscht. Für die erfolgreiche Osseointegration eines Implantates ist neben der Verhinderung einer Infektion jedoch ebenso eine gute Biokompatibilität der eingebrachten Materialien mit dem umgebenden Gewebe bei gleichzeitiger minimaler, bis gänzlich fehlender Zytotoxizität von großer Wichtigkeit. Essentiell sind dabei gute vaskuläre Bedingungen mit Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerkes um das implantierte Material herum. Durch eine solche Neovaskularisation ist eine Versorgung einerseits mit körpereigenen Zellen zur Implantatintegration gewährleistet sowie andererseits mit Immunzellen zur Bekämpfung körperfremder Mikroorganismen. Eine insuffiziente Blutversorgung bzw. eine durch Implantatmaterialien hervorgerufene negative Beeinflussung der lokalen vaskulären Situation kann zu einer nicht ausreichenden Integration und zum Zelltod von umgebendem Gewebe führen [Rouwkema et al 2008]. Ein solcher Vorgang würde im Weiteren eine Osseo- und Gewebeintegration erschweren oder im schlimmsten Fall verhindern sowie eine Infektion begünstigen.

Mikrozirkulatorische Parameter spielen dabei zur Bewertung der Biokompatibilität eines neuen Implantatmaterials eine entscheidende Rolle. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten sehr konstante Werte hinsichtlich des Gefäßdurchmessers, der

Erythrozytenfließgeschwindigkeit, des Blutvolumenflusses und der Wandscherrate über den Versuchszeitraum hinweg und damit eine gute Gefäßverträglichkeit der getesteten TiAg-Implantate. Die funktionelle kapillare Dichte als Maß der Gewebepfusion wies ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im Verlauf auf. Lediglich innerhalb der reinen Titan-Versuchsgruppe fiel direkt nach Implantation ein transienter, leichter Anstieg der funktionellen kapillaren Dichte auf, jedoch mit anschließender Normalisierung bis zum Versuchsende. Wichtig war jedoch, dass es zu keiner Zeit zu einer Abnahme der funktionellen kapillaren Dichte sowohl in der Ti- als auch der TiAg-Gruppe kam, wodurch eine mechanische Beeinflussung des Gewebes und somit der untersuchten Parameter durch die Implantate ausgeschlossen werden konnte.

Beim Vergleich der drei Versuchsgruppen gegeneinander konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gefäßpermeabilität festgestellt werden. Jedoch wurde ein signifikanter Anstieg vom Tag der Implantation (d0, 1h) bis zum letzten Untersuchungstag (d7) sowohl innerhalb der Kontroll- als auch in der TiAg-Implantatgruppe beobachtet. Alle drei Gruppen zeigten zum Ende des Versuchszeitraumes eine erhöhte Extravasation. Dieses Phänomen wurde auch in vorherigen Studien [Roetman et al 2010, Laschke et al 2007] beobachtet und kann als Folge der Versuchsdauer sowie als Nebenwirkung der repetitiven Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen und einer damit einhergehenden Endothelschädigung im Laufe der Zeit interpretiert werden [Povlishock et al 1983]. Die Tiere mit TiAg-beschichteten Implantaten zeigten im Vergleich zur Ti- und Kontrollgruppe außerdem sehr ähnliche Werte der Gefäßpermeabilität an den einzelnen Zeitpunkten und im zeitlichen Verlauf. Die TiAg-beschichteten Implantate führten im Gegensatz zu einer Studie zu reinen Ag-Implantaten nicht zu negativen Folgen einer venulären Gefäßdilatation oder dem Verlust der endothelialen Integration [Kraft et al 2000]. Aufgrund der intakten kapillären und venulären Perfusion kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sowohl die Ti-Implantate als auch die TiAg-Implantate hinsichtlich der eben erläuterten Parameter gut toleriert wurden.

Bei der Analyse einer inflammatorischen Reaktion berichteten Kraft et al. in der bereits erwähnten Studie im Rückenhautkammer-Modell des Hamsters initial nach Implantation von sowohl reinen Ti- als auch reinen Ag-Implantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe über einen massiven Anstieg der rollenden und adhärenen Leukozyten [Kraft

et al 2000]. In der vorliegenden Studie konnte lediglich initial ein erhöhter Zellfluss innerhalb der TiAg-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontroll- und Ti-Gruppe beobachtet werden, welcher jedoch bis zum Versuchsende wieder auf vergleichbare Werte der Kontrolltiere absank. Es zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg der rollenden Leukozyten, weder in der Ti- noch in der TiAg-Gruppe. Sowohl in zentralen als auch peripheren Untersuchungsfeldern wurden Werte gemessen, die zu jedem Zeitpunkt mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar waren. Auch im zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die rollenden Leukozyten festgestellt werden. Lediglich die Analyse der adhärennten Leukozyten zeigte vorübergehende signifikante Veränderungen innerhalb der Ti-Gruppe und im Vergleich dieser mit der TiAg- und Kontrollgruppe in zentralen und peripheren Untersuchungsfeldern: Hier fiel eine initial nach der Implantation (d0, 1h) erhöhte Anzahl dieser Zellen im Vergleich zur Kontroll- und TiAg-Versuchsgruppe auf. Bereits am nächsten Untersuchungstag (d1) konnte jedoch schon eine verminderte Anzahl der adhärennten Zellen festgestellt werden mit weiterer Reduktion auf vergleichbare Werte der Kontroll- und TiAg-Implantat-Tiere bis zum Ende des Versuchszeitraumes (d7). Dieser initiale, aber nur transiente Anstieg der adhärennten Leukozyten konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden [Pennekamp et al 2007, Pennekamp et al 2006, Kraft et al 2003, Kraft et al 2001, Kraft et al 2000]. Hervorzuheben ist hingegen, dass Venolen in den zentralen und peripheren Untersuchungsfeldern der TiAg-Implantate zu keiner Zeit eine signifikant erhöhte Anzahl adhärennter Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten. Sie wiesen lediglich einen leichten Anstieg initial mit abnehmender Tendenz im zeitlichen Verlauf auf, ähnlich zu den Werten der Kontrollgruppe. Es kann dabei allerdings angenommen werden, dass die Implantation von Fremdmaterialien physiologischer Weise eine akute temporäre Entzündungsreaktion mit einer damit einhergehenden leicht erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion hervorruft und damit als Teil eines normalen Reparations- und Integrationsprozesses angesehen werden kann [Laschke et al 2006]. Darüber hinaus konnten makroskopisch weder eine Ausbildung von Ödemen noch Zeichen von Blutungen oder einer Inflammation beobachtet werden. Die Tiere zeigten außerdem ein normales Fress- und Orientierungsverhalten.

Die histologische Analyse des Rückenhautkammer-Gewebes im Bereich der Implantation

zeigte in der Ti- und TiAg-Gruppe nur geringe Anzeichen einer Inflammation sowohl nach H&E- als auch CAE-Färbung. Auch nach immunhistochemischer F4/80-Markierung konnte nur eine geringe Infiltration mit Makrophagen nachgewiesen werden. Zur Interpretation dieser Ergebnisse hilft das Verständnis über die physiologischen Prozesse der Wundheilung: Diese wird in eine inflammatorische- und proliferative Phase sowie in eine Phase des Gewebeumbaus unterteilt [Singer & Clark 1999]. Dabei aktivieren Thrombozyten nach einem Gewebetrauma Zellen des Immunsystems, wobei dabei den Makrophagen eine entscheidende Rolle zukommt. Sie wandern in das betroffene Gebiet ein und phagozytieren u.a. geschädigtes und apoptotisches Gewebe sowie infizierende Mikroorganismen und stimulieren außerdem über die Freisetzung von Zytokinen weitere Zellen wie u.a. Fibroblasten und Gefäßendothelzellen und dadurch eine Neovaskularisation. Diese Prozesse führen zu einer Gewebeproliferation und einem Gewebeumbau und schlussendlich zu einer Regeneration des geschädigten Gewebes [Hergert et al 2013, Shapiro et al 2011, Kujath & Michelsen 2009]. Die in den histologischen Präparaten abgelaufene inflammatorische Reaktion kann somit als eine physiologische Reaktion des Organismus auf die Implantation der Rückenhautkammer und als normaler und positiver Prozess innerhalb der Wundheilung gewertet werden.

Die Oberfläche der TiAg-Implantate wies nach PVD-Beschichtung einen initialen Silberanteil von 72Gew% mit geringeren Anteilen an Titan und Aluminium auf. Diese TiAg-Verbundbeschichtung wurde vor und nach der Implantation mithilfe von EDA-Analysen untersucht. Dabei zeigte sich durch eine prozentuale Abnahme des Silbergehaltes eine suffiziente Freisetzung von Silber. Außerdem konnte am Ende des Versuchszeitraumes eine vorhandene Oberflächen-Integrität der TiAg-Plättchen festgestellt werden.

Insgesamt wurden makroskopisch keine Anzeichen einer gestörter Perfusion oder erhöhten Inflammation festgestellt. Auch mikroskopisch zeigte die Analyse der mikrovaskulären Parameter eine gute Verträglichkeit der getesteten Implantate. Sowohl intravitalmikroskopisch als auch histologisch konnte darüber hinaus eine stark erhöhte inflammatorische Reaktion ausgeschlossen werden.

Vorherige Studien bewiesen bereits die antimikrobielle Wirkung von TiAg-Verbindungen, weshalb diese Eigenschaft der in dieser Arbeit getesteten TiAg-Verbundbeschichtung

ebenfalls angenommen werden kann. Zur genaueren Einschätzung bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Auch die erfolgreiche ossäre Integration mittels PVD mit Silber beschichteter Ti-Prothesen wurde bereits beschrieben [Hauschild et al 2015]. Daher wäre ebenso eine Untersuchung der hier getesteten TiAg-Plättchen bei Kontakt mit Knochenmaterial möglich, um das Ausmaß dieser Verbindung zur Osseointegration zu testen.

In der Zusammenschau der gesamten Ergebnisse dieser Arbeit kann jedoch bereits jetzt geschlussfolgert werden, dass die neuartige TiAg-Verbundbeschichtung im Mausmodell *in vivo* eine sehr gute Biokompatibilität aufweist. Sie wurde vom Organismus gut toleriert und bietet somit die Grundlage für weitere Untersuchungen mit dem möglichen Ziel einer Testung im menschlichen Organismus.

6 Literaturverzeichnis

Abshagen A, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B. **In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone®**. J Biomed Mater Res A 2009; 91 (2): 557-566

Alexander JW. **History of the Medical Use of Silver**. Surg Infect 2009; 10 (3): 289-292

Alexander S, Koehl GE, Hirschberg M, Geissler EK, Friedl P. **Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model**. Histochem Cell Biol 2008; 130 (6): 1147-1154

Algire GH. **An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse**. J Natl Cancer Inst 1943; 4: 1-11

Anbarasan C, Bavaniatha M, Latchumanadhas K, Mullasari SA. **ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies**. Indian Heart J 2015; 67 (3): 282-287

Arciola CR, Montanaro L, Costerton JW. **New trends in diagnosis and control strategies for implant infections**. Int J Artif Organs 2011; 34 (9): 727-736

Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SH, Dibo SA. **Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literatur**. Burns 2007; 33 (2): 139-148

Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. **Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamine 6G**. Int J Microcirc 1995; 15: 85-91

Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, Osmon DR. **Risk Factors for Prosthetic Joint Infection: Case-Control Study**. Clin Infect Dis 1998; 27: 1247-1254

Bereiter-Hahn J, Seipel KH, Vöth M. **Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI of Rhodamine 6GO**. Cell Biochem Funct 1983; 1: 147-155

Berry DJ, Harmsen J, Cabanela ME, Morrey BF. **Twenty-Five-Year Survivorship of Two Thousand Consecutive Primary Charnley Total Hip Replacements**. J Bone Joint Surg Am 2002; 84-A (2): 171-177

Bozic KJ, Katz P, Cisternas M, Ono L, Ries MD, Showstack J. **Hospital Resource Utilization For Primary And Revision Total Hip Arthroplasty**. J Bone Joint Surg Am 2005; 87 (3): 570-576

Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ Jr, Vollmar B. **Contribution of Protein Z and Protein Z-Dependent Protease Inhibitor in Generalized Shwartzman Reaction**. Crit Care Med 2013; 41 (12): 447-456

Cao L, Kobayakawa S, Yoshiki A, Abe K. **High Resolution Intravital Imaging of Subcellular Structures of Mouse Abdominal Organs Using a Microstage Device**. PLoS One 2012; 7 (3): e33876

Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH. **Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy**. Microvasc Res 1970; 2: 67-76

- Chadi SA, Abdo H, Bihari A, Parry N, Lawendy AR. **Hepatic microvascular changes in rat abdominal compartment syndrome.** J Surg Res 2015; 197 (2): 398-404
- Chen X, Schluesener HJ. **Nanosilver: A nanoparticle in medical application.** Toxicol Lett 2008; 176 (1): 1-12
- Damjanovich S, Fidy J, Szöllösi J. **Biophysik für Mediziner.** Medicina 2008
- Dancer SJ, Stewart M, Coulombe C, Gregori A, Viridi M. **Surgical site infections linked to contaminated surgical instruments.** J Hosp Infect 2012; 81 (4): 231-238
- Danscher G, Locht LJ. **In vivo liberation of silver ions from metallic silver surfaces.** Histochem Cell Biol 2010; 133 (3): 359-366
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Vallez MO, Lameire NH, De Buyzere M, Vanhoutte PM. **Off-Line Analysis of Red Blood Cell Velocity in Renal Arterioles.** J Vasc Res 2000; 37: 26-31
- Del Pozo JL, Patel R. **Infection Associated with Prosthetic Joints.** N Engl J Med 2009; 361 (8): 787-794
- Di Paola R, Cuzzocrea S. **Peroxisome proliferator-activated receptors ligands and ischemia-reperfusion injury.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2007; 375 (3): 157-175
- Dunn KW, Sandoval RM, Kelly KJ, Dagher PC, Tanner GA, Atkinson SJ, Bacallao RL, Molitoris BA. **Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy.** Am J Physiol Cell Physiol 2002; 283 (3): C905-C916
- Edwards-Jones V. **The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare.** Lett Appl Microbiol 2009; 49 (2): 147-152
- Eggeling C, Volkmer A, Seidel CAM. **Molecular photobleaching kinetics of Rhodamine 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy.** Chem Phys Chem 2005; 6: 791-804
- Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. **Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters.** Res Exp Med 1980; 177: 125-134
- Eschler A, Ender SA, Ulmar B, Herlyn P, Mittlmeier T, Gradl G. **Cementless Fixation of Osteoporotic VCFs Using Titanium Mesh Implants (OsseoFix): Preliminary Results.** Biomed Res Int 2014; 2014: 853897
- Ewald A, Glückermann SK, Thull R, Gbureck U. **Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium.** Biomed Eng Online 2006; 5: 22
- Fiedler J, Kolitsch A, Kleffner B, Henke D, Stenger S, Brenner RE. **Copper and silver ion implantation of aluminium oxide-based titanium surfaces: proliferative response of osteoblasts and antibacterial effects.** Int J Artif Organs 2011; 34 (9): 882-888
- Field RE, Cronin MD, Singh PJ. **The Oxford hip scores for primary and revision hip replacement.** J Bone Joint Surg Br 2005; 87 (5): 618-622
- Finkenauer V, Bissinger T, Funk RHW, Karbowski A, Seiffge D. **Confocal Laser Scanning Microscopy of Leucocyte Adhesion in the Microcirculation of the Inflamed Rat Knee Joint Capsule.** Microcirculation 1999; 6 (2): 141-152

- Flugsrud GB, Nordsletten L, Espehaug B, Havelin LI, Engeland A, Meyer HE. **The Impact of Body Mass Index on Later Total Hip Arthroplasty for Primary Osteoarthritis: A Cohort Study in 1,2 Million Persons.** *Arthritis Rheum* 2006; 54 (3): 802-807
- Frenette PS. **Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm.** *Curr Opin Hematol* 2002; 9 (2): 101-106
- Friesecke C, Wodtke J. **Management des Protheseninfektes.** *Chirurg* 2008; 79: 777-794
- Frommelt L. **Prinzipien der Antibiotikabehandlung bei periprothetischen Infektionen.** *Orthopäde* 2004; 33: 822-826
- Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ. **Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?** *J Antimicrob Chemother* 2004; 54 (6): 1019-1024
- Gainé WJ, Ramamohan NA, Hussein NA, Hullin MG, McCreath SW. **Wound infection in hip and knee arthroplasty.** *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82-B: 561-565
- Gao A, Hang R, Huang X, Zhao L, Zhang X, Wang L, Tang B, Ma S, Chu PK. **The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts.** *Biomaterials* 2014; 35 (13): 4223-4235
- Gorbet MB, Sefton MV. **Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes.** *Biomaterials* 2004; 25 (26): 5681-5703
- Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, Landmann R, Fromm KM. **Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection: Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (10): 4208-4218
- Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Kemper FH, Winkelmann W, von Eiff C. **Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model – an analysis of the infection rate and toxicological side effects.** *Biomaterials* 2004; 25 (24): 5547-5556
- Gravins FNE. **Intravital microscopy: new insights into cellular interactions.** *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12 (5): 601-607
- Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. **Infections from biomaterials and implants: a race for the surface.** *Med Prog Technol* 1988; 14 (3-4): 205-224
- Gristina AG. **Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration.** *Science* 1987; 237 (4822): 1588-1595
- Haaker R, Senge A, Krämer J, Rubenthaler F. **Osteomyelitis nach Endoprothesen.** *Orthopäde* 2004; 33: 431-438
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. **Evolving concepts in Biofilm infections.** *Cell Microbiol* 2009; 11 (7): 1034-1043
- Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitbuenger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Wedemeyer C, Saxler G, Winkelmann W, Gosheger G. **Lack of toxicological side effects in silver-coated megaprotheses in humans.** *Biomaterials* 2007a; 28 (18): 2869-2875

- Hardes J, Streitburger A, Ahrens H, Nusselt T, Gebert C, Winkelmann W, Battmann A, Gosheger G. **The Influence of Elementary Silver Versus Titanium on Osteoblasts Behavior In Vitro Using Human Osteosarcoma Cell Lines.** Sarcoma 2007b; 2007: 26539
- Hardes J, von Eiff C, Streitbuenger A, Balke M, Budny T, Henrichs MP, Hauschild G, Ahrens H. **Reduction of Periprosthetic Infection With Silver-Coated Megaprotheses in Patients With Bone Sarcoma.** J Surg Oncol 2010; 101 (5): 389-395
- Harrasser N, Harnoss T. **Prävention periprotetischer Gelenksinfektionen.** Wien Med Wochenschr 2012; 162 (5-6): 115-120
- Hauschild G, Hardes J, Gosheger G, Stoeppeler S, Ahrens H, Blaske F, Wehe C, Karst U, Höll S. **Evaluation of Osseous Integration of PVD-Silver-Coated Hip Prostheses in a Canine Modell.** Biomed Res Int 2015; 2015: 292406
- Hergert B, Grambow E, Butschkau A, Vollmar B. **Effects of systemic pretreatment with CpG oligodeoxynucleotides on skin wound healing in mice.** Wound Repair Regen 2013; 21 (5): 723-729
- Herrmann KS. **Platelet Aggregation Induced in the Hamster Cheek Pouch by a Photochemical Process with Excited Fluorescein Isothiocyanate-Dextran.** Microvasc Res 1983; 26 (2): 238-249
- Hetrick EM, Schoenfisch MH. **Reducing implant-related infections: active release strategies.** Chem Soc Rev 2006; 35 (9): 780-789
- Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K. **Ischemia and Reperfusion in Pancreas.** Microsc Res Tech 1997; 37 (5-6): 557-571
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms.** Int J Antimicrob Agents 2010; 35 (4): 322-332
- Hussmann B, Johann I, Kauther MD, Landgraeber S, Jäger M, Lendemann S. **Measurement of the Silver Ion Concentration in Wound Fluids After Implantation of Silver-Coated Megaprotheses: Correlation with the Clinical outcome.** Biomed Res Int 2013; 2013: 763096
- Jansen B, Rinck M, Wolbring P, Strohmeier A, Jahns T. **In vitro evaluation of antimicrobial efficacy and biocompatibility of silver-coated central venous catheter.** J Biomater Appl 1994; 9 (1): 55-70
- Jassim SS, Vanhegan IS, Haddad FS. **The Epidemiology of Total Hip Arthroplasty in England and Wales.** Semin Arthro 2012; 23: 197-199
- Jeanmonod P, Laschke MW, Gola N, von Heesen M, Glanemann M, Dold S, Menger MD, Moussavian MR. **Silver acetat coating promotes early vascularization of Dacron vascular grafts without inducing host tissue inflammation.** J Vasc Surg 2013; 58 (6): 1637-1643
- Jeanmonod P, Laschke MW, Gola N, von Heesen M, Glanemann M, Menger MD, Moussavian MR. **Early Host Tissue Response to Different Types of Vascular Prostheses Coated with Silver Acetate or Vaporized Metallic Silver.** Eur J Vasc Endovasc Surg 2014; 47 (6): 680-688

- Johannes H. **Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmyzelien II. Die Inturbanz der Färbungen mit Rhodaminen.** Protoplasma 1941; 36: 181-194
- Khandoga A, Mende K, Ishanderov E, Rosentreter D, Schelcher C, Reifart J, Jauch KW, Thasler WE. **Augmenter of liver regeneration attenuates inflammatory response in the posts ischemic mouse liver in vivo.** J Surg Res 2014; 192 (1): 187-194
- Kiefel V, Müller-Eckhardt C. **Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik.** Springer Verlag 2010; 4. Auflage, überarb. u. erw. Aufl. 2011 (15. November 2010)
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** Nanomedicine 2007; 3 (1): 95–101
- Klasen HJ. **Historical review on the early use of silver in the treatment of burns. 1. Early uses.** Burns 2000; 26 (2): 117-130
- Knetsch MLW, Koole LH. **New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles.** Polymers 2011; 3: 340-366
- Kraft CN, Burian B, Diedrich O, Gessmann J, Wimmer MA, Pennekamp PH. **Microvascular response of striated muscle to common arthroplasty-alloys: A comparative in vivo study with CoCrMo, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb.** J Biomed Mater Res A 2005; 75 (1): 31-40
- Kraft CN, Burian B, Perlick L, Wimmer MA, Wallny T, Schmitt O, Dietrich O. **Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: A comparative in vivo study.** J Biomed Mater Res 2001; 57 (3): 404-412
- Kraft CN, Diedrich O, Burian B, Schmitt O, Wimmer MA. **Microvascular response of striated muscle to metal debris – A comparative in vivo study with titanium and stainless steel.** J Bone Joint Surg Br 2003; 85 (1): 133-141
- Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B. **Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel.** J Biomed Mater Res 2000; 49 (2): 192-199
- Kubulus D, Roesken F, Amon M, Rücker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD. **Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H2332-H2340
- Kujath P, Michelsen A. **Wunden - von der Physiologie zum Verband.** cme.aerzteblatt.de/kompakt 2009 (1); <http://www.aerzteblatt.de/archiv/64184>
- Langlais F, Belot N, Ropars M, Thomazeau H, Lambotte JC, Cathelineau G. **Antibiotic cements in articular prostheses: current orthopedic concepts.** Int J Antimicrob Agents 2006; 28 (2): 84-89
- Lansdown ABG. **Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use.** Curr Probl Dermatol 2006; 33: 17-34

- Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD. **Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes.** *Tissue Eng* 2006; 12 (8): 2093-2104
- Laschke MW, Häufel JM, Scheuer C, Menger MD. **Angiogenic and Inflammatory Host Response to Surgical Meshes of Different Mesh Architecture and Polymer Composition.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 91 (2): 497-507
- Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. **The Dorsal Skinfold Chamber: Window Into The Dynamic Interaction Of Biomaterials With Their Surrounding Host Tissue.** *Eur Cell Mater* 2011; 22: 147-167
- Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. **Injectable Nanocrystalline Hydroxyapatite Paste for Bone Substitution: In Vivo Analysis of Biocompatibility and Vascularization.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 82 (2): 494-505
- Lee KM, Park JU, Kwon ST, Kim SW, Jeong EC. **Three-Dimensional Pre-Bent Titanium Implant for Concomitant Orbital Floor and Medial Wall Fractures in an East Asian Population.** *Arch Plast Surg* 2014; 41 (5): 480-485
- Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. **Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.** *Am J Pathol* 1993; 143: 1055-1062
- Li S, Marks JA, Eisenstadt R, Kumasaka K, Samadi D, Johnson VE, Holena DN, Allen SR, Browne KD, Smith DH, Pascual JL. **Enoxaparin ameliorates post-traumatic brain injury edema and neurologic recovery, reducing cerebral leukocyte endothelial interactions and vessel permeability in vivo.** *J Trauma Acute Care Surg* 2015; 79 (1): 78-84
- Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Ou-Yang YS, Chen YB. **Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85 (4): 1115-1122
- Long M, Rack HJ. **Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective.** *Biomaterials* 1998; 19 (18): 1621-1639
- Marculescu CE, Osmon DR. **Antibiotic Prophylaxis in Orthopedic Prosthetic Surgery.** *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19 (4): 931-946
- Masedunskas A, Milberg O, Porat-Shliom N, Sramkova M, Wigand T, Amornphimoltham P, Weigert R. **Intravital microscopy. A practical guide on imaging intracellular structures in live animals.** *Bioarchitecture* 2012; 2 (5): 143-157
- McGarry SA, Engemann JJ, Schmader K, Sexton DJ, Kaye KS. **Surgical-Site Infection Due To Staphylococcus Aureus Among Elderly Patients: Mortality, Duration Of Hospitalization, And Cost.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25 (6): 461-467
- Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. **Neovascularization of Preosthetic Vascular Grafts. Quantitative Analysis of Angiogenesis and Microhemodynamics by Means of Intravital Microscopy.** *Thorac Cardiovasc Surg* 1990a; 38 (3): 139-145
- Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. **Viewing the microcirculation through the window: Some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber.** *Eur Surg Res* 2002; 34: 83-91

- Menger MD, Walter P, Hammersen F, Messmer K. **Quantitative analysis of neovascularisation of different PTFE-Implants.** Eur J Cardio-thorac Surg 1990b; 4 (4): 191-196
- Militz M, Bühren V. **Wechsel infizierter Knie- und Hüftendoprothesen.** Chirurg 2010; 81: 310-320
- Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. **The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver.** Int J Antimicrob Agents 2009; 34 (2): 103-110
- Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. **Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-negative Bacteria.** Sci Transl Med 2013; 5 (190): 190ra81
- Naik MN, Murthy RK, Honavar SG. **Comparison of Vascularization of Medpor and Medpor-Plus Orbital Implants: A Prospective, Randomized Study.** Ophthal Plast Reconstr Surg 2007; 23 (6): 463-467
- Oh KT, Joo UH, Park GH, Hwang CJ, Kim KN. **Effect of Silver Addition on the Properties of Nickel-Titanium Alloys for Dental Application.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006; 76 (2): 306-314
- Oh KT, Shim HM, Kim KN. **Properties of Titanium-Silver Alloys for Dental Application.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 74 (1): 649-658
- Orth JD, Kohler RH, Fojjier F, Sorger PK, Weissleder R, Mitchison TJ. **Analysis of Mitosis and Antimitotic Drug Response in Tumors by In Vivo Microscopy and Single-Cell Pharmacodynamics.** Cancer Res 2011; 71 (13): 4608-4616
- Ostermeier S, Dickreiter B. **Endoprothesen-Operation: Zellbiologische Regulation verbessert das Ergebnis.** Ärztliches Journal Orthopädie/Rheumatologie 2014; 2: 6-8
- Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA. **Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues.** Arch Orthop Trauma Surg 2000; 120 (10): 570-574
- Panés J, Perry M, Granger DN. **Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention.** Br J Pharmacol 1999; 126: 537-550
- Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. **A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold.** Microvasc Res 1979; 18: 311-318
- Parvizi J, Adeli B, Zmistowski B, Restrepo C, Greenwald AS. **Management of Periprosthetic Joint Infection: The Current Knowledge. AAOS Exhibit Selection.** J Bone Joint Surg Am 2012; 94 (14): e104
- Pennekamp PH, Gessmann J, Diedrich O, Burian B, Wimmer MA, Frauchiger VM, Kraft CN. **Short-Term Microvascular Response of Striated Muscle to cp-Ti, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb.** J Orthop Res 2006; 24 (3): 531-540
- Pennekamp PH, Wimmer MA, Eschbach L, Burian B, Koch P, Kraft CN. **Microvasculatory reaction of skeletal muscle to Ti-15Mo in comparison to well-established titanium alloys.** J Mater Sci Mater Med 2007; 18 (10): 2053-2060

- Penning LC, Dubbelman TM. **Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects.** *Anti-Cancer Drugs* 1994; 5: 139-146
- Peters E, Pritzkeleit R, Beske F, Katalinic A. **Demografischer Wandel und Krankheitshäufigkeiten.** *Bundesgesundheitsbl* 2010; 53: 417-426
- Pittet MJ, Weissleder R. **Intravital Imaging.** *Cell* 2011; 147 (5): 983-991
- Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP. **An Ultrastructural Analysis of Endothelial Change Paralleling Platelet Aggregation in a Light/Dye Model of Microvascular Insult.** *Am J Pathol* 1983; 110 (2): 148-160
- Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. **Periprosthetic Joint Infection: The Incidence, Timing, and Predisposing Factors.** *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466: 1710-1715
- Rai M, Yadav A, Gade A. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.** *Biotechnol Adv* 2009; 27 (1): 76-83
- Reed MWR, Miller FN. **Importance of Light Dose in Fluorescent Microscopy.** *Microvasc Res* 1988; 36 (1): 104-107
- Robert Koch Institut. **Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell 2010“.** Robert Koch Institut 2012
- Rodriguez-Merchan EC. **Preventing surgical site infections in haemophilia patients undergoing total knee arthroplasty.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23 (6): 477-481
- Roe AL. **Collosol argentum and its ophthalmic uses.** *Br Med J* 1915; 16: 104
- Roetman B, Ring A, Langer S, Schildhauer TA, Muhr G, Köller M. **Microvascular response to calcium phosphate bone substitutes: an intravital microscopy analysis.** *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395 (8): 1147-1155
- Roller J, Laschke MW, Sethi S, Herrmann M, Menger MD. **Prolene-Monocryl-composite meshes do not increase microvascular Staphylococcus aureus adherence and do not sensitize for leukocytic inflammation.** *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393 (3): 349-357
- Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. **Vascularization in tissue engineering.** *Trends Biotechnol* 2008; 26 (8): 434-441
- Roy M, Fielding GA, Beyenal H, Bandyopadhyay A, Bose S. **Mechanical, In vitro Antimicrobial, and Biological Properties of Plasma-Sprayed Silver-Doped Hydroxyapatite Coating.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2012; 4 (3): 1341-1349
- Sáenz de Viteri V, Fuentes E. **Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials.** *Tribology - Fundamentals and Advancements* 2013, Dr. Jürgen Gegner (Ed.), ISBN: 978-953-51-1135-1, InTech, DOI: 10.5772/55860. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tribology-fundamentals-and-advancements/titanium-and-titanium-alloys-as-biomaterials>
- Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. **Intravital Fluorescence Microscopy: Impact of Light-induced Phototoxicity on Adhesion of Fluorescently Labeled Leukocytes.** *J Histochem Cytochem* 1997; 45 (4): 505-513
- Sandison JC. **A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear.** *Anat Rec* 1924; 28 (4): 281-287

- Sandison JC. **The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope.** Am J Anat 1928; 41: 447-472
- Sandoval RM, Kennedy MD, Low PS, Molitoris BA. **Uptake and trafficking of fluorescent conjugates of folic acid in intact kidney determined using intravital two-photon microscopy.** Am J Physiol Cell Physiol 2004; 287 (2): C517-C526
- Santavirta S, Gristina A, Konttinen YT. **Cemented versus cementless hip arthroplasty. A review of prosthetic biocompatibility.** Acta Orthop Scand 1992; 63 (2): 225-232
- Sato M, Ohshima N. **Platelet Thrombus Induced in vivo by Filtered Light and Fluorescent Dye in Mesenteric Microvessels in the Rat.** Thromb Res 1984; 35 (3): 319-334
- Sawhney R, Berry V. **Bacterial Biofilm Formation, Pathogenicity, Diagnostics And Control: An Overview.** Indian J Med Sci 2009; 63 (7): 313-321
- Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. **Efficacy of silver-coated medical devices.** J Hosp Infect 1998; 40 (4): 257-262
- Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. **Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review.** Injury 2006; 37: S105-112
- Schnabel P, Borelli S. **Endoprothesenregister: Höchsten Anforderungen genügen.** Dtsch Arztebl 2011; 108 (48): A-2598 / B-2170 / C-2142
- Schneider G. **Silver nitrate prophylaxis.** Can Med Assoc J 1984; 131 (1): 193-196
- Schröder U, Arfors KE, Tangen O. **Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro.** Microvasc Res 1976; 11: 33-39
- Schuschke DA, Saari JT, Ackermann DM, Miller FN. **Microvascular response in copper-deficient rats.** Am J Physiol 1989; 257 (5 Pt 2): H1607-H1612
- Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. **Infection After Total Knee Arthroplasty. A Retrospective Study Of The Treatment Of Eighty-One Infections.** J Bone Joint Surg Am 1999; 81 (10): 1434-1445
- Sendi P, Zumstein MA, Zimmerli W. **Protheseninfektionen - Eine Übersichtsarbeit für die Praxis.** Praxis 2011; 100 (13): 787-792
- Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. **Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism.** Scientific World Journal 2011; 11: 2509-2529
- Singer AJ, Clark RA. **Cutaneous wound healing.** N Engl J Med 1999; 341 (10): 738-746
- Song Z, Borgwardt L, Høiby N, Wu H, Sørensen TS, Borgwardt A. **Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms.** Orthop Rev 2013; 5 (2): 65-71
- Statistisches Bundesamt. **Bevölkerungspyramide.** Statistisches Bundesamt 2015; <https://www.destatis.de/bevoelkerungspyramide/>

- Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. **Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model.** Langenbeck's Arch Surg 2000; 385 (4): 290-298
- Stobie N, Duffy B, McCormack DE, Colreavy J, Hidalgo M, McHale P, Hinder SJ. **Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating.** Biomaterial 2008; 29 (8): 963-969
- Strietzel R, Hösch A, Kalbfleisch H, Buch D. **In vitro corrosion of titanium.** Biomaterials 1998; 19 (16): 1495-1499
- Subbiahdoss G, Kuijjer R, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ. **Microbial biofilm growth vs. tissue integration: "The race for the surface" experimentally studied.** Acta Biomater 2009; 5 (5): 1399- 1404
- Svensjö E, Saraiva EM, Amendola RS, Barja-Fidalgo C, Bozza MT, Lerner EA, Teixeira MM, Scharfstein J. **Maxadilan, the Lutzomyia longipalpis vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway.** Microvasc Res 2012; 83 (2): 185-193
- Tang YH, Vital S, Russell J, Seifert H, Granger DN. **Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia.** Exp Neurol 2015; 271: 351-357
- Tiemann AH, Homagk L, Diefenbeck M, Mückley T, Hofmann GO. **Hüftendoprothesenerhalt mit lokaler chirurgischer Revision und Anlage einer Fistula persistens.** Unfallchirurg 2007; 110: 1021-1029
- Trampuz A, Widmer AF. **Infections associated with orthopedic implants.** Curr Opin Infect Dis 2006; 19 (4): 349-356
- Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, Kuskowski M, Cheng EY, Sharkey PF, Parvizi J, Stiehl JB, Mont MA. **Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision?.** Int Orthop 2008; 32: 597-604
- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. **Does Nitrous Oxide Affect Coronary Microcirculation? An Intravital Microscopic Study in the Canine Heart.** Anesth Analg 1995; 80 (2): 249-255
- Vollmar B, Preissler G, Menger MD. **Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas.** Am J Physiol 1994; 267 (5 Pt 2): H1936-1940
- Weigert R, Sramkova M, Parente L, Amornphimoltham P, Masedunskas A. **Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals.** Histochem Cell Biol 2010; 133 (5): 481-491
- Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. **Hüft- und Kniegelenkersatz in Deutschland und den USA.** Dtsch Arztebl Int 2014; 111 (23-24): 407-416
- Woo Park D, Kruger GH, Rubin JM, Hamilton J, Gottschalk P, Dodde RE, Shih AJ, Weitzel WF. **In-vivo Vascular Wall Shear Rate and Circumferential Strain of Renal Disease Patients.** Ultrasound Med Biol 2013; 39 (2): 241-252

You C, Han C, Wang X, Zheng Y, Li Q, Hu X, Sun H. **The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity.** Mol Biol Rep 2012; 39 (9): 9193-9201

Zhang BB, Zheng YF, Liu Y. **Effect of Ag on the corrosion behavior of TiAg-alloys in artificial saliva solutions.** Dent Mater 2009; 25 (5): 672-677

Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. **Antibacterial Coatings on Titanium Implants.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009; 91 (1): 470-480

Zheng YF, Zhang BB, Wang BL, Wang YB, Li L, Yang GB, Cui LS. **Introduction of antibacterial function into biomedical TiNi shape memory alloy by the addition of element Ag.** Acta Biomater 2011; 7 (6): 2758-2767

Zimmerli W, Moser C. **Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic Biofilm infections.** FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 65 (2): 158-168

7 Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

- Abb. 1: Demographische Entwicklung Deutschlands
- Abb. 2: Hüft-Endoprothetische Eingriffe in Deutschland
- Abb. 3: Phasen der Biofilmbildung
- Abb. 4: Ablauf der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
- Abb. 5: Antibakterieller Wirkmechanismus von Silber
- Abb. 6: C57BL/6J Tyr Maus
- Abb. 7: Herstellung der Implantate
- Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes
- Abb. 9: Schema der Schichten der Rückenhautkammer
- Abb. 10: Instrumente und Bestandteile der Rückenhautkammer-Präparation
- Abb. 11: Präparation der Rückenhautkammer
- Abb. 12: Final präparierte Rückenhautkammer
- Abb. 13: Aufbau des IVM-Systems
- Abb. 14: IVM-Darstellung der funktionellen Kapillardichte, Durchmesser, Extravasation
- Abb. 15: IVM-Darstellung und Auswertung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit
- Abb. 16: IVM-Darstellung und Auswertung der Leukozyten
- Abb. 17: Histologische Darstellung der Rückenhautkammer
- Abb. 18: Makroskopische Befunde der Rückenhautkammer
- Abb. 19: Analyse der funktionellen Kapillardichte
- Abb. 20: Analyse der Extravasation
- Abb. 21: Analyse der rollenden Leukozyten
- Abb. 22: Analyse der adhärenen Leukozyten
- Abb. 23: Histologische Analyse der Rückenhautkammer
- Abb. 24: EDA-Analyse und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Implantate

7.2 Tabellen

- Tab. 1: Mikrohämodynamische Parameter zentral
- Tab. 2: Mikrohämodynamische Parameter peripher