Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Mikrobiologische Untersuchungen zur antibakteriellen Potenz von Metallionen sowie einer neuartigen antiinfektiösen Titan(IV)-oxid Oberflächenbeschichtung für medizinische Implantate

Maximilian Haenle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		**Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier**
Prüfer der Dissertation:	**1.**	**Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger**
	2.	**apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke**

Die Dissertation wurde am 06.11.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2008 angenommen.

„Prevention remains the single best treatment for infected joint replacements“

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis 5

2. Einleitung und Zielsetzung 7

3. Literaturübersicht zum Thema 9
3.1 Implantat assoziierte Infektionen 9
3.2 Antibakterielle Eigenschaften von Metallionen 18
3.3 Antiinfektiöse Oberflächen 25
3.4 Eine neuartige Sol-Gel-abgeleitete biokompatible Titanoxidbeschichtung für medizinische Implantate 30
3.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung 33

4. Material und Methoden 34
4.1 Materialien 34
3.1.1 Lösungen 34
3.1.2 Biologische Materialien 35
3.1.3 Biomaterialien 35
3.1.4 Geräte 36
4.2 Methoden 36
4.2.1 Antibakterielle Potenz der verschiedenen Metallionen 37
4.2.2 Antibakterielle Potenz verschiedener Kombinationen von Metallionen 38
4.2.3 Mikrobiologische Untersuchung beschichteter und unbeschichteter Probekörper 40
4.2.4 Korrespondierende Zytokompatibilitätstests an Gewebezellen (FBI Bayreuth) 42

5. Ergebnisse 45
5.1 Antibakterielle Potenz einzelner Metallionen 45
5.1.1 Antibakterielle Potenz von Silberionen 45
5.1.2 Antibakterielle Potenz von Quecksilberionen 46
5.1.3 Antibakterielle Potenz von Aluminiumionen 47
5.1.4 Antibakterielle Potenz von Zinkionen 47
5.1.5 Antibakterielle Potenz von Kobaltionen 47
5.1.6 Antibakterielle Potenz von Kupferionen 47
5.2 Untersuchungen zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Kombination verschiedener Metallionen 48
5.2.1 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber- und Kupferionen 48

5.2.2 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber-Silberionen 50
5.2.3 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Silber- und und Kupferionen 50
5.3 Antibakterielle Untersuchungen der TiO_2-Schicht 51
5.3.1 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640 + 10% FBS über 24 Stunden 51
5.3.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in α-MEM + 20 % FBS 56
5.3.3 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit MRSA 27065 in RPMI 1640 + 10% FBS 57
5.3.4 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640 +10% FBS über 7 Tage 58

6. Diskussion 62
6.1 Diskussion der Methode 62
6.1.1 Mikrobiologische Testverfahren 62
6.1.2 Bestimmung der antibakteriellen Potenz einzelner Metallionen und Kombinationen von Metallionen 66
6.1.3 Antibakterielle Untersuchungen der verschiedenen Oberflächenmodifikationen 67
6.2 Diskussion der Ergebnisse 68
6.2.1 Wachstumshemmung durch Metallionen 68
6.2.2 Untersuchungen der TiO_2-Oberflächenbeschichtungen 74
6.3 Zusammenführung der Ergebnisse, Diskussion und Bewertung der Schicht 79

7. Zusammenfassung 84

8. Literaturverzeichnis 86

9. Abbildungsverzeichnis 94

10. Anhang 96

11. Lebenslauf 141

12. Danksagung 142

1. Abkürzungsverzeichnis

$AgNO_3$	Silbernitrat
Ag^+	Silber
Al^{3+}	Aluminium
α-MEM	Alpha minimal essential Medium
AVERT	Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial
al.	altera
aqua dest.	aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BRD	Bundes Republik Deutschland
BV	Bildverstärker
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Co^{2+}	Kobalt
CoCrMb	Kobalt-Chrom-Molybdän
CRP	C-Reaktives Protein
Cu^{2+}	Kupfer
CVD	Chemical Vapor Deposition
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.	Escherichia
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FBI	Friedrich-Baur-Institut
FBS	Fetal Bovines Serum
gr	griechisch.
Hg^+	Quecksilber
IUP	Intrauterinpessar
i.v.	intra venös
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LD	letale Dosis
m	Masse
M	Molare Masse
M.	Morbus
McF	McFarland
mM	Millimol
µm	Mikrometer
m-RNS	messenger-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin resistenter Staphylococcus epidermidis
n	Stoffmenge

NAD^+	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natrium-Di-Hydrogen-Phosphat
Na_2HPO_4	Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat
NaOH	Natrium-Hydroxid
NH_2	Stickstoff-Di-Hydrogen (Aminogruppe)
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
op.	Operationem
P.	Pseudomonas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDLLA	Poly-D,L-Laktid
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVD	Physical Vapor Deposition
REM	Rasterelektronenmikroskop
S.	Staphylococcus oder Streptococcus
SA	Standardabweichung
SCV	Small Colony Variants
SH	Sulfhydryl
sog.	So genannte
spp.	Spezies
Std.	Stunden
TEP	Total Endoprothese
$TiAl_6V_4$	Titan-Aluminium-Vanadium
TiO	Titan(II)-oxid
TiO_2	Titan(IV)-oxid
Ti_2O_3	Titan(III)-oxid
t-RNS	transfer-Ribonukleinsäure
TSB	Tryptic Soy Brooth
u.a.	unter anderem
UHMW-	Ultra-high-molecular-weight-
UK	United Kingdom
USA	United States of America
Vol.%	Volumenprozent
Zn^{2+}	Zink

2. Einleitung und Zielsetzung

Seit der Einführung und der klinischen Etablierung künstlicher Gelenke vor über 40 Jahren hat die Entwicklung und Anwendung von Biomaterialien große Fortschritte erreicht. Heute ist die Implantation künstlicher Gelenke ein fester Bestandteil der modernen Medizin. Alleine an primären Hüftendoprothesen werden in Europa knapp 500.000 jährlich implantiert, davon mehr als 180.000 in Deutschland [11, S. 166]. Seit den 80er Jahren wird außerdem der endoprothetische Ersatz von großen Knochendefekten bei Tumorerkrankungen mit befriedigenden Langzeitergebnissen durchgeführt. Infektionen von Endoprothesen und Biomaterialien stellen dennoch weiterhin ein zentrales Problem in der Behandlung von Knochen und Gelenkerkrankungen dar. So werden Infektionsraten von ca. 5 % bei der osteosynthetischen Stabilisierung von Frakturen [21, S. 1423] beschrieben, beim primären totalen Gelenkersatz [26, S. 1411] betragen die Infektionsraten zwischen 0,5-2%. So genannte „Pin-Track“ Infektionen treten sogar in bis zu 30 % der Fälle auf [71, S.600]. Für den endoprothetischen Gelenkersatz nach der Resektion von Knochentumoren werden in der Literatur Infektionsraten von 5% bis zu 35% angegeben [2, S. 145, 14, S. 178, 68, S. 1154, 72, S. 167, 117, S. 64]. Auch die modernen Operationsverfahren unter Beachtung aseptischer Vorraussetzungen (Abb. 1.1) und eine optimierte perioperative antibiotische Prophylaxe schützen hierbei nicht ausreichend vor tiefen und oberflächlichen Infektionen.

Abbildung 2.1: Implantation einer Knie-Total-Endoprothese in einem Reinraum Operationssaal

Diese wiederum führen häufig zu chronischen Infektionen mit der Notwendigkeit zum Ausbau und ein- oder zweizeitigem Wechsel der Endoprothese. Mittlerweile gibt es zusätzlich zunehmende Probleme mit Stämmen von sehr resistenten Hospitalkeimen, welche mit Endoprotheseninfektionen in Verbindung gebracht werden [57, S. 125]. Deshalb wäre es von wesentlichem Vorteil, wenn durch die Veränderung der Endoprothesenoberflächen ein entsprechender Infektionsschutz gegeben wäre. Bisherige Versuche mit antiinfektiösen

Oberflächenbeschichtungen mittels Einbringen von Antibiotika ermöglichten jedoch nur einen kurzeitigen Schutz vor bakterieller Besiedlung [29, S. 585] und stehen zudem vor dem Problem der ansteigenden Resistenzen von Keimen, die mit Implantat assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht werden [57, S. 125]. Andere Versuche mit einer silberhaltigen Oberflächenbeschichtung zeigten bei erhöhtem Silberspiegel im Serum keinen Nachweis einer antiinfektiösen Wirkung und wurden so aus ethischen Gründen vorzeitig abgebrochen [71, S. 600].

Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war es die antiinfektiöse Wirkung eines neuen keramischen Beschichtungssystems von metallischen Biomaterialien im Modellversuch zu prüfen. Zunächst sollte hierzu in Screening-Versuchen ein Metallion als geeignetes antibakterielles Agens gefunden werden. In weiteren Versuchen wurde dann der antibakterielle Effekt der neuartigen keramischen Beschichtung auf TiO_2-Basis mit integrierten Metallionen im Modellversuch getestet. Parallel wurden durch das Friedrich-Baur Forschungsinstitut in Bayreuth Versuche zur Zytotoxizität der Metallionen, und im weiteren Verlauf auch Untersuchungen zur Zytokompatibilität der TiO_2-Schicht, durchgeführt.

3. Literaturübersicht zum Thema

3.1 Implantat assoziierte Infektionen

Biomaterialien stellen mittlerweile einen festen Bestandteil der modernen Medizin dar und haben entscheidend dazu beigetragen die Lebensqualität zu verbessern. Seit nunmehr fast 3000 Jahren werden Biomaterialien erfolgreich in der Medizin eingesetzt. Zu Beginn wurden beispielsweise Goldfäden als Nahtmaterial oder Silber- und Goldkronen in der Zahnmedizin verwendet [64, S. 283]. Kontinuierlich haben Biomaterialien Ihren Siegeszug fortgesetzt und sind heute in fast jeder Fachrichtung der modernen Medizin vertreten. Aus dem klinischen Alltag sind sie heute deshalb nicht mehr wegzudenken. Hierbei definierte D.F. Williams 1987 all jene Materialien als Biomaterialien, die als human-, zahn-, veterinärmedizinische und pharmazeutische Produkte ihre Anwendung finden, mit dem Körper in sofortigen Kontakt treten und darin verbleiben [116, S. 3421]. In der Orthopädie und Traumatologie umfassen Biomaterialien also beispielsweise Knie- oder Hüftendoprothesen, Fadenanker, Kirschnerdrähte, Metallplatten aber auch einfaches Nahtmaterial. Gerade die Implantation von Hüftendoprothesen gilt als eine der am erfolgreichsten durchführbaren orthopädischen Operationen. Dennoch ist auch eine solche Operation weiterhin mit Risiken behaftet, wobei die aseptische-Lockerung weitaus am häufigsten auftritt [69, S. 8]. Deutlich seltener wird im Vergleich eine Endoprotheseninfektion beobachtet. Eine solche Infektion ist aber gleichzeitig bedeutend schwieriger zu therapieren. Auch sprechen einige Untersuchungen dafür, dass die wirkliche Prävalenz der Endoprotheseninfektionen noch deutlich unterschätzt wird. So wurden in einer Studie aus dem Jahre 1996 explantierte Prothesenteile und umgebendes Weichteilgewebe bei der Verdachtsdiagnose einer aseptischen Lockerung verlängert bebrütet. Hierbei konnten Perdreau-Remington et al. [78, S. 160] in 76% der Fälle einen positiven bakteriellen Keimnachweis erbringen.

Bei einer weltweit geschätzten Primärimplantation von mehr als einer Million Hüft-Totalendoprothesen (TEP) [11, S. 166] und Infektionsraten von ca. 0,5-2% der Fälle [26, S. 1411, 42, S. 805] gewinnen optimierte Therapieschemata zunehmend an Bedeutung. Derzeit geht man von mehr als 180.000 Hüft-TEP Implantationen alleine in Deutschland aus [11, S. 166]. Die geschätzten Behandlungskosten einer infizierten Hüft-TEP betragen ca. 30.000 US $ [21, S. 1423]. Zusätzlich werden in Deutschland ca. 60.000 Knie-Gelenk-TEP pro Jahr implantiert [10, S. 96], wobei die Infektionsrate nach Knie-TEP Implantation ca. 1-4% beträgt [42, S. 805]. In den Vereinigten Staaten von Amerika werden durch infizierte Osteosynthesematerialien und Endoprothesen zusätzliche Behandlungskosten von insgesamt mehr als 1,8 Mrd. US $ pro Jahr verursacht. Die entstehenden Kosten durch Arbeitunfähigkeit und Rentenzahlungen bleiben dabei noch unberücksichtigt [21, S. 1423]. Sowohl die vorliegenden Daten aus der BRD, als auch die korrespondierenden Daten aus den USA, beschreiben somit für Implantatinfektionen eine erhebliche zusätzliche ökonomische Belastung für das jeweilige Krankenhaus, und in zweiter Konsequenz für das gesamte Gesundheitssystem. Zusätzlich verursachen die verlängerte Hospitalisationsdauer,

sowie der negative Therapieerfolg eine starke psycho-soziale Beeinträchtigung der Patienten, die nicht zu unterschätzen ist.

Ursächlich für die relativ häufige Infektionsrate bei der Implantation von Biomaterialien in der Orthopädie und Traumatologie ist unter anderem die fremdmaterialinduzierte pathophysiologische Konstellation, welche durch eine charakteristische Trias (niedriges bakterielles Inokolum, charakteristisches atypisches Erregerspektrum, meist keine Heilung ohne Entfernung des Implantats) gekennzeichnet ist. Zunächst ist ein relativ niedriges bakterielles Inokolum ausreichend zur Verursachung einer Infektion. Dies wurde unter anderem im Jahre 1957 durch Elek und Conen demonstriert [24, S. 585]. Die notwendige Keimzahl, die zu einer Infektion führte ("minimum pustule forming dose"), wurde im Versuch durch einen einzigen im Gewebe verbliebenen Seidenfaden um den Faktor 10.000 reduziert [24, S. 582]. Eines der Hauptprobleme einer Implantat-assoziierten Infektion liegt an der Grenzfläche zwischen Implantat und Biomaterial [33, S. 1589, 97, S. 370], dem so genannten Interface, welches die Wechselbeziehungen zwischen Implantat, lebendem Gewebe und Fremdmaterial widerspiegelt. Ein ähnlicher Effekt, wie ihn Biomaterialien zeigen, also die Verringerung der "minimum pustule forming dose", wurde auch für die Präsenz von beispielsweise totem Knochen oder geschädigtem Weichteilgewebe beobachtet [32, S. 264].

Nach der Implantation eines Biomaterials beginnt ein sog. "Race for the surface". Dieser Begriff bzw. diese Hypothese wurde 1991 von Gristina et al. [35, S. 368] vorgeschlagen und von eben derselben Arbeitsgruppe durch weitere Versuche bestätigt [36, S. 107]. Dieser "Wettlauf um die Besiedlung der Oberfläche des Biomaterials" ist für „das künftige Schicksal des Implantats“ entscheidend [36, S. 107]. Der fundamentale erste Schritt einer Infektion nach Implantation des Biomaterials besteht in der Adhäsion von Bakterien, welche durch eine pathogenetische Sequenz getriggert wird (Abb.3.1).

Die adhäsive Kolonisierung des Substrats und das Einbringen des Implantats (bzw. das Vorhandensein von geschädigtem bzw. relativ azellulärem Gewebe) bedingen eine bakterielle Resistenz gegen die körpereigenen Abwehrmechanismen sowie die systemische antibiotische Therapie [35, S. 364]. Dies führt zu einer Transformation von normalerweise apathogenen in pathogene Keime, so dass in vielen Fällen die Infektion ohne vollständige Entfernung des Fremdmaterials nicht mehr geheilt werden kann [26, S. 1412]. Die Adhäsion von Bakterien an Oberflächen hängt zu einem gewissen Teil auch von den physikalischen Charakteristiken der Materialoberfläche ab [40, S. 891, 111, S. 844, 112, S. 183]. Die Bakterien treten hierbei entweder über direkte Kolonisation, per continuitatum oder über hämatogene bzw. lymphogene Aussaat mit dem Biomaterial in Kontakt.

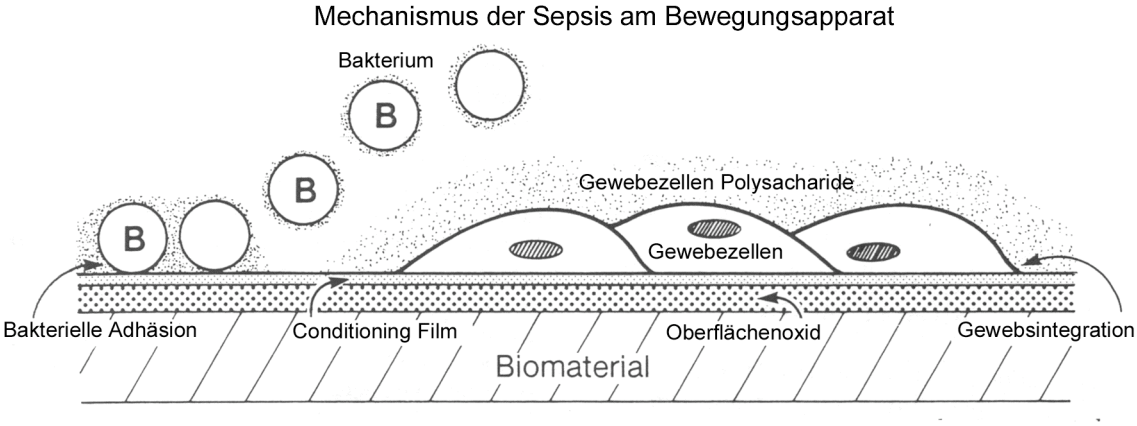

Abbildung 3.1: **Bereits zum Zeitpunkt der Primärimplantation stellt ein Biomaterial eine für Bakterien besiedelungsbereite Oberfläche dar. Die äußeren atomaren Schichten der Implantatoberfläche treten sofort mit dem angrenzenden biologischen Gewebe in Wechselwirkungen. Makromoleküle, Bakterien und Gewebezellen konkurrieren um Oberflächenbereiche am reaktiven Interface (nach Gristina et al. [33]).**

Jede Oberfläche, die einer biologischen Umgebung exponiert wird, wird mit einer Schicht aus Proteinen und Glykoproteinen, einer so genannten "Konditionierenden Schicht" ("conditioning film") überzogen [35, S. 365, 40, S. 887]. Anfänglich stößt die Oberfläche oder das Substrat, aufgrund ihrer negativen, anionischen Ladung die Bakterien ab, da diese ebenfalls anionisch geladen sind [35, S. 365]. In diesem Stadium der bakteriellen Besiedelung sorgen dann physikalische Kräfte wie London-van der Waal's Kräfte und hydrophobe Moleküle des Substrates und der Bakterien für eine ausreichende Kontaktdauer, so dass Substrat und Bakterien ihre irreversible Vernetzung über komplexe Glykoproteinstrukturen ausbilden können [35, S. 365] (Abb. 2.2).

Hat dieser erste Kontakt stattgefunden, indem sich das Bakterium an das Substrat gebunden hat, beginnt die Proliferation innerhalb eines aus Polysacchariden bestehenden Schleims, in dem Nährstoffe zur Verfügung stehen. Hierbei erfolgt die Formation einer Bakterienkolonie, wobei ein so genannter Biofilm aus Bakterien, Ionen, Metallen und Exopolysacchariden entsteht [20, S. 11, S. 16]. Bereits im Jahre 1943 beschrieb ZoBell [122, S. 39], daß bestimmte Bakterien ausschließlich oder zumindest bevorzugt an festen Oberflächen wachsen [122, S. 54]. Besonders bei oberflächenadhärenten, sessilen Bakterien wird hierbei ein mucinartiges Exsudat beobachtet, welches daran beteiligt ist Nährstoffe im Biofilm zu konzentrieren [122, S. 54]. Die klinische Relevanz dieser Entdeckung blieb jedoch lange Zeit unerkannt.

Die Ausbildung von Biofilm als solches wird nun auch als der letzte Schritt der bakteriellen Besiedlung bezeichnet [40, S. 892]. In einer Vielzahl von Fällen kann eine Infektion ohne die vollständige Entfernung des Fremdmaterials dann nicht mehr geheilt werden [26, S. 1412]. Zum Zeitpunkt der Biofilmbildung haben die Bakterien ein Umfeld für sich geschaffen, welches sie vor vielen antibiotischen Substanzen sowie den Abwehrmechanismen des Körpers schützt [40, S. 894]. Der Biofilm wirkt hier als Puffer gegenüber den sich ändernden Einflüssen der direkten Umgebung, vereinfacht den Austausch von Nährstoffen und die Beseitigung von Abfallprodukten [40, S. 892].

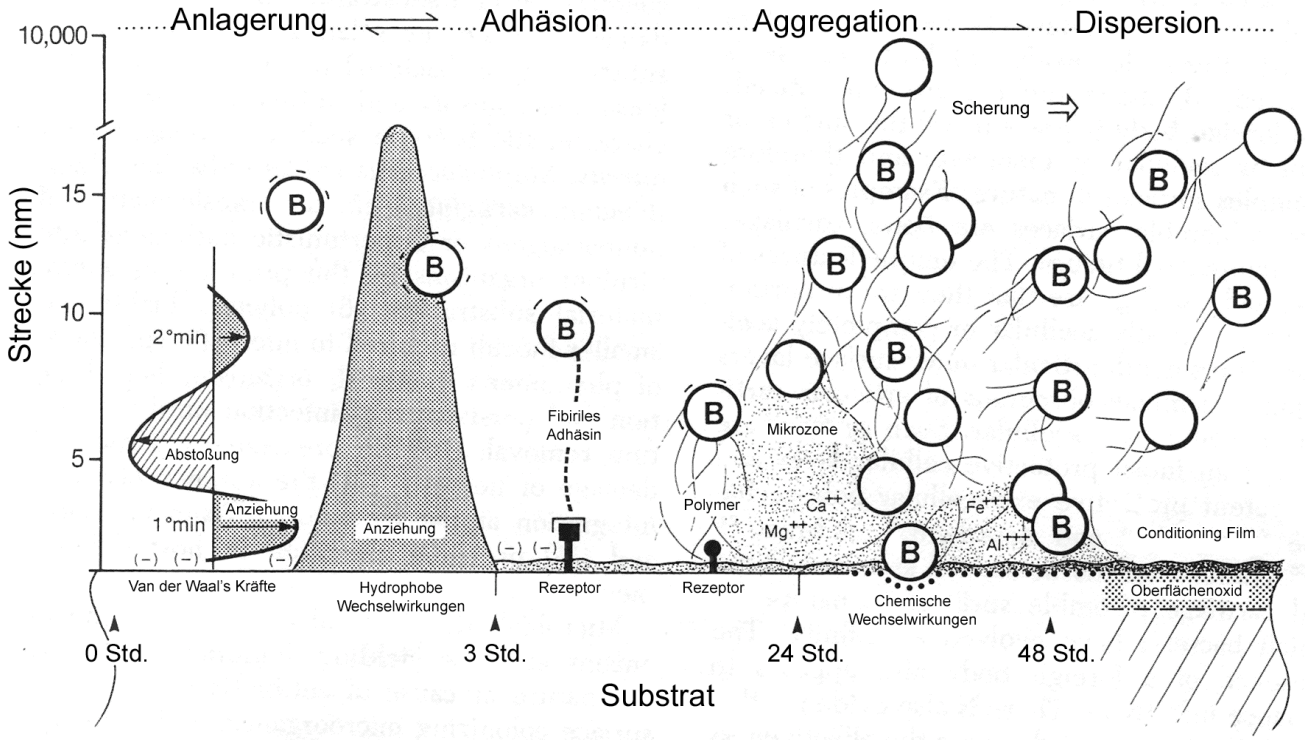

Abbildung 3.2: **Molekulare Sequenz der Anlagerung, Adhäsion, Aggregation und Dispersion von Bakterien (B) an Substratoberflächen. In Abhängigkeit der Bakterien- und Substrat-Spezifikationen können verschiedene Interaktionen stattfinden (Nährstoffe, Fremdstoffe, Makromoleküle, Spezies und Materialien) (nach Gristina et al. [33]).**

Die Fähigkeit, an Materialien anzuhaften und einen Biofilm auszubilden, wird als ein wichtiger Faktor für die Pathogenität der Mikroorganismen beschrieben. Dies trifft insbesondere auf Staphylokokken zu [112, S. 182], wobei *Staphylococcus aureus* und koagulase-negative Staphylokokken, hier im Besonderen *S. epidermidis*, wiederum die häufigsten Erreger von Implantat-assoziierten Infektionen darstellen [6, S. 1249] (Tab 3.1). *S. epidermidis* siedelt bevorzugt auf Polymeren, während *S. aureus* vorwiegend mit Metall- und Weichteilinfektionen in Verbindung gebracht werden kann [36, S. 108].

Verschiedene Studien haben außerdem die Resistenzsteigerung von Bakterien gegenüber antibiotischer Therapie nach Besiedelung von Implantaten gezeigt [34, S. 813, 74, S. 126]. Eine mögliche Erklärung hierfür mag der reduzierte Metabolismus der Bakterien in einem Biofilm darstellen [40, S. 894]. Ferner können sich durch Adaptationsvorgänge so genannte „small colony variants“ (SCV) ausbilden. Hierbei handelt es sich um Subpopulationen von *S. aureus* und *S. epidermidis*, die durch eine reduzierte Teilungsrate, atypische Zellmorphologie, reduzierte Pigmentbildung und Stoffwechselleistungen gekennzeichnet sind und dadurch wiederum mit der Ausbildung persistierender Infektionen, erhöhter Antibiotikaresistenz, sowie chronischer Infektionen von Fremdmaterial assoziiert sind [26, S. 1416, 83, S. 422, 84, S. 68, 110, S. 4710].

Anteil verschiedener Infektionserreger bei Gelenkprotheseninfektionen [26]	
Pathogen	**Häufigkeit [%]**
Staphylokokken, davon - Koagulasenegative Staphylokokken - Staphyolococcus aureus	**50-60** 25-30 25
Gramnegative, aerobe Stäbchenbakterien (u.a. Enterobacteriaceae, wie Escherichia coli, Proteus spp., Morganella morganii, Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Salmonella enterica sowie nicht fermentierende Erreger wie Pseudomanas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Alcaligenes spp.)	**20**
Streptokokken (S. agalacticae, sog. „Viridans-Streptokokken“, seltener andere)	**10-15**
Polymikrobiell	**10-15**
Anaerobier (u.a. Probionibacterium spp., Peptostreptokokken, Bacteroides spp., Prevotella spp., Veilonella parvula)	**7-10**
Andere Erreger[a]	**2**
Ohne Erregernachweis	**10**
[a] Periprothetische Infektionen können neben o.g. Erregern durch eine Vielzahl von weiteren Mikroorganismen verursacht werden. Bereichtet wurde u.a. über Implantatinfektionen durch Haemophilus spp., Pasteurella multocida, Yersinia enterocolitica, Acinetobacter spp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium avium-intracellulare, Mycobacterium chelonae, Corynebacterium spp., Campylobacter spp., Listeria monocytogenes, Clostridium difficile, Tropheryma whippelei, Actinomyces spp., Mycoplasma hominis, Aspergillus spp., Candida spp.	

Tabelle 3.1: Anteil verschiedener Infektionserreger bei Gelenkprothesen-Infektionen (nach Geipel et al. [26]).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch nicht Biofilm bildende Bakterien deutlich höhere Antibiotikakonzentrationen tolerieren können, sofern sie an einem Biomaterial siedeln [35, S. 368]. Ein weiteres Problem stellen die verminderten Abwehrreaktionen des Körpers dar. Da Implantate nicht durchblutet werden, können sie lediglich durch Diffusion von Antibiotika, immunkompetenten Zellen und anderen antiinfektiösen Substanzen erreicht werden [19, S. 139]. Dies führt dann dazu, dass trotz adäquater Chemotherapie und

ausreichenden systemischen Antibiotikakonzentrationen insuffiziente lokale Antibiotikakonzentrationen vorliegen [19, S. 139]. Der extrazelluläre Schleim von *S. epidermidis* vermindert des Weiteren die Bildung von T- und B-Zellen, die Chemotaxis sowie die Opsonierung von Bakterien und scheint die Virulenz von *S. epidermidis* im Tierversuch zu steigern [59, S. 13]. Da aber auch die Virulenz von nicht schleimbildenden Bakterien durch Implantate gesteigert wird, kann die Präsenz von Biofilm nicht allein die verminderte Immunkompetenz des Körpers bei Implantat-assozierten Infektionen erklären.

Wenn der Verdacht auf eine Implantat- bzw. Endoprotheseninfektion besteht, beginnt ein komplexer diagnostischer Prozess, der sowohl von Seiten des Klinikers, als auch des Mikrobiologen einer besonderen Abstimmung bedarf. Das Funktionieren dieses Ablaufs ist von erheblicher Konsequenz für die Therapie und somit in direkter Linie für die Prognose des Patienten ausschlaggebend [26, S. 1416]. Zunächst wird der klinische Verdacht einer Infektion bzw. einer Frühinfektion gestellt. Hierbei gelten als charakteristische Zeichen anhaltende oder neu aufgetretene Schmerzen, eine lokale Rötung oder Überwärmung, anhaltende Sekretion, gespannte lokale Weichteile, anhaltende oder neu auftretende CRP-Erhöhung und Leukozytose sowie eine Temperaturerhöhung [90, S. 309]. Zur Diagnosestellung kann des Weiteren der Infektions-Score nach Zimmerli et al. [121, S. 102] herangezogen werden. Ein Patient mit einem konstanten Score von maximal fünf kann als infektionsfrei oder geheilt betrachtet werden.

Die häufigsten Erreger bzw. Erregergruppen von Implantatinfektionen, eingeteilt nach Infektionsbeginn [26]	
Zeitliche Unterteilung	**Erreger bzw. Erregergruppen**
Frühinfektion (bis 2 Monate nach Implantation)	- *Staphylococcus aureus* - Aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien - Koagulasenegative Staphylokokken
Verzögerte Infektion (2 bis 12 Monate nach Implantation)	- Koagulasenegative Staphylokokken - *Staphylococcus aureus* - Mikroorganismen der kommensalen Hautflora - Aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien
Spätinfektion (>12 Monate nach Implantation)	- Koagulasenegative Staphylokokken - Mikroorganismen der kommensalen Hautflora - *Staphylococcus aureus* - Aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien - Anaerobier (v.a. *Peptococcus, Peptostreptococcus)*

Tabelle 3.2: Die häufigsten Erreger bzw. Erregergrupen von Implantatinfektionen, eingeteilt nach Infektionsbeginn (nach Geipel et al. [26]).

Rupp et al. [91, S. 239] postulierten, dass bei Auftreten einer Implantat-assoziierten Infektion in den ersten beiden postoperativen Jahren die Bakterien während der Operation in den Körper gelangt sind (Gruppe II). Erst nach Ablauf dieses Zeitraums kann von einer hämatogenen Streuung der Bakterien über einen anderen Herd ausgegangen werden (Gruppe III) [91, S. 293]. Andere Autoren definieren eine Frühinfektion bis zu zwei Monate nach Implantation, eine verzögerte Infektion 2 bis 12 Monate nach Implantation sowie eine Spätinfektion, die nach mehr als 12 Monaten nach Implantation auftritt [26, S. 1419]. Jeder dieser Phasen der Infektion sind charakteristische Erreger zuzuordnen [26, S. 1419, 55, S. 47] (Tab. 3.2).

Zur Sicherung der Verdachtsdiagnose muss der direkte Erregernachweis erfolgen. Aufgrund der Bedeutung der mikrobiologischen Diagnostik sollten falsch negative Befunde vermieden werden und so wird eine 10-14 tägige Pause der Antibiotikagabe vor dem Eingriff als sinnvoll erachtet [26, S. 1417]. Bei intraoperativer Gewebe-Entnahme ist es gleichzeitig anzuraten Proben zur histopathologischen Begutachtung einzusenden. Bei klinischem Verdacht auf eine Endoprothesen- bzw. Implantatinfektion und negativem Keimnachweis kann es sich in seltenen Fällen auch um atypische Erreger handeln. Kulturelle Nachweise können neben dem Erregernachweis auch quantitative Aussagen zur Erregerkonzentration geben, wobei eine sichere Aussage zur Spezifität und Sensivität von intraoperativ bzw. durch Punktion gewonnenen Abstrichen nach wie vor schwierig ist [78, S. 160]. Dennoch gibt es Studien, in denen nach kultureller Diagnostik, ohne vorherigen Antibiotikaeinsatz, eine Sensivität bis 85% und eine Spezifität von über 90% aus Gelenkpunktaten bei periprothetischen Infektionen angeben wird [26, S. 1417]. Interessanterweise ist die Entnahme von Material mittels Abstrichtupfer obsolet, da die gewonnene Materialzahl und Erregermenge zu gering sein kann und, bei entsprechender Sensibilität, die Erreger bereits während des Transports absterben können [26, S. 1416]. Nach Erregernachweis sollte eine stadiengerechte Therapie erfolgen. Dies kann eine Implantatbelassung mit systemischer Antibiotikatherapie, eine endgültige Implantatentfernung, oder einen ein- oder zweizeitigen Wechsel zur Folge haben. In schwierigen Fällen können auch eine Arthrodese oder eine Amputation notwendig werden. Bei Infektionen, die länger als 4 Wochen bestehen, sollte keine implantaterhaltende Therapie angestrebt werden.

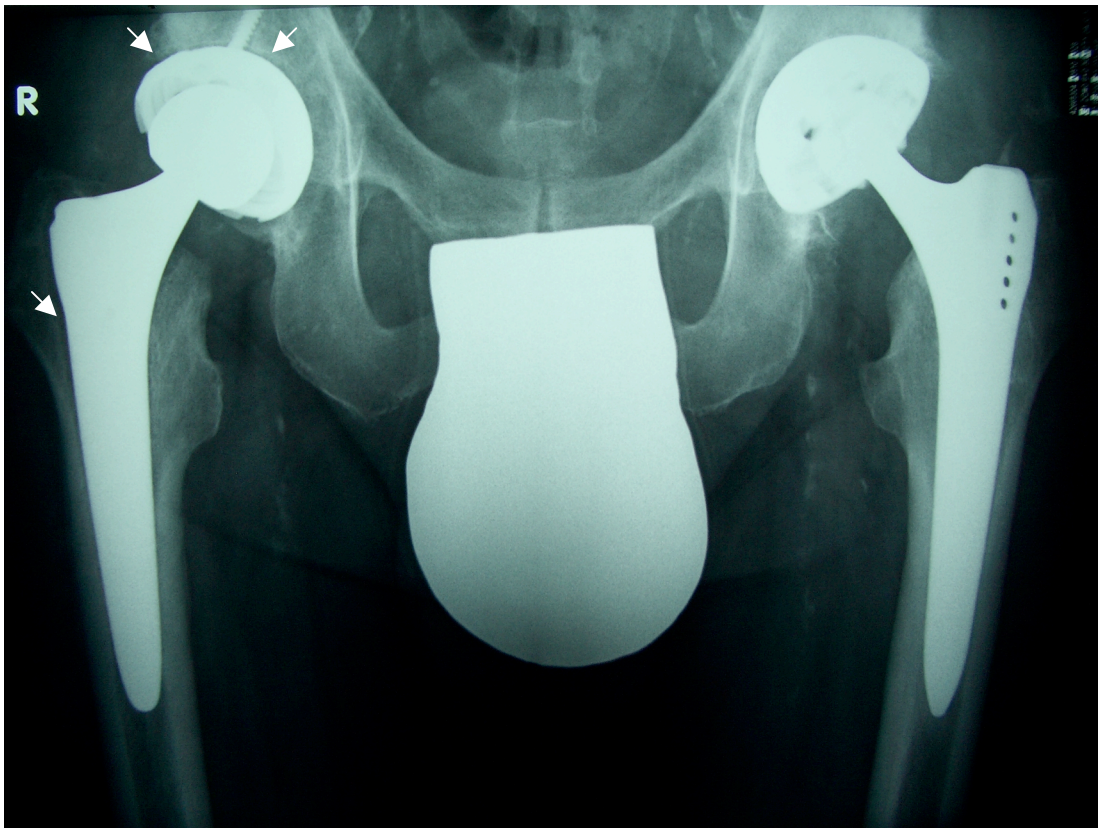

Abbildung 3.3: **Röntgenkontrolle 6 Monate postoperativ nach primärer zementfreier Hüft-TEP-Implantation rechts. In der Beckenübersicht zeigen sich rechtsseitig deutliche Lysesäume im Bereich der Pfanne sowie des Stiels. Bei Explantation konnte aus der intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Kultur *Staphylococcus epidermidis* als Keim isoliert werden.**

Je nach Erreger sollte eine individuell angepasste antibiotische Therapie erfolgen, wobei verschiedene Ansätze zur antimikrobiellen Langzeittherapie bzw. Suppressionstherapie mit kurativem Ansatz vorgestellt wurden. In diesen Ansätzen spielt Rifampicin eine große Rolle. Dies liegt aller Wahrscheinlichkeit an seiner besonderen Aktivität gegen sessile, langsam wachsende oder nicht proliferierenden Erregern. Hierbei muss Rifampicin mit einem Chinolon über eine gesamte Therapiedauer von ca. 3-6 Monaten kombiniert werden [26, S. 1420, 121, S. 105].

Häufig werden mittlerweile auch lokale antibiotikahaltige Träger wie beispielsweise Kollagenschwämme oder Knochenzement eingesetzt. Gerade in der Orthopädie und Traumatologie werden dafür bevorzugt Aminoglykoside und Glykopeptide verwendet [76, S. 53], da sie ein breites Wirkspektrum gegenüber den typischen Erregern von Implantat-assoziierten Infektionen zeigen.

Trotz hoch dosierter antibiotischer Therapie ist es in einer Vielzahl der Fälle nicht möglich das ursprüngliche Implantat in situ zu belassen und man ist so zur Durchführung einer ein-

oder zweizeitigen Wechseloperation gezwungen. Diese verschlechtert das zu erwartende postoperative Outcome des Patienten deutlich hinsichtlich der Standzeit der Endoprothese und allgemeiner Lebensqualität. Die hier aufgeführten Probleme bei Implantat-assoziierten Infektionen sowie das ständig steigende Auftreten Methicilin-resistenter Stämme von *S. aureus* und *S. epidermidis* (MRSA und MRSE), die zunehmend zu Problemen im klinischen Alltag führen, zeigen die Notwendigkeit zur Entwicklung von alternativen Behandlungsstrategien. Prävention und Therapie sollten also dort wirken wo die Erreger angreifen - nämlich direkt am Implantat (Abb. 3.4).

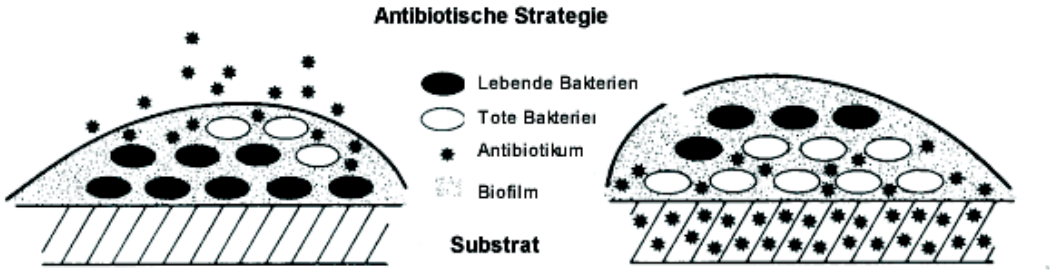

Abbildung 3.4: ***links:*** **Der aus Polysacchariden bestehende Biofilm wirkt als Barriere für Antibiotika.** ***Rechts:*** **Die Impregnation von Biomaterialien mit Antibiotika kann das Auftreten und die Behandlung von Implantat-assoziierten Infektionen vermeiden, da eine hohe lokale Antibiotikakonzentration am Ort der bakteriellen Besiedelung erreicht wird.**
(nach: Gustilo et al. [39])

3.2 Antibakterielle Eigenschaften von Metallionen

Bereits vor mehr als 2000 Jahren haben viele Völker die antibakterielle Wirkung von Metallionen, insbesondere Silber- und Kupferionen, erkannt. Die Römer beispielsweise benutzten Silbernitrate als Therapeutikum, Paracelsus schrieb von den Vorteilen von Silber als heilende Substanz und laut Herodot führte der persische König Cyrus das Wasser für seine Kämpfer in Silberkrügen mit sich und auch das Sanskrit weiß von der Fähigkeit des Silbers, die Qualität des Wassers zu verbessern [2, S. 146].

Kupfer wiederum wurde bereits von den alten Ägyptern (zwischen 2600 und 2200 vor Christus) zur Behandlung von infizierten Wunden und zur Sterilisation von Wasser verwendet [22, S. 81]. Außerdem wurde im alten Indien und Persien Kupfer verwendet, um Wunden und Hautkrankheiten zu behandeln [22, S. 82]. Kupfer wurde auch als Therapeutikum in der Antike von den Griechen verwendet. Es fand hierbei als Antiseptikum Anwendung, und Hippokrates empfahl Kupfer zur Behandlung eines Ulcus cruris bei Varikosis [22, S.80]. Auf der Insel Kypros (Zypern) gab es so große Kupfervorkommen, dass das lateinische Wort für Kupfer (*cuprum)* davon abgeleitet wurde [22, S. 81]. Dollwet und Sorenson geben in Ihrer Arbeit „Historic uses of copper compounds in medicine“ eine hervorragende Übersicht über die historischen medizinischen Anwendungen von Kupfer [22, S. 80]. Auch andere Metalle fanden bereits medizinische Anwendung. Im 18. Jahrhundert sollen knapp 5000 an Lues erkrankte Patienten überlebt haben, die mit einer Quecksilberarznei "liquor mercurialis Swietenii" behandelt wurden. Gerade diese Arznei wird nun in einer Hypothese für den Tod Mozarts verantwortlich gemacht, da Mozart, davon geht der Autor aus, an Syphilis erkrankte und sich seine Lues selbst therapierte. Dabei habe er sich dann durch die Anwendung von Quecksilber vergiftet [108, S. 128].

1881 verwendete Carl Credé erstmals eine einprozentige $AgNO_3$ Lösung [51, S. 307]. Diese wurde unmittelbar nach der Geburt in das Auge des Neugeborenen einer mit Gonorrhöe infizierten Mutter eingeträufelt, um eine peripartale „ophtalmia neonatorum“ oder Gonoblenorrhöe zu vermeiden. Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts erkannten aber auch andere Vorväter der modernen Medizin die antibakterielle Wirksamkeit von Ionen wieder. Beispielsweise Wiliam Halstead (1852-1922), einer der Begründer der modernen Chirurgie, der die Anwendung von Handschuhen des Chirurgen im Operationssaal einführte [93, S. 1478], propagierte auch die Verwendung von Silberfolien als Wundverband [41, S. 1119]. Solche Folien werden bis in die heutige Zeit vorwiegend auf Verbrennungsstationen eingesetzt.

Durch die Entdeckung und klinische Einführung von Antibiotika geriet die Anwendung von Ionen zur Prophylaxe und Bekämpfung von Infektionen aber zunehmend in den Hintergrund.

Heutzutage finden Ionen, aufgrund der bekannten antibakteriellen Potenz, hauptsächlich Applikation in industriellen Anwendungen. Beispielsweise wird Kupfer als bakterizider Zusatz für Farben verwendet [17, S. 444]. Auch auf Schiffsrümpfen wird Kupfer eingesetzt, um dort

den Wasserwiderstand zu reduzieren, indem die Biofilmbildung von Mikroorganismen verhindert wird [18, S. 637]. In der Landwirtschaft wiederum wird Kupfer als Algaecid [115, S. 424], Bakterizid [25, S. 1844], Fungizid [25, S. 1844] sowie Insektizid [115, S. 424] verwendet. Auch in einigen klinischen Anwendungen und Gebrauchsgegenständen finden sich derzeit Ionen. In Krankenhäusern werden beispielsweise Kupfer- und Silberionen in Wasserpumpen verwendet, um dort eine Legionellenbesiedelung zu vermeiden [88, S. 1507, 103, S. 911].

Ursächlich für die antimikrobielle Potenz der verschiedenen Ionen scheint der Oligodynamische Effekt (Olig- wenig, klein; gr. ολιγος, Dynamie- Kraft; gr. δυναμις) zu sein. Dieser wurde postum durch von Nägeli [113, S. 1] im Jahre 1893 in die Literatur eingeführt. Er beschrieb wie Wasser, das lediglich mit Metallen in Berührung gekommen war, eine antimikrobielle Wirkung entfaltet und Mikroorganismen abtötet. Es konnte ein „gewöhnliches Absterben“ der Zellen aufgrund der „spezifischen Wirkung des Giftes“ in hohen Konzentrationen und ein „ungewöhnliches Absterben“ der Zellen, wobei diese zunächst noch ihren Tugor behielten, beobachtet werden. Je mehr die „giftigen Lösungen“ verdünnt wurden trat diese „ungewohnte Erscheinung in voller Reinheit auf“ [113, S. 7]. Unter dem Oligodynamischen Effekt oder der Oligodynamie als solches versteht man letztendlich die schädigende Wirkung kleinster Mengen von Metallkationen auf die lebende Zelle [51, S. 1152]. In Siebenreichers „Oligodynamische Wirkung der Metalle und Metallsalze“ (1939) sind nochmals eine Reihe an Patentschriften bezüglich des oligodynamischen Effekts zusammengefasst [101, S.243]. Auch dies zeigt nochmals die antibakterielle Bedeutung von Metallionen vor bzw. in der Frühphase der Entdeckung (1928) von Antibiotika auf.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass Metallionen die Fähigkeit besitzen, einige Viren wie beispielsweise Bakteriophagen [23, S. 567, 89, S. 766], Hepatitisviren [1, S. 2377], Rotaviren [1, S. 2377], Adenoviren [1, S. 2377], Polio-Viren [1, S. 2377, 95, S. 812], Junin-Viren [94, S. 4374], Herpes simplex Viren [94, S. 4374, 95, S. 812] und auch HIV-1 [7, S. 1728, 60, S. 5552, 96, S. 333] zu inaktivieren.

Trotz der schon seit langem bekannten antimikrobiellen Potenz verschiedener Metallionen ist die Ursache für die antibakterielle Wirkung dieser im letzen Detail noch nicht beschrieben. Im Gegensatz hierzu ist der Wirkmechanismus von Antibiotika (Abb. 3.5) weitgehend bekannt.

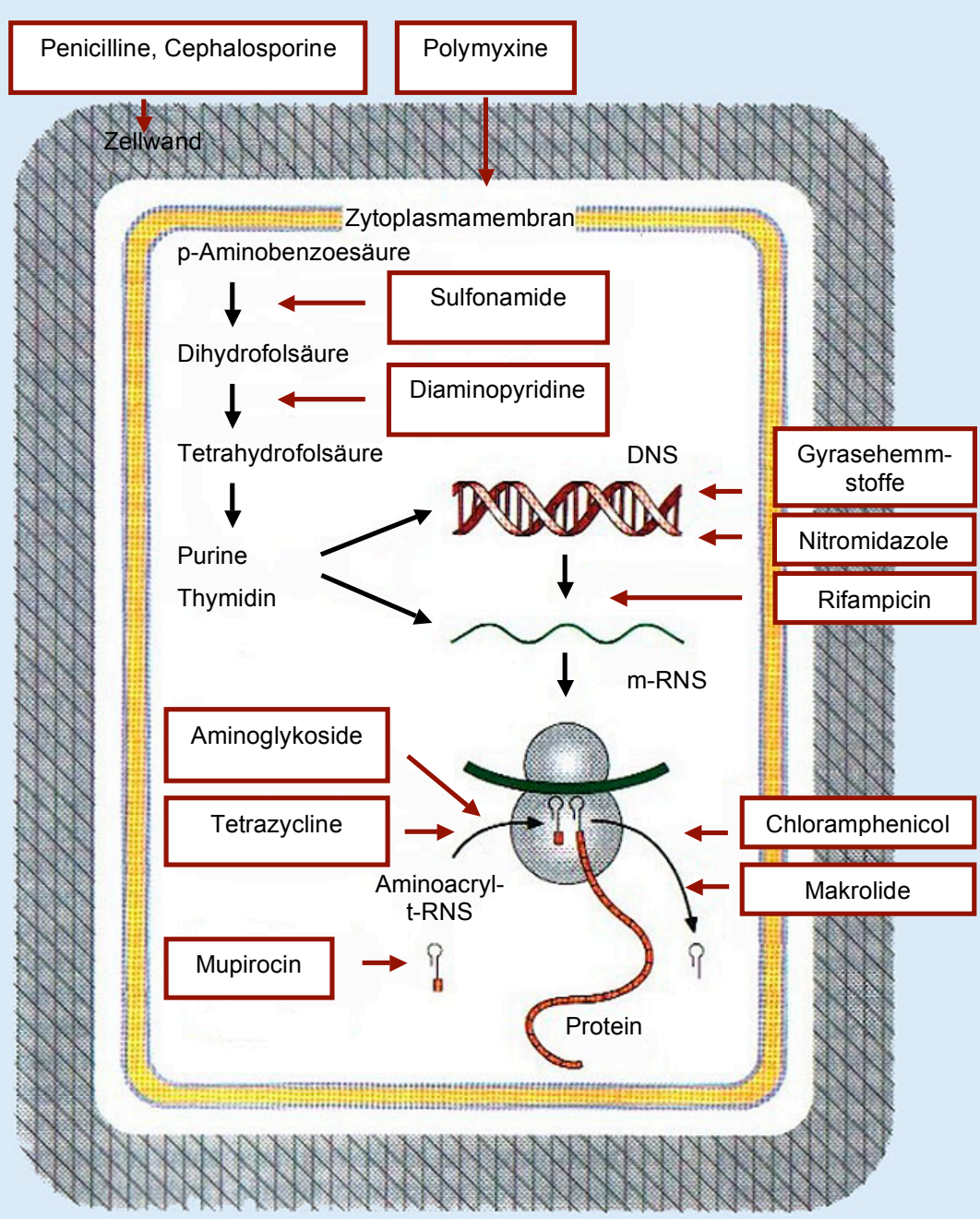

Abbildung 3.5: **Zelluläre Wirkorte antibakterieller Pharmaka (aus Lüllmann et al. [67])**

Für die Pharmakotherapie einer bakteriellen Infektion ist die Berücksichtigung des erregerspezifischen Stoffwechsels von entscheidender Bedeutung, da im Idealfall zwar der Erreger abgetötet bzw. in seiner Proliferation gehemmt, aber die Wirtszelle nicht geschädigt wird. Ein Pharmakon kann hierbei bakteriostatisch, also die weitere Vermehrung des Erregers hemmend, oder bakterizid, also die Bakterien abtötend, wirken. Bakteriostatische Substanzen stören beispielsweise die Proteinsynthese und veranlassen die Bildung defekter Membranproteine oder beinträchtigen den Erhaltungsstoffwechsel, während bakterizide Pharmaka häufig die Zellwand oder Zellmembran beeinflussen. Eine antibakterielle Wirkung kann im allgemeinen über eine Hemmung der Zellwandsynthese, Schädigung der

Zellmembran, Interferenz mit dem Tetrahydrofolsäure-Syntheseweg, Interferenz mit der bakteriellen DNS, Hemmung der RNS-Synthese oder Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese erfolgen [67, S. 392].

Hinsichtlich der Ionen und deren antimikrobieller Potenz unterscheidet man generell essentielle von nicht-essentiellen Ionen. Metalle werden gemäß ihren charakteristischen Eigenschaften verwendet und in Alkalimetalle, Erdalkalimetalle und Übergangsmetalle unterteilt [79, S. 27]. Als Metalle gelten u.a. Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Zink, Eisen, Kupfer, Kobalt und Molybdän [79, S. 27]. Der Metallcharakter der einzelnen Elemente nimmt innerhalb des Periodensystems der Elemente von rechts nach links und von oben nach unten zu. Die Metalle (elektropositive Elemente) werden wiederum von den Nichtmetallen (elektronegative Elemente) durch die Halbmetalle getrennt [51, S. 1220]. 24 Elemente des Periodensystems stellen weiterhin lebensnotwendige Elemente dar [79, S. 24]. Die 13 Elemente die in nur sehr geringen Mengen vorkommen werden als Spurenelemente bezeichnet [79, S. 27]. Hierzu zählen u.a. die essentiellen Metalle Kupfer, Kobalt und Zink, aber auch das nicht essentielle Quecksilber [80, S. 625]. Einige Metallionen sind nicht nur für den menschlichen, sondern auch für den bakteriellen Organismus essentiell. Darunter fallen beispielsweise Kupfer, Eisen, Kalium, Magnesium, Nickel, Zink u.a. [53, S. 254, 58, S. 61, 75, S. 17]. Bei anderen Ionen wie Silber, Aluminium, Cadmium, Gold, Blei und auch Quecksilber handelt es sich um so genannte nicht-essentielle Ionen. Essentielle Ionen sind für Prozesse, die sich auf zellulärer Ebene abspielen, notwendig. Hierbei wirken sie als Katalysator für biochemische Reaktionen, tragen dazu bei, die Proteinstrukturen der Zelle zu stabilisieren oder die osmotische Balance aufrecht zu halten [53, S. 252, 58, S. 61, 75, S. 18, 79, S. 27, 80, S. 625]. Essentielle Ionen wie Kupfer und Nickel sind aber auch an Redox-Reaktionen in der Zelle beteiligt und wieder andere essentielle Ionen wie Magnesium und Zink stabilisieren verschiedene Enzyme und die DNA über elektrostatische Kräfte [75, S. 18, 80, S. 625]. Eisen, Magnesium, Nickel und Kobalt sind als gebundene Teile von Komplexen an einer Reihe von intrazellulären Funktionen beteiligt [75, S. 18, 80, S. 625]. Natrium und Kalium wiederum sind an einer Vielzahl an biochemischen Prozessen, wie beispielsweise der Erregungsleitung beteiligt. Ein wesentliches Charakteristikum aller lebenden Zellen ist deren unterschiedliche Verteilung zwischen Zellinnerem und Zelläußerem [79, S. 27].

Die Inaktivierung von Bakterien und Viren durch Metallionen kann generell entweder durch chemische Reaktionen außerhalb oder innerhalb der Zelle, durch direkte oder indirekte Reaktion erfolgen [106, S. 302]. Die intrazelluläre Akkumulation von Metallionen bedarf dann einer initial raschen, aber reversiblen Bindung der Ionen an die Zelloberfläche und in der Folge einem Transport über die Zellmembran in das Innere der Zelle [53, S. 257]. Hierbei kann ein gegenläufiger Transport (Efflux) eine wesentliche Rolle bei der Detoxifikation spielen [53, S. 257]. Die toxische Wirkung von nicht-essentiellen Ionen wird unter anderem

über die Verdrängung von essentiellen Ionen aus deren natürlichen Bindungsstellen über Ligandeninteraktionen erklärt. Hierbei binden nicht essentielle Ionen mit einer größeren Affinität an Gruppen, die Thiol- oder Sauerstoffbindungsstellen enthalten als die essentiellen Ionen [8, S. 2167, 13, S. 198, 81, S. 3]. Die Toxizität resultiert in der Alteration der Struktur von Nukleinsäuren [13, S. 198] und Proteinen [13, S. 198, 60, S. 5552, 62, S. 72] und in der Interferenz der oxidativen Phosphorylierung sowie der osmotischen Balance der Zelle [37, S. 16] (Abb. 3.6). Silberionen insbesondere binden hierbei wohl an Elektrodonatoren und gehen mit selbigen irreversible Bindungen ein. Für Silber geht man davon aus, dass es über eine Blockade von essentiellen SH- und NH_2- Gruppen seine bakterizide Wirkung entfaltet. An Elektrodonatoren stehen die im bakteriellen Organismus vorhandenen Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelverbindungen zur Verfügung, die in biogenen Aminen vorhanden sind. Diese kommen hier wiederum als Imidazol-, Amino-, Thio-, Carboxylat und Phosphatgruppen vor. Wie oben bereits erwähnt, führt dies dann in letzter Instanz zu dem Verlust der biologisch wichtigen Funktionen der ubiquitär vorkommenden Proteine und Enzyme [2, S. 146] (Abb. 3.6).

Kupfer wiederum liegt typischerweise extrazellulär als Cu (II) und intrazellulär als Cu (I) vor [106, S. 305]. Eine Fähigkeit des Kupfers ist es, als Säure oder Base, Verdrängungsreaktionen zu beschleunigen [106, S. 305]. Das Proton bereitet hierbei einen Reaktionsweg geringen Energieaufwandes um Elektronen zu entziehen und Bindungen zu brechen [106, S. 305]. Weiterhin führt eine hohe Kupferkonzentration zu einem Verlust der Permeabilitätsbarriere der Plasmamembran und dadurch zu einer Leckage von zellulären Bestandteilen, wie beispielsweise Kaliumionen oder Aminosäuren [8, S. 2167] (Abb. 3.7). Metallionen (Kupferionen) können auch eine Hydrolyse oder nukleophile Verdrängung entweder direkt durch Polarisation des Substrates oder indirekt durch die Generierung eines koordinierten reaktiven Nukleophils vereinfachen [106, S. 305]. Wenn hierdurch die Proteinstrukturen der Zelle verändert werden, können normale Funktionen nicht mehr ausgeführt werden. Dies führt wiederum zum Zelltod oder der Inaktivierung des Virus [106, S. 305]. Kupfer kann so beispielsweise die Atmungsenzyme in der Zellwand von *E. coli* angreifen [106, S. 305]. Weiterhin kann Kupfer seine antiinfektiöse Wirkung über die Bildung von Chelat-Komplexen entfalten. Divalente Kationen, wie Cu^{2+}, können einen Chelat-Komplex mit Phosphatgruppen bilden. Diese brechen wiederum Wasserstoffbindungen in geflochtenen Strukturen, was zur Öffnung der Doppelhelix (DNS) führt [106, S. 305]. Auch besitzt Kupfer eine spezifische Affinität für DNS und kann somit direkt an die Doppelhelix gebunden werden was ebenfalls zu einer Zerstörung der Tertiärstruktur und einer Quervernetzung führt [8, S. 2168] (Abb. 3.7). Auch Platin kann eine antimikrobielle Wirkung entfalten. Die effektivste und am besten untersuchte Platinverbindung ist hierbei Cis-Dichloro-Diamin-Platin (Cisplatin) [53, S. 293]. Cisplatin entfaltet sowohl seine

antineoplastische Wirkung [67, S. 455] als auch seine antimikrobielle Wirkung [53, S. 293] über die Interferenz mit dem DNS-Stoffwechsel.

Für Metallionen und Chelate gilt jedoch weiterhin, dass „*alle Dinge Gift sind und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist*“ (Paracelsus). Die meisten Metallionen können also in ausreichender Konzentration toxisch auf Mikroorganismen wirken. Es kann sich hierbei um nicht-essentielle, aber auch in entsprechend höheren Dosierungen um essentielle Ionen handeln [53, S. 301].

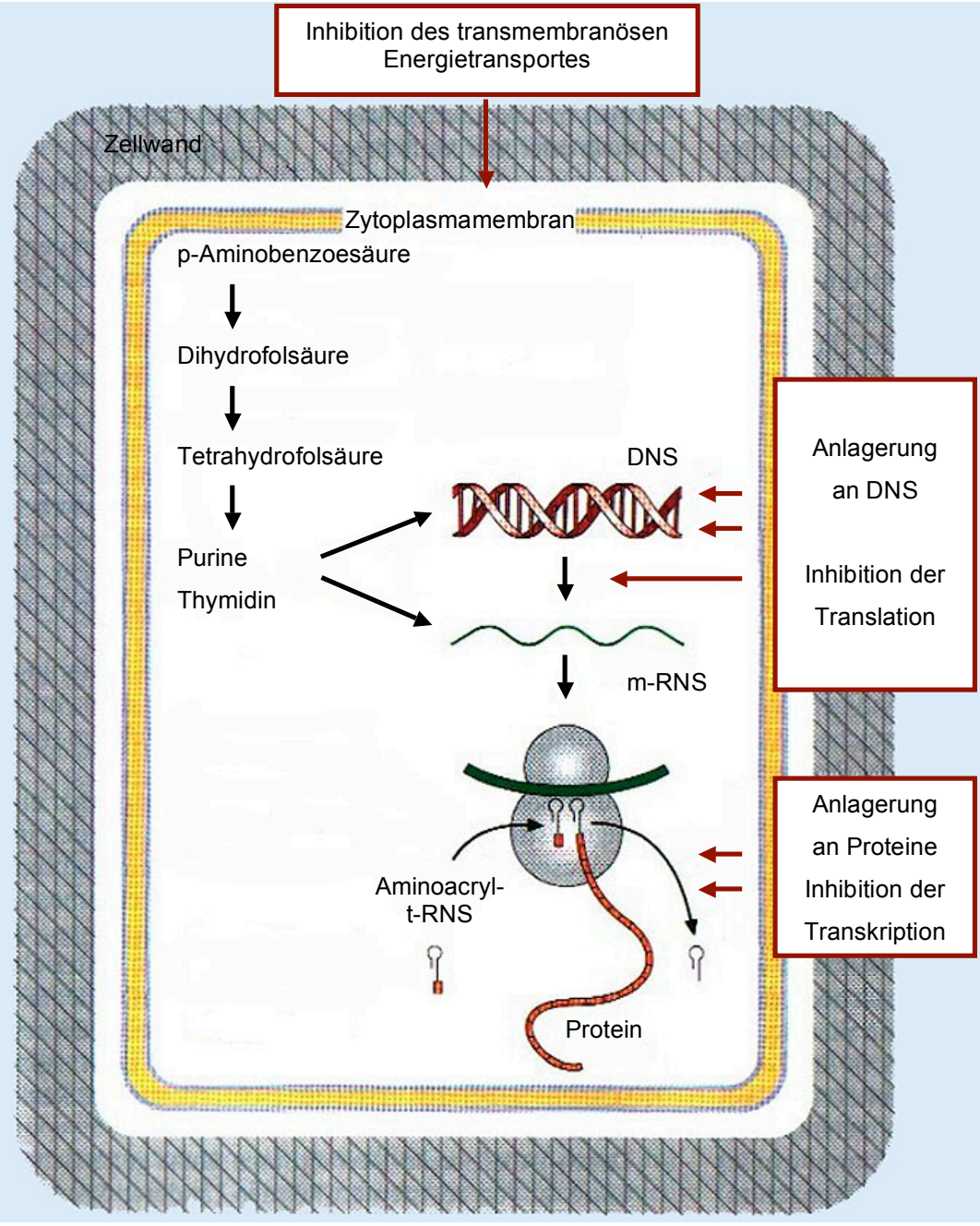

Abbildung 3.6: **Verschiedene Angriffspunkte von Ionen auf die prokaryotische Zelle (Bakterium) (Nach Ahrens et al. [2]).**

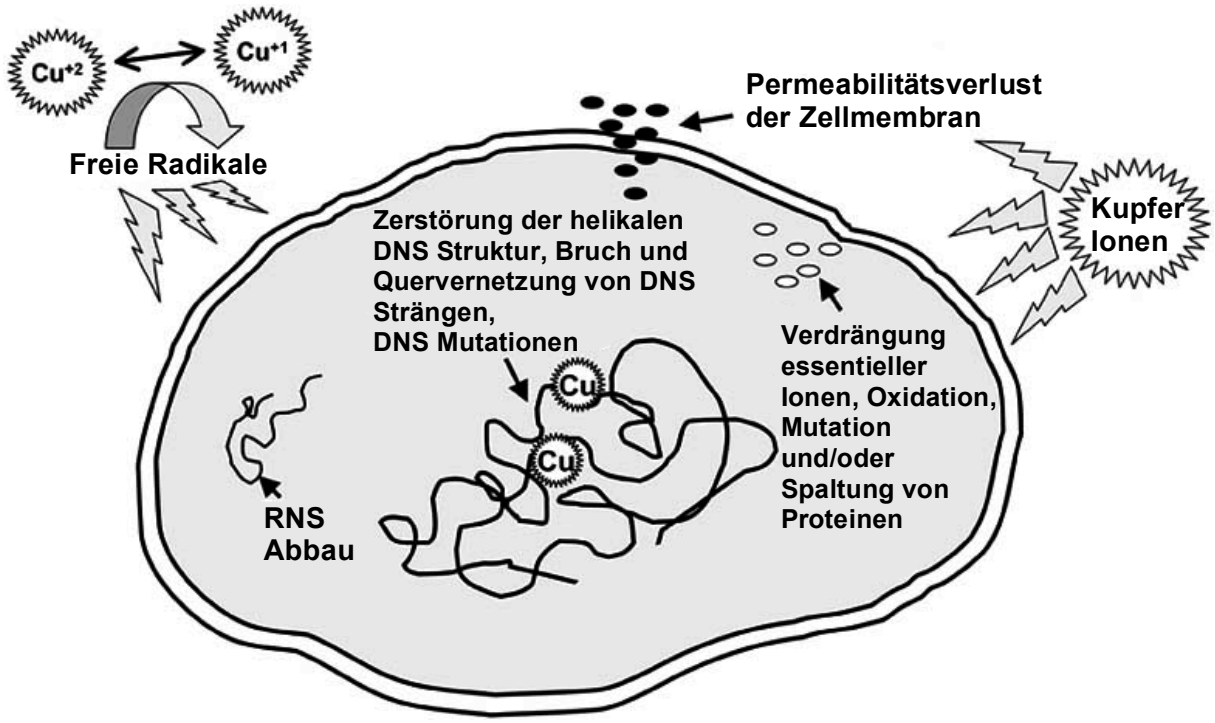

Abbildung 3.7: **Wirkmechanismus der toxischen Eigenschaften von Kupfer gegenüber Mikroorganismen (Nach Borkow et al. [8]).**

3.3 Antiinfektiöse Oberflächen

Aufgrund der unter 3.1 beschriebenen Problematik der Implantatinfektion ist die Modifizierung und Optimierung von Oberflächenbeschichtungen hinsichtlich der Biokompatibilität und begleitender Antiinfektiösität Gegenstand der medizinischen Forschung. Diese Anstrengungen waren und sind jedoch nicht nur auf die Orthopädie und Traumatologie beschränkt, sondern beschäftigen alle medizinischen Fachrichtungen in denen Biomaterialien Verwendung finden.

1989 beschrieben beispielsweise Rushton et al. [92, S. 223] die Beschichtung der äußeren Silikonschicht von neurochirurgischen Implantaten mittels Gentamicin-Sulfat und Di-Ethanolamin-Fusidat. Diese Schicht konnte eine antibakterielle Aktivität über mehrere Tage und eine hoch signifikante Verminderung der Infektionsrate bewirken, welche durch eine systemische Antibiotikaprophylaxe nicht erreicht werden konnte [92, S. 223].

Als Beschichtungsmaterialien für orthopädische bzw. traumatologische Implantate bieten sich u.a. resorbierbare Materialien an, welche mit Antibiotika imprägniert werden. Eine Polylactid-co-glykolsäure-copolymer Schicht wurde von Price et al. [82, S. 281] als Träger für Gentamicin verwendet. In *in vitro* Versuchen wurden damit signifikante Keimreduktionen durch hohe lokale Antibiotikakonzentrationen beobachtet [82, S. 281]. Auch Poly-D-L-Laktid (PDLLA), welches ebenfalls als resorbierbare Beschichtung für medizinische Implantate zur Verfügung steht, wurde von Gollwitzer et al. [29, S. 585] *in vitro* untersucht. Für diese Schicht konnte eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über einen Zeitraum von mindestens 96 Stunden, sowie eine signifikant reduzierte Adhäsion von Bakterien nachgewiesen werden [29, S. 585]. In einem zweiten Schritt erfolgte die Testung dieser Schicht *in vivo*, nach einem Protokoll zur Induzierung einer Implantat-assoziierten Infektion [66, S. 593]. Hierzu wurde in vier Gruppen von Sprague-Dawley Ratten Kirschnerdrähte verschiedener Beschichtungen implantiert und im Anschluss mit je 10^3 KBE *Staphylococcus aureus* infiziert. Die Kulturen der mit PDLLA + 10% Gentamicin beschichteten K-Drähte zeigten hierbei ein signifikant vermindertes bakterielles Wachstum [65, S. 521]. Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse im Tierversuch erfolgte mittlerweile auch eine humane Anwendung dieser PDLLA Schicht. Die Indikation zur Implantation der beschichteten Marknägel stellt sich hierbei im Besonderen bei drittgradig offenen Frakturen und Reosteosynthesen [86, S. 660] (Abb. 3.8a,b).

Ebenfalls in einem Tiermodell konnten Nablo et al. [73, S.6984] eine um 82% reduzierte Implantat-Infektionsrate finden, indem Sol-Gel (Ethanol, Wasser, Salzsäure, Butyltrimethoxysilan, N-(6-Aminohexyl)-Aminopropyltrimethoxysilan) beschichtete Implantate mit NO beladen und implantiert wurden [73, S. 6984].

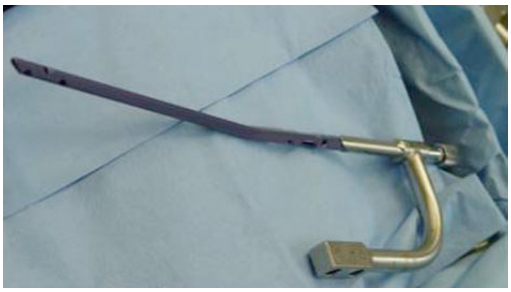

Abbildung 3.8a: Gentamicin beschichteter Marknagel (UTN-Protect, Synthes) mit Einschlagbügel (aus Raschke et al. [86])

Abbildung 3.8b: Implantation des UTN-Protect bei liegendem Fixateur externe (aus Raschke et al. [86])

Generell muss bei den antiinfektiösen Oberflächenmodifikationen zwischen antiadhäsiven und antibakteriellen Oberflächen unterschieden werden. Antibakterielle Oberflächenmodifikationen zielen hierbei auf eine Reduktion des bakteriellen Wachstums ab, während antiadhäsive Oberflächen die initiale Adhärenz der Bakterien verhindern. Sowohl bei antibakteriellen als auch bei antiadhäsiven Oberflächen darf gerade in der Orthopädie und Traumatologie die notwendige ossäre Integration nicht ausser Acht gelassen werden [30, S. 65].

Alle hier bisher beschriebenen antiinfektiösen Oberflächenbeschichtungen hatten das Ziel, direkt in den mikrobiellen bzw. bakteriellen Lebenszyklus einzugreifen und bakterizid oder bakteriostatisch zu wirken. Ein antiadhäsiver Ansatz wiederum steckte hinter der

Beschichtung von medizinischen Implantaten mit querverbundenem Albumin. Durch die Modifikation der Oberfläche konnte im Modellversuch eine verminderte Adhärenz von Bakterien an der Titanoberfläche nachgewiesen werden, welche im weiteren zu einer verminderten Infektionsrate von Endoprothesen oder Implantat-assoziierten-Infektionen führen könnte [3, S. 846]. Allerdings beeinflusst eine derartige antiadhärente Oberfläche auch das Anwachsen von Knochenzellen, und Daten zur ossären Integration dieser modifizierten Oberflächen stehen noch aus.

Im Jahr 2000 erfolgte eine klinische Untersuchung zur Verminderung des Endokarditis Risikos bei künstlichem Klappenersatz (AVERT Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial) in einer Multicenterstudie. Dabei wurden mit Silzone® beschichtete Herzklappen implantiert [98, S. 131]. Bei der so genannten Silzone® Beschichtung handelt es sich um eine Silberbeschichtung, welche *in vitro* Zytokompatibilität aufwies und gleichzeitig eine mikrobielle Besiedlung verminderte [54, S. 524]. Die theoretischen Vorteile dieser neuartigen Beschichtung konnte allerdings im klinischen Einsatz nicht bestätig werden. Es zeigten sich unerwartete Komplikationen wie eine erhöhte Rate an frühen postoperativen Embolien [56, S. 1055] und Undichtigkeit [99, S. 789], welche zu einer Rückrufaktion des Implantates führten. Bei der Thrombogenese spielte die nicht endothelialisierte künstliche Oberfläche eine wichtige Rolle bezüglich der Plättchenaggregation und letztendlich bei der Entstehung eines Thrombus. Künstliche Herzklappen sind deshalb darauf ausgelegt rasch in die anatomischen Strukturen einzuwachsen. Der hemmende Effekt der Silberionen auf die Fibroblasten kann in diesem Fall zu einer Verzögerung der zellulären Besiedelung geführt haben. Dies hat wiederum prädisponierend auf ein thromboembolisches Geschehen gewirkt [56, S. 1059].

So genannte Pininfektionen sind weiterhin eine äußerst häufige Komplikation bei der traumatologischen Frakturbehandlung mittels Fixateur externe, und insbesondere bei langliegenden Fixateuren im Rahmen der Kallusdistraktion. In der Literatur schwanken die Angaben zur Infektionsrate zwischen 2 und 30% [71, S. 600]. Für eine Silberbeschichtung solcher Pins konnten in einem Modellversuch zunächst viel versprechende Ergebnissen gewonnen werden. Es fand sich eine *in vitro* Zytokompatibilität ohne Zytotoxizität für Osteoblasten und Fibroblasten und fehlender Genotoxizität auf humane Lymphozyten. Dies bezog sich auf Untersuchungen von Silber beschichteten Pins gegenüber herkömmlichen Stahl-Pins [9, S. 892]. Jedoch blieb der antibakterielle Effekt der Silberbeschichtung in der klinischen Prüfung aus. Trotz einer niedrigeren Rate an positiven mikrobiologischen Kulturen der beschichteten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe fehlte diesem Unterschied die statistische Signifikanz [71, S. 602]. Aufgrund fehlender Überlegenheit hinsichtlich des klinischen Verhaltens der beschichteten Pins und gleichzeitig signifikant erhöhten Silberkonzentrationen im Serum der Probanden wurde die Studie schließlich aus ethischen Gründen abgebrochen [71, S. 604].

Ahrens et al. [2, S. 147] nutzen ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften von Silberionen. In einem galvanischen Beschichtungsverfahren wurden Silberionen auf Tumorendoprothesen (Abb. 3.9) aufgebracht. Dabei sind die aufgebrachten Silbermengen angeblich so gering, dass auch bei vollständiger Auflösung der applizierten Schicht keine systemische Intoxikation zu erwarten wäre. Bei Silber handelt es sich um einen Fremdstoff ohne bisher erkennbare Wertigkeit als Spurenelement für den menschlichen Körper [63, S. 237]. Obwohl Silber über den Urin und Faeces ausgeschieden wird [63, S. 237], kann es v.a. bei der Verwendung silberhaltiger Medikamente zur sog. Argyrie kommen [51, S. 109]. Bei der Argyrie (gr. αργυρος Silber) handelt es sich um Ablagerungen von Silbersalzen in Haut, Schleimhaut und verschiedenen inneren Organen [63, S. 237], welche zu schiefergrauen Verfärbungen führen [51, S. 109]. Derzeit befindet sich die Schicht in der klinischen Prüfung. Hierbei konnte in einer Phase II Studie eine langjährige Freisetzung von Silberionen bisher wohl ohne relevante Nebenwirkungen beobachtet werden [2, S. 150]. Langzeitergebnisse stehen jedoch noch aus. Auch ist fraglich, welche antibakterielle Effektivität die Beschichtung erzielen kann, da die im Knochen verankerten Prothesenteile unbeschichtet bleiben, um die knöcherne Integration nicht zu gefährden.

Abbildung 2.11: Tumormegaendoprothese MUTARS® silberbeschichtet (aus Ahrens et al. [2])

Die Entwicklung einer Polyurethan-Matrix zielte ebenfalls auf eine Minimierung der Biofilmbildung und daraus folgend auf eine Reduzierung von Implantat-assoziierten

Infektionen ab [49, S. 161]. Die Matrix sollte kontrolliert Ciprofloxacin als antibiotisches Agens freisetzen. Es wurde *in vitro* eine deutlich reduzierte Anzahl an adhärenten, proliferierenden Keimen gefunden [49, S. 160]. Auch bei Versuchen mit einer kovalenten Beschichtung von 3-(Trimethoxysilyl)-Propyldimethyloctadecylammonium konnten *in vitro* als auch *in vivo* antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen werden [31, S. 1417], klinische Ergebnisse stehen auch hier noch aus.

Trotz einer Vielzahl von viel versprechenden Ansätzen einer optimierten Oberflächenbeschaffenheit für medizinische Implantate hinsichtlich der Biokompatibilität und gleichzeitiger Antiinfektiösität gab es bislang keinen entscheidenden Durchbruch in der Beschichtungstechnologie. Meist zeigten neue Ansätze positive *in vitro* Ergebnisse, während klinische Anwendungsbeobachtungen entweder nach kurzer Zeit abgebrochen wurden bzw. noch ausstehen.

Hydroxylapatit andererseits, kann als Beschichtung auf Endoprothesen die knöcherne Integration verbessern und wird klinisch bereits auf zementfreien Hüftendoprothesen als Beschichtung verwendet [12, S. 924]. Bezüglich der antibakteriellen Wirkung hat dies jedoch einen negativen Effekt. Im Vergleich zwischen mit Hydroxylapatitbeschichteten Implantaten und reinen $TiAl_6V_4$ Implantaten konnte *in vitro* ein bevorzugtes Wachstum von Bakterien auf den Hydroxylapatitbeschichteten Implantaten nachgewiesen werden [109, S. 490]. Dennoch beinflußt auch die ossäre Integration die Infektresistenz. Fest integrierte Implantate erweisen sich hierbei als signifikant infektionsresistenter. Die Primärantwort des Immunsystems gegen das eingebrachte Implantat hat einen großen Einfluß auf die Sekundärantwort gegenüber Infektionserregern. Die durch den Fremdkörper induzierte chronische Entzündungsreaktion verursacht eine Erschöpfung des Immunsystems und resultiert in einer insuffizienten Sekundärantwort gegenüber Bakterien [30, S. 64]. *In vivo*, konnte dann wiederum gezeigt werden das biokompatible Implantate neben einer verbesserten knöchernen Integration auch zu einer Reduktion der Infektrate führen können [30, S. 64]. Kombinationen von Hydroxlapatit mit Antibiotika oder antibakteriellen Ionen befinden sich jedoch noch in der präklinischen Entwicklung.

3.4 Eine neuartige Sol-Gel-abgeleitete biokompatible Titanoxidbeschichtung für medizinische Implantate

Im Jahre 1998 wurde das Friedrich-Baur-Forschungsinstitut (FBI) gegründet und beschäftigt sich seitdem mit der Erforschung und Entwicklung von Biomaterialien. Hauptsächlich werden dort keramische Materialien sowie Werkverbundstoffe über den Bereich der gesamten Prozesskette entwickelt. Hierbei stehen die Verbesserung von mechanischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie der Bioverträglichkeit im Vordergrund [120]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Oberflächenbeschichtung wurde durch das FBI hergestellt.

Aufgrund vorteilhafter physikalischer, chemischer und bruchmechanischer Eigenschaften werden Titan und Titanlegierungen seit Jahren mit immer weiter zunehmendem Erfolg als Werkstoffe für Implantate eingesetzt. Einer der Hauptvorteile von Titanlegierungen ($TiAl_6V_4$) gegenüber Kobalt-Chrom-Molybdän (CoCrMb) als Implantatwerkstoff für zementfreie Endoprothesen ist ein niedrigeres Elastizitätsmodul. Dies führt in der Hüftendoprothetik zu einem reduzierten „stress-shielding“ und in der Folge zu einem besseren Remodeling des Femurs [44, S. 85].

Obwohl alle Bestandteile von modernen Metalllegierungen die in der Medizin Verwendung finden in hohen Konzentrationen toxisch wirken, gibt es keine experimentellen oder epidemiologische Daten, dass Bestandteile von $TiAl_6V_4$ in den typischen Konzentrationen, welche nach Prothesenimplantation nachgewiesen werden, unter aseptischen Bedingungen zu einer relevanten toxischen Reaktion führen. Dies gilt sogar für die erhöhten Konzentrationen bei Abrieb oder aseptischer Lockerung. Des Weiteren wurde für $TiAl_6V_4$ keine Karzinogenität beschrieben [44, S. 88]. Eine dünne ubiquitär vorhandene Titandioxid-Schicht von einigen Nanometern ist maßgeblich dafür verantwortlich, dass Titanimplantate nur in den seltensten Fällen vom Körper als unverträglicher Fremdkörper erkannt werden und im Anschluss eine Abstoßungsreaktion erfolgt. Die Beschaffenheit der Implantatoberflächen ist also für die Interaktion zwischen Knochen und Implantat von maßgeblicher Bedeutung. Gerade für $TiAl_6V_4$ konnte also ein verbessertes Einwachsverhalten von Osteoblasten beobachtet werden [102, S. 258].

Das Ziel der Entwicklung einer keramischen Sol-Gel-abgeleiteten Oberflächenbeschichtung auf Titanoxidbasis durch das Friedrich-Baur-Institut lag darin, die Biokompatibilität von Titan, durch Aufbringen einer Titanoxid-Schicht von wenigen Nanometern zu verbessern, eine mechanisch beanspruchbare Oberflächenbeschichtung herzustellen und gleichzeitig die Möglichkeit zu eröffnen, antibakteriell wirksame Ionen auf molekularer Basis zu integrieren.

Nach dem Stand der Technik erfolgt derzeit die keramische Beschichtung von Implantaten überwiegend durch physikalische Methoden wie Plasmaspritzen, Sputtern und „physical vapor deposition“ (PVD), oder durch chemische Bedampfungsmethoden („chemical vapor deposition“ (CVD)). Meist ist die dadurch erhaltene Schicht durch eine schlecht kontrollierbare Phasenzusammensetzung sowie eine nicht ausreichende Haftung

gekennzeichnet [45, S. 19]. Weiterhin ist es mit den genannten Beschichtungsmethoden schwierig, strukturierte Oberflächen, auch auf den inneren Porenwänden homogen und mit konstanter Schichtdicke zu applizieren [45, S. 19]. Im Gegensatz zu diesen Methoden wurde zur Herstellung der untersuchten Titanoxidbeschichtung die Sol-Gel-Synthese, ebenfalls ein chemisches Beschichtungsverfahren, verwendet. Die Vorteile dieses Verfahrens beinhalten eine einfachere Prozessführung durch Tauchbeschichtung aus dünnflüssigen Nano-Suspensionen (Solen), eine daraus resultierende Schicht mit einer guten Haftfestigkeit auf verschiedenen Materialien und relativ niedrige Temperaturen (300 bis 600 °C), welche zur Keramisierung notwendig sind.

Zur Auftragung der untersuchten TiO_2-Beschichtung auf metallische Implantate werden zunächst metallorganische Sole unter Argonatmosphäre hergestellt. Hierzu werden verschiedene Titanalkaloide für die Synthese von Gelen in organischen Lösungsmitteln gelöst. Durch Hinzugeben von definierten Mengen Salpetersäure wird der voluminöse Titanoxid-Niederschlag, der gebildet wird, zu Solpartikeln im nm-Bereich gelöst. Durch Eintauchen in die Sole und anschließendes, ruckfreies Herausziehen der Substrate mit gleich bleibender Geschwindigkeit aus einer speziell angefertigten Tauchbeschichtungsanlage, wird die Titanoxid-Schicht generiert. In Abhängigkeit von Ziehgeschwindigkeit sowie Viskosität der Precursorlösung (flüssiges Ausgangsmaterial) kann dadurch die Dicke der sich bildenden Schicht gesteuert werden. Anschließend erfolgt die Trocknung oder wahlweise eine Wärmebehandlung von 100 - 1000 °C, welche zur nachfolgenden Stabilisierung bzw. zur Verdichtung der Beschichtung dient [48, S. 5]. Durch mehrfaches Tauchen in der Lösung können Schichtverbünde aufgetragen werden. In *in vitro* Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich die Sol-Gel-abgeleitete TiO_2-Schicht nicht zytotoxisch verhält [46, S. 87]. Des Weiteren wurden durch physikalische Untersuchungsmethoden wie Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) und Konfokale-Laser-Mikroskopie eine rissfreie und räumlich-dreidimensionale Applikation der Schicht nachgewiesen. Die einfache Schichtdicke liegt zwischen 100 und 300 nm [46, S. 89]. Im Vergleich hierzu liegt die Dicke der oberflächlichen Titan-Schicht herkömmlicher Titan-Implantate bei ca. 4,5 nm [77, S. 32]. Diese oberflächliche Titan-Schicht besteht dann ebenfalls zu einem Grossteil aus Titanoxid, wobei aber auch TiO- und Ti_2O_3-Schichten auftreten [77, S. 32]. Die beschriebene Titandioxidbeschichtung kann sowohl als dichte Schicht, als auch als poröse Oberflächenschicht hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich die dichten Oberflächenbeschichtungen untersucht.

Als Substrat zum Einbringen von Ionen in die Schicht können Metallverbindungen, bevorzugt als lösliche Salze, metallorganische Verbindungen oder Komplexe in definierter Menge, in die dünnflüssige Suspension bzw. das Sol integriert werden. Analog dem oben beschriebenen Verfahren können dann Schichten des metallionenhaltigen Sol-Gels auf Substrate bzw. Implantate in gewünschter Dicke aufgebracht werden [48, S. 5]. In

Abhängigkeit der Schichtdicke und der Ionenkonzentration in der Lösung lässt sich wiederum die Konzentration des aufgebrachten Ions in der Beschichtung steuern. Durch die beschriebenen antibakteriellen Eigenschaften von Ionen und einer potentiellen Freisetzungskinetik aus der TiO_2-Schicht sollte eine ein neuartige antiinfektiöse Oberflächenschicht für medizinische Implantate etabliert werden.

3.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Komplikationen, die durch Implantat-assoziierte Infektionen resultieren können, wurden bereits eingehend erläutert. Durch eine Modifizierung der eingesetzten Grundmaterialien mittels optimierter Oberflächen ist es denkbar, das Infektionsrisiko bei orthopädischen und traumatologischen Eingriffen deutlich zu reduzieren und dennoch eine gute knöcherne Integration bei erhaltener Biokompatibilität zu gewährleisten.

Da in zunehmenden Maße bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika beobachtet werden und zum Zeitpunkt der Operation – ob Primärimplantation, Wechsel-OP oder Frakturversorgung – Erregernachweise mit Resistogramm meist bzw. nie vorliegen, stellt die Verwendung von Ionen als breit wirksames antibakterielles Agens eine mögliche Alternative dar.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- Verschiedene metallische Ionen hinsichtlich ihrer antiinfektiösen Potenz sowie ihrer Zytotoxizität zu testen,
- und unbeschichtete $TiAl_6V_4$-Probekörper, Probekörper aus $TiAl_6V_4$ mit einer reinen Titanoxid (TiO_2)-Beschichtung sowie Probekörper aus $TiAl_6V_4$ mit unterschiedlichen kupferhaltigen Titanoxid (TiO_2)-Beschichtungen hinsichtlich ihrer antibakteriellen Potenz zu untersuchen.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Lösungen

4.1.1.1 Nährlösungen

- Trypticase Soya Bouillon (TSB)

Als TSB Nährlösung zur Anzucht der Keime wurde Bacto™ Soybean-Casein Digest Medium, USP (Becton Dickenson, Heidelberg) verwendet

- RPMI 1640 + 10% FBS

Als Nährlösung zur Durchführung bakterieller Tests diente Gibco™ RPMI 1640 versetzt mit 10% Gibco™ Fetalem Bovinen Serum (FBS, Invitrogen, New York, USA).

- α-MEM + 20% FBS

Als Nährlösung zur Durchführung weiterer bakterieller Tests diente alpha minimal essential medium (α-MEM, Life Technologies, Paisley, UK) versetzt mit 20% Gibco™ FBS (Invitrogen, New York, USA).

4.1.1.2 Waschlösungen

- Dulbeccos PBS

Als Waschlösung wurde Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco™ (Vitrogen Corporation, New York, USA) verwendet.

- Waschpuffer (Phosphatpuffer)

Als Waschpuffer wurde ein Phosphatpuffer eigens aus 5 mM Na_2HPO_4, 5mM NaH_2PO_4 in 1000 ml 0,85% NaCl Lösung hergestellt.

- Wässrige Trypsin Lösung

Es wurde 0,25% Trypsin supplementiert mit 0,5 mM EDTA (Sigma, München, Deutschland) verwendet.

- Natrium Lauryl Sulfat

Es wurde 2,5% SDS (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

4.1.1.3 REM Fixierlösung

- Fixierlösung

Die Fixierlösung bestand aus 1,5% Glutaraldehyd (Sigma, Deutschland) und 2% Paraformaldehyd (Sigma, Deutschland). Die hergestellte Lösung wurde durch Zugabe von 0.1 M Natriumcacodylat (Sigma, Deutschland) gepuffert. Der Anteil an Glutaraldehyd wurde auf bis zu 3% angehoben.

4.1.1.4 Neutralisationslösung

- Neutralisationslösung

Als Neutralisationslösung wurde eine selbst angefertigte Lösung nach Tilton und Rosenberg [107, S. 1116], bestehend aus 1,46 g Natrium-Thiosulfat und 1,0 g Natrium-Thioglykolat, aufgelöst in 1000 ml destilliertem Wasser, verwendet.

4.1.1.5 Metallionen

- Aluminium

Es wurde Aluminiumchlorid-Hexahydrat in Pulverform (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- Kobalt

Es wurde Kobalt(II)-acetat Tetrahydrat in Pulverform (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- Kupfer

Es wurde Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat in Pulverform (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- Silber

Es wurde Silbernitrat in Pulverform (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- Quecksilber

Es wurde Quecksilber(I)-chlorid in Pulverform (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

- Zink

Es wurde Zinkchlorid in Pulverform der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland verwendet.

4.1.2 Biologische Materialien

4.1.2.1 Bakterien

Staphylococcus aureus ATCC 25923 wurde freundlicherweise vom Institut für Klinikhygiene der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde der Referenzkeim *S. epidermidis* ATCC 35984 für die mikrobiologischen Versuche eingesetzt.
Ein methicillinresistenter Stamm (MRSA 27065) der Spezies *Staphylococcus aureus* wurde im Rahmen der Entfernung einer infizierten Endoprothese isoliert und von der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Biomaterialien

4.1.3.1 Metallplättchen

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften von beschichteten Plättchen wurden Plättchen aus $TiAl_6V_4$ mit einem Durchmesser von 14,5 mm und einer Höhe von 0,9 mm am Friedrich Baur Institut Bayreuth mit verschieden modifizierten Sol-Gel abgeleiteten Beschichtungen aus Titan(IV)oxid versehen. Es lagen unbeschichtete Plättchen, lediglich mit

TiO_2 beschichtete Plättchen, einfach mit einer kupferhaltigen TiO_2-Oberfläche beschichtete Proben, sowie durch Wiederholung der Tauchbeschichtung zwei-, drei- und vierfach mit einer kupferhaltigen TiO_2-Oberfläche beschichtete Plättchen vor.

4.1.4 Geräte

Präzisionswaage, Zentrifuge, MacFarland Densimat, Sicherheitswerkbank und Ultraschallgerät wurden freundlicherweise durch das Institut für Klinikhygiene der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

Präzisionswaage

MCI Research RC 210P™ der Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

Zentrifuge

Megafuge 1.0R™ der Firma Heraeus mit Rotor Nr. 2252 der Firma Sorvall.
190 x G entsprechend 1000 U/min. 1.700 x G entsprechend 3000 U/min.

MacFarland Densimat

Densimat™ der Firma bioMérieux, Nürtingen, Deutschland.

Sicherheitswerkbank

LabGard™ NU 425-400 der Firma NuAire, Plymouth, U.S.A.

Ultraschallgerät

Sonorex™ RK 255 H der Firma Bandelin, Berlin, Deutschland.

4.2 Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Tests zur antibakteriellen Wirksamkeit als auch Zytotoxizität wurden unter exakt äquivalenten Versuchsbedingungen an Bakterien und Gewebezellen untersucht, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Versuche zur Zytokompatibilität der verschiedenen Oberfläche erfolgten durch das Friedrich Baur-Institut Bayreuth. Hierbei wurde als Nährlösung RPMI 1640+10% FBS zur Untersuchung von Fibroblasten und alpha minimal essential medium (α-MEM)+20% FBS zur Untersuchung von osteablastenähnlichen MC3T3-Zellen verwendet. Die entsprechenden Nährmedien wurden auch für die Bakterientests eingesetzt.

4.2.1 Antibakterielle Potenz der verschiedenen Metallionen

4.2.1.1 Herstellung der Metallionenlösungen

Zur Untersuchung hinsichtlich der antibakteriellen Potenz der verschiedenen Metallionen mussten zunächst die in Pulverform vorliegenden Ionen in Lösung gebracht werden. Von jedem Ionensalz wurde eine Lösung mit einer Ionenkonzentration von 20 mmol/l hergestellt. Da die Metallionen nicht in reiner Form, sondern in Metallkomplexen vorlagen, musste zur Berechnung der Gesamtmasse auch die molare Masse der jeweiligen Komplexpartner eingehen, und auch das im Pulver enthaltene „freie Wasser“ musste bei der Berechnung berücksichtigt werden (Tab.3.1).

Die errechnete Masse des Metallkomplexes wurde unter sterilen Bedingungen mittels Präzisionswaage abgewogen. Im Anschluss erfolgte die Autoklavierung mit destilliertem Wasser. Die benötigten Metallionenlösungen wurden jeweils frisch am Tag vor Durchführung des jeweiligen Experiments angefertigt.

Herstellung der Metallionenlösungen			
Metallkomplex	**Molare Masse der Komplexpartner (g/mol)**	**Massenkonzentration Metallkomplex ohne freies Wasser (mg/ml)**	**Stoffmengenkonzentration Metallkomplex (mmol/l)**
Aluminiumchlorid-Hexahydrat $AlCl_3 \times 6H_2O$	Al 26.981539 Cl 35.4527 H 1.00794 O 15.9994	4.828644	20
Kobalt(II)-acetat Tetrahydrat $CoC_4H_6O_4 \times 4\ H_2O$	Co 58.9332 C 12.011 H 1.00794 O 15.9994	4.981656	20
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat $CuCl_2 \times 2\ H_2O$	Cu 63.546 Cl 35.4527 H 1.00794 O 15.9994	3.4096	20
Silbernitrat $AgNO_3$	Ag 107.8682 N 14.00674 O 15.9994	3.397	20
Quecksilber(I)-chlorid Hg_2Cl_2	Hg 200.59 Cl 35.4527	4.72086	20
Zinkchlorid Cl_2Zn	Cl 35.4527 Zn 65.39	2.72592	20

Tabelle 4.1: Eingesetzte Metallsalze und Massenkonzentrationen zur Herstellung einer Metallionenlösung mit einer Konzentration von 20 mmol/l

4.2.1.2 Antibakterielle Potenz einzelner Metallionen

Zur Durchführung der Tests hinsichtlich der antibakteriellen Potenz der Metallionen wurde als Referenzkeim *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 verwendet. Ein Isolat des Keims lag bei -70°C vor.

Aus dem Isolat wurde in einer Übernachtkultur auf Blutagarplatten bei 37° im Brutschrank eine Kultur des Keims angereichert. Am folgenden Tag erfolgte die Anzucht von einer KBE auf ca. 5 ml TSB, ebenfalls in einer Übernachtkultur bei 37° im Brutschrank. Hierdurch wurde

sichergestellt, dass sich die Keime in der endlogarithmischen Wachstumsphase befanden und ein homogenes Verhalten aufwiesen.

Nach zwei Waschgängen in Dulbeccos PBS und Zentrifugation erfolgte die Einstellung einer Bakterienkonzentration in NaCl korrespondierend zu MacFarland 0.5 (McF). Ein McF-Wert von 0,5 entspricht einer Ausgangskonzentration von $5x10^7$ KBE/ml. Über weitere Verdünnung wurde zunächst eine Suspension in NaCl von 10^7 KBE/ml eingestellt. Damit wurde schließlich die Nährlösung RPMI 1640+10% FBS über eine weitere Verdünnung (1/100) mit Bakterien versetzt, so dass die endgültige Konzentration von 10^5 KBE/ml in der infizierter Nährlösung erreicht wurde.

Je 1ml der infizierten Nährlösung wurde dann in die Vertiefung eines Wells einer Zellkulturplatte (24-Well-Platte) auspippetiert. Im Anschluss wurden die Metalllösungen mit einer Menge von 110 µl zugegeben. Bei unverdünnter Zugabe entsprach dies einer Konzentration von circa 2 mmol/l (genau 1,981982 mmol/l). Die Konzentration der KBE in der infizierten, und nun mit Metallionenlösung versetzen Nährlösung betrug somit 10^5/1,11 KBE/ml. Bereits zu Versuchsbeginn wurde eine Verdünnungsreihe der verwendeten Ionenlösungen hergestellt um eine Wachstumshemmkurve des spezifischen Metallions zu Ermitteln. Dies geschah abermals unter Zugabe von destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen. Je 110 µl der jeweilig verdünnten Metallionenlösung wurden dann je 1 ml der kontaminierten Nährlösung zugesetzt. Alle während der Versuche verwendeten Metallionen Konzentrationen in der kontaminierten Nährlösung sind im Anhang (Tab. 10.1) aufgeführt. Eine Kontrolle erfolgte durch die Zugabe von 110 µl destilliertem Wasser zu 1 ml der kontaminierten Nährlösung. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank über 24 Stunden bei 37°C der infizierten, mit Ionen bzw. destilliertem Wasser versetzten Nährlösung in der jeweiligen Zellkulturplatte.

Exakt 24 Stunden später wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen und durch Zugabe von je 200 µl Neutralisationslösung zu je 200 µl der verschiedenen Nährlösungen eine weitere reminiszente antibakterielle Wirkung der Ionen abgestoppt. Um eine weitere Proliferation der Keime zu vermeiden, wurden die jeweils nicht bearbeiteten Proben gekühlt. Im weiteren Verlauf wurden die Nährlösungen jeweils 1/10 verdünnt, um die spätere Auszählung zu ermöglichen, und es wurden je 100 µl der Verdünnungsreihen auf handelsüblichen Müller-Hinton Agar Platten ausgeimpft. Die beimpften Kulturplatten wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die KBE je Probe und Verdünnungsstufe ausgezählt. Die weitere Auswertung erfolgte durch Kalkulation der arithmetischen Mittel sowie der Standardabweichungen.

4.2.2 Antibakterielle Potenz verschiedener Kombinationen von Metallionen

Zur Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen hinsichtlich der antibakteriellen Potenz verschiedener Kombinationen von Metallionen wurde ebenfalls *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 verwendet. Die Präparation der infizierten Nährlösung erfolgte

analog der vorher beschriebenen Versuche, so dass ebenfalls eine Ausgangskonzentration von 10^5 KBE/ml infizierter Nährlösung vorlag. Auch die Herstellung der einzelnen Metallionenlösungen blieb unverändert. Als zu untersuchende Ionenkonzentration wurden näherungsweise 0,02 mmol/l (0,01981982 mmol/l) gewählt. Die untersuchten Ionen-Kombinationen waren Silber und Kupfer, Silber und Quecksilber sowie Quecksilber und Kupfer. Die Summe der Gesamtkonzentration beider Reagenzien in der von uns verwendeten Nährlösung betrug stets ca. 0,02 mmol/l (exakt 0,01981982 mmol/l). Das bedeutet, dass durch entsprechende Ionen Zugabe zunächst 100 % der Konzentration durch ein Ion in der Nährlösung vorhanden war. Im Weiteren wurden dann je 80 % und respektive 60 % der Konzentration durch Zugabe des einen Ions und 20 % respektive 40 % durch Zugabe des anderen Ions erreicht. Anschließend wurden gleiche Teile beider Ionen (je 50 % der 0,02 mmol/l) in der Nährlösung untersucht (Tab. 4.2).

	0 %	**20 %**	**40 %**	**50 %**	**60 %**	**80 %**	**100 %**	**Ion 1**
0 %								
20 %								
40 %								
50 %								
60 %								
80 %								
100 %								
Ion 2								

Tabelle 4.2: **Untersuchte Kombinationen verschiedener Metallionen [Ion 1 und Ion 2] in Prozent [%]. Die jeweils untersuchten Kombinationen sind dunkel schraffiert [ ]. Die gesamt Konzentration in der Nährlösung betrug stets ca. 0,02 mmol/l.**

Das weitere Vorgehen hinsichtlich Inkubation und Auszählung der KBE sowie Auswertung entsprach exakt dem vorher unter 4.2.2 beschriebenen Procedere.

4.2.3 Mikrobiologische Untersuchung beschichteter und unbeschichteter Probekörper

Die folgenden Oberflächen wurden untersucht:

- unbeschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 1 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 2 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 3 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 4 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen

4.2.3.1 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640+10% FBS über 24 Stunden

Zunächst wurden mittels einer ausgeglühten Pinzette die Titanplättchen in eine 12-Well Zellkulturplatte überführt und im Anschluss für zwei Stunden unter UV-Licht sterilisiert [5, S. 23].

Ein Isolat von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 war ebenfalls in tiefgekühlter Form vorhanden und wurde in gleicher Weise wie unter 4.2.1.2 für die Bestimmung der antibakteriellen Potenz verschiedener Metallionen vorbereitet, so dass wiederum eine Ausgangskonzentration von 10^5 KBE/ml RPMI 1640+10% FBS als infizierte Nährlösung vorlag.

Nach Ablauf der Sterilisationsphase konnte jedem vorliegenden Titanplättchen nunmehr je 1 ml der infizierten Nährlösung zugegeben werden. Danach erfolgte die 24-stündige Inkubation im Brutschrank bei exakt 37°C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 200 µl der Nährlösung eines jeden Wells mit 200 µl der Neutralisationslösung versetzt und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert. Der restliche Überstand der Inkubationslösung wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und verworfen. Nachfolgend wurden die im Well verbliebenen Plättchen zweimalig vorsichtig mit der sterilen Spüllösung abgewaschen und darauf in je 10 ml NaCl enthaltende Gefäße überführt. Die anhaftenden Keime wurden dann durch 7-minütige Ultraschallbehandlung (55 kHz) bei Raumtemperatur abgelöst.

Je 100 µl der NaCl-Lösung mit den abgelösten Keime, sowie je 100µl der gekühlten infizierten Inkubationslösung wurden im Anschluss in verschiedenen Verdünnungen auf Standard Müller-Hinton Agarplatten ausgeimpft und bei 37°C bebrütet. Nach 24 Stunden erfolgte dann die Auszählung der KBE.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Kalkulation der arithmetischen Mittel sowie der Standardabweichungen. Durch die Verwendung der nicht parametrischen Methode und der Methode zur Evaluierung von geschlossenen Prüfverfahren [70, S. 655] wurden die Ergebnisse dann auf statistische Signifikanz geprüft (Kruskal Wallis und Mann-Whitney Test). Hierbei wurden Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

4.2.3.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* MRSA 27065 und RPMI 1640+10% FBS über 24 Stunden

Die Versuchsdurchführung wie unter 4.2.3.1. beschrieben wurde ebenfalls für ein Isolat des Keims *Staphylococcus aureus* MRSA 27065 exakt wiederholt, wobei diesmal eine Nährlösung mit einer Ausgangskonzentration von 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* MRSA 27065/ml (RPMI 1640+10% FBS) verwendet wurde.

4.2.3.3 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 und α-MEM +20% FBS über 24 Stunden

Um vergleichende Aussagen bezüglich Biokompatibilität sowie antibakterieller Wirksamkeit der untersuchten Oberflächen auch zu den osteoblastenähnlichen MC3T3-Zellen treffen zu können, erfolgte eine weitere Testung der Titanplättchen mit α-MEM + 20% FBS als Nährlösung. Nach Erhalt einer Ausgangskonzentration von 10^5 KBE /ml, mit α-MEM + 20% FBS als Nährlösung, erfolgte die weitere Versuchsdurchführung mit *S. aureus* ATCC 25293 analog zu 4.2.3.1.

4.2.3.4 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 und RPMI 1640+10% FBS über 7 Tage

Um eine Aussage über eine mögliche prolongierte Freisetzung der Ionen aus den keramischen Schichten und somit eine länger anhaltende antibiotische Wirksamkeit zu untersuchen, wurden Versuche über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt.

Als Testkeim diente hierzu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Die Vorbereitung erfolgte analog der vorher beschriebenen Versuche, so dass wiederum eine Ausgangskonzentration von 10^5 KBE/ml in RPMI 1640+10% FBS als Versuchssuspension vorlag.

Nach vorheriger, zweistündiger UV-Sterilisation der Titanplättchen erfolgte die Zugabe von je 1 ml infizierter Nährlösung in die Zellkulturplatten. Im Anschluss wurden die Plättchen bei 37°C für 24 Stunden bebrütet. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden je 200 µl der für 24 Stunden inkubierten Lösung entnommen und zu je 200 µl Neutralisationslösung zugegeben, und bis zur Weiterverarbeitung gekühlt gelagert.

Der restliche Überstand der Inkubationslösung wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und verworfen. Nachfolgend wurden die im Well verbliebenen Plättchen zweimal vorsichtig mit steriler Spüllösung gewaschen, um nicht-adhärente Bakterien zu entfernen. Im Anschluss wurden die Titanplättchen mittels einer jedes Mal erneut ausgeglühten Pinzette in eine neue, sterile Zellkulturplatte überführt, erneut mit diesmal je 1 ml sterilem RPMI 1640+10% FBS als Nährlösung bedeckt und darin für weitere 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Der gekühlt gelagerte und mittels Neutralisationslösung versetzte Überstand wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Müller-Hinton Agar-Platten ausgeimpft und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Im Anschluss erfolgte die Auszählung der KBE.

Den erneut inkubierten Proben wurden nach Ablauf von 48 Stunden, nun also insgesamt 72 Stunden seit Versuchsbeginn, wiederum je 200 µl der Nährlösung entnommen, zu je 200 µl Neutralisationslösung zugegeben, wieder bis zur Weiterverarbeitung gekühlt und schließlich in Verdünnungsreihen auf Agarplatten ausgeimpft und die KBE nach 24-stündiger Inkubation quantifiziert.
Analog dem Vorgehen nach dem ersten Tag Inkubation wurden die verbliebenen Plättchen zweimalig mit steriler Spüllösung gewaschen, mittels einer ausgeglühten Pinzette in eine neue, sterile Zellkulturplatte überführt und daraufhin mit je einem ml sterilem RPMI 1640+10% FBS als Nährlösung bedeckt und für weitere 48 Stunden bei 37°C bebrütet.
Ein entsprechendes Vorgehen erfolgte wiederum nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit, also insgesamt 120 Stunden bzw. 5 Tagen seit Versuchsbeginn.
Nach insgesamt 168 Stunden, d.h. 7 Tagen, wurde der Versuch beendet. Hierzu wurden wieder je 200 µl Neutralisationslösung vorbereitet und nach Zugabe von je 200 µl der Inkubationslösung pro Probe bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert.
Der restliche Überstand der Inkubationslösung wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und verworfen. Nachfolgend wurden die im Well verbliebenen Plättchen wiederum zweimalig vorsichtig mit steriler Spüllösung abgewaschen und darauf in je 10 ml NaCl enthaltende Gefäße überführt. Die anhaftenden Keime wurden durch 7-minütige Ultraschallbehandlung bei 55 kHz und Raumtemperatur abgelöst. Je 100 µl der abgelösten Keime in der NaCl Lösung sowie je 100 µl der gekühlten infizierten und mit Neutralisationslösung versetzten Inkubationslösung wurden im Anschluss wiederum in verschiedenen Verdünnungen auf Standard Müller Hinton Agarplatten ausgeimpft und bei 37° bebrütet. Nach 24 Stunden erfolgte dann die endgültige Auszählung der KBE. Die statistische Auswertung erfolgte im Anschluss analog zu 4.3.1.

4.2.4 Korrespondierende Zytokompatibilitätstests an Gewebezellen (FBI Bayreuth)

Der Vollständigkeit halber wird hier auch die Durchführung der vergleichenden Zellkulturuntersuchungen – welche am Friedrich-Baur-Institut Bayreuth durchgeführt wurden – erläutert. Die Zelltests wurden unter äquivalenten Versuchbedingungen wie die Bakterientest durchgeführt, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der antibakteriellen und zytotoxischen Resultate zu gewährleisten.

4.2.4.1 Wachstumshemmung von Gewebezellen durch Metallionen

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden „Mouse connective tissue fibroblasts“ (L929, DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden jeweils 100.000 Zellen in Polystyrolkulturplatten (Techno Platic Products, Trasadingen, Schweiz) unter 5%iger CO_2-Atmosphäre in 1 ml RPMI 1640 (Gibco Vitrogen Corporation, New York, USA), supplemiert mit 10% fetalem bovinen Serum (FBS, Life Technologies, Grand Island, USA) vorgezüchtet. Nach 4 Stunden wurde das ursprünglich verwendete Nährmedium entfernt und

durch frisches Nährmedium ersetzt, wobei verschiedene Konzentrationen von Metallionen hinzugefügt wurden.

Die Zellproliferation nach der seriellen Dilution mit verschiedenen, bereits ausführlich unter 4.2. beschriebenen Metallionen, wurde durch die Quantifizierung adhärenter Zellen nach 24 Stunden bestimmt. Hierzu wurden die adhärenten Zellen mit einer wässrigen Lösung bestehend aus 0,25% Trypsin und 0,5 mM EDTA (Sigma, München, Deutschland) von den Platten abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde dann durch 700 µl RPMI 1640 supplemiert mit 10% FBS gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Zellen durch einen Zellzähler (Coulter Z2, Beckman, Krefeld, Deutschland).

In einer weiteren Versuchreihe wurde die mitochondrale Aktivität der Zellen bestimmt, welche ein indirekter Indikator der Zellvitalität ist. Dafür wurde der so genannten WST-1 Test (Roche, Basel, Schweiz) verwendet, welcher die Aktivität von mitochondralen Dehydrogenasen über die Reduktion von einem Tetrazolium-Salz zu Formazan misst. Die unter den verschiedenen Metallionenkonzentrationen inkubierten Zellen wurden in den Zellkulturplatten mit 1 ml Dulbecco's PBS vorsichtig gewaschen, um die nicht adheränten Zellen zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen in einer Lösung bestehend aus 1 ml RPMI 1640 supplemiert mit 10% FBS und 10 µl WST-1 („2-(4-Iodphenyl)–3-(4-Nitrophenyl)–5-(2,4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Mononatrium Salz") für 75 Minuten. Abschließend wurde nach der vollständigen Lösung des akkumulierten Formazans in der Nährlösung die Menge des Formazans über ein UV-Vis Spektometer (λ = 430 nm, 690 nm, DU 640, Beckmann, Krefeld, Deutschland) bestimmt.

4.2.4.2 Oberflächenbesiedlung unbeschichteter und verschieden beschichteter Titanplättchen durch Gewebezellen

Wie bereits bei den Untersuchungen zur antibakteriellen Potenz der verschiedenen TiO_2-Schichten wurden als Referenz unbeschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen verwendet. Des Weiteren erfolgte eine Versuchsreihe mit Polystyrol (Zellkulturplatten ohne Titanplättchen) als Standardkontrolle für das Zellwachstum. Für die weiteren Untersuchungen standen die folgenden Oberflächen zur Verfügung:

- unbeschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 1 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen
- 4 x Cu- TiO_2-beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen

Wie bereits ausführlich unter 3.3. beschrieben kann durch die Mehrfachbeschichtungen eine höhere Konzentration an Kupferionen an der Implantatoberfläche erreicht werden.

Vor der Zellbesiedelung wurden die Proben in einem Ultraschallbad mit destilliertem Wasser und Natriumlaurylsulfat (2,5% SDS, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) behandelt und anschließend mit Isopropanol getrocknet. Danach erfolgte analog zu den antibakteriellen Testungen die Sterilisation mittels UV-Licht (590 nm) für 2 Stunden.

Für die *in vitro* Untersuchungen der Gewebezellen im direkten Oberflächenkontakt zur Zytokompatibilitätsprüfung wurden „Embryo calvaria mouse osteoblast-like cells“ (MC3T3-E1, DSMZ, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die MC3T3-E1 Zellen wurden zunächst in Alpha-minimal Essential Medium (α-MEM, Life Technologies, UK), augmentiert mit 50 µg/ml Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerolphosphat, 1 Vol% Penstrep (Sigma, Deutschland) und 5% fetalem Kälber Serum (FBS, Life Technologies, UK), in befeuchteter Luft bei 37°C (5% CO_2) angezüchtet. Im Anschluss wurden die sterilisierten Proben in 24-Well Kulturplatten überführt und 10^5 Zellen gelöst in 1 ml α-MEM hinzugefügt. Analog den Untersuchungen zur Wachstumshemmung wurden Untersuchungen bezüglich Zellvitalität mittels WST-1 Test nach 48 Stunden durchgeführt.

Die Zellproliferation anhaftender MC3T3-E1 Zellen auf TiO_2 beschichteten- sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$ Plättchen wurde ebenfalls bestimmt. Dies erfolgte zunächst über die Trypsinierung der anhaftenden Zellen mit 300 µl einer wässrigen Lösung bestehend aus 0,25 Vol% Trypsin und 0,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma, Deutschland) und anschließender Bestimmung der Zellzahl mittels Zellzähler (Coulter Z2, Beckman, Deutschland).

5. Ergebnisse

5.1 Antibakterielle Potenz einzelner Metallionen

5.1.1 Antibakterielle Potenz von Silberionen

In einem Modell wurde quantitativ die Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 durch unterschiedliche Metallionen untersucht. Durch Zugabe von entsprechenden Verdünnungen der jeweiligen Metallionen zu der infizierten Nährlösung wurde darauf geachtet, dass in der jeweiligen Versuchsreihe immer eine komplette Sterilisation für mindestens eine Metallionenkonzentration erreicht wurde. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die KBE direkt ausgezählt und notiert (Tab. 5.1). Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten wurden je 6 Versuchsreihen durchgeführt. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

	[KBE]				
Ag+ [mmol/l]	**0**	**0,01**	**0,05**	**0,1**	**0,2**
Mittelwert	**$3{,}7 \times 10^5$**	**$4{,}6 \times 10^5$**	**$1{,}8 \times 10^5$**	**50**	**0**
Standardabweichung	$1{,}7 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^5$	$2{,}2 \times 10^5$	57	0

Tabelle 5.1: Direkt ausgezählte KBE von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Silberionen-Konzentrationen [mmol/l]

Wie bereits unter 4.2.1.2 beschrieben wurden je 110 µl einer verdünnten oder unverdünnten Metallionenkonzentration 1 ml infizierter Nährlösung zugegeben, so dass es sich bei einer Ausgangskonzentration von beispielsweise 20 mmol/l um näherungsweise 2 mmol/l handelte. Exakt lagen in der infizierten mit Metallionen versetzten Lösung in diesem Beispiel nun 1,981982 mmol/l vor. Der Einfachheit halber wurde in den Tabellen in Teil 5 sowie im Anhang bezüglich der Metallionenkonzentration jeweils auf eine gültige Ziffer gerundet. Eine Tabelle in der die gerundeten Metallionenkonzentrationen den entsprechenden exakten Metallionen-Konzentrationen gegenüber gestellt sind, ist im Anhang (Tab. 10.1) gegeben.
Da nach Ablauf der Inkubationszeit in der Nährlösung je 200 µl Inkubationslösung mit 200 µl der Neutralisationslösung versetzt wurden, mussten die direkt ausgezählten KBE zunächst mit 2 multipliziert werden. Im weiteren Verlauf wurden je 100 µl dieser Lösung auf den Müller-Hinton-Agarplatten ausgeimpft und inkubiert. Um folglich die Konzentration an KBE/ml in der Inkubationslösung zu erhalten, musste das Ergebnis (KBE/µl) mit dem Faktor 10 multipliziert werden. Auch von diesen Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichungen errechnet (Tab 5.2).

	[KBE/ml]				
Ag+ [mmol/l]	**0**	**0,01**	**0,05**	**0,1**	**0,2**
Mittelwert	**$7{,}4 \times 10^6$**	**$9{,}3 \times 10^6$**	**$3{,}7 \times 10^6$**	**$9{,}9 \times 10^2$**	**0**
Standardabweichung	$3{,}4 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$	$4{,}5 \times 10^6$	11×10^2	0

Tabelle 5.2: KBE von *S. epidermidis* ATCC 35984 je Milliliter Inkubationslösung nach 24-stündiger Inkubation nach Zugabe unterschiedlicher Silberionen-Konzentrationen [mmol/l]

Zur weiteren Interpretation wurden die hieraus gewonnen Ergebnisse in eine prozentuale Reduktionsrate der Bakterien durch die jeweilige Metallionenkonzentration überführt. Hierzu diente der Mittelwert der Kontrolle (Ag+ Konzentration = 0 mmol/l) als Referenz Wert und wurde mit 100% gleichgesetzt. Anhand dieser Kontrolle wurde für jeden Wert der einzelnen Versuchsreihen die prozentuale Wachstumsreduktion gewonnen. Erneut wurden von diesen Ergebnissen Mittelwert und Standardabweichung errechnet (Tab 5.3, Tab. 10.2).

	[%]				
Ag+ [mmol/l]	**0**	**0,01**	**0,05**	**0,1**	**0,2**
Mittelwert	**100**	**120**	**50**	**0,013**	**0**
Standardabweichung	46	36	60	0,015	0

Tabelle 5.3: Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Silberionen-Konzentrationen [mmol/l]

Nach Zugabe der Silberionen zeigte sich zunächst bei den niedrigeren Ionenkonzentrationen ein stationäres Plateau des bakteriellen Wachstums ohne antibakterielle Wirkung. Nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration war dann eine deutliche, in der Folge exponentiale Reduktion des bakteriellen Wachstums zu beobachten. Eine komplette Sterilisation konnte nach einer Zugabe von 0,2 mmol/ml Silberionen erreicht werden (Abb. 5.1, Tab. 10.2).
Die Vorgehensweise in der Auswertung der gewonnenen Ergebnisse der unterschiedlichen Metallionen erfolgte analog der oben beschriebenen Auswertung für Silberionen.

5.1.2 Antibakterielle Potenz von Quecksilberionen

Auch für die Versuche zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Quecksilberionen wurde wieder auf eine komplette Sterilisation geachtet. Bei den durchgeführten Versuchen konnte diesmal keine weitgehend stationäre Phase bei der Zugabe von niedrigen Konzentrationen beobachtet werden. Bereits bei der Zugabe von ca. 0,01 mmol/l kam es zu einer deutlichen Reduktion des bakteriellen Wachstums. Die Sterilisation konnte dann sicher durch eine Konzentration von ca. 0,05 mmol/l Hg^+ erreicht werden (Abb. 5.1, Tab. 10.3).

5.1.3 Antibakterielle Potenz von Aluminiumionen

Um bei den Versuchen zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Aluminiumionen eine Sterilisation zu erreichen, musste erheblich von der ursprünglich gewählten Ausgangskonzentration abgewichen werden. So wurde in letzter Konsequenz eine Ausgangslösung mit einer Ionenkonzentration von 400 mmol/l hergestellt, welche dann weiter verdünnt wurde. Die Sterilisation konnte bei einer Ionenkonzentration von ca. 20 mmol/l beobachtet werden. Bei einer Ionenkonzentration von ca. 1 mmol/l und ca. 5 mmol/l Aluminiumionen konnte ein leichter Anstieg der KBE verzeichnet werden. Bei einer weiteren Zugabe von Aluminiumionen fiel die Zahl der KBE, ebenfalls überproportional, bis zur endgültigen Sterilisation ab (Abb. 5.1, Tab. 10.4).

5.1.4 Antibakterielle Potenz von Zinkionen

Auch um eine Sterilisation durch Zinkionen in den Versuchen zur bakteriellen Wachstumshemmung zu gewährleisten musste eine Ausgangslösung mit einer deutlich höheren Konzentration hergestellt werden. Die Konzentration an Zinkionen in der finalen Ausgangslösung betrug 200 mmol/l, wobei durch unverdünnte Zugabe in die kontaminierte Nährlösung eine Konzentration von ca. 20 mmol/l erreicht wurde. Bereits durch die Zugabe von relativ geringen Konzentrationen an Zinkionen scheint eine Hemmung des bakteriellen Wachstums zu erfolgen. Eine sichere Sterilisation konnte aber erst durch die Zugabe von ca. 20 mmol/l erreicht werden (Abb. 5.1, Tab. 10.5).

5.1.5 Antibakterielle Potenz von Kobaltionen

Um eine sichere Sterilisation durch Kobaltionen zu gewährleisten musste die Konzentration in der infizierten Nährlösung auf ca. 0,5 mmol/l angehoben werden. Die Konzentration der eigens hergestellten Ausgangslösung betrug somit exakt 5 mmol/l. Bei den Versuchen zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Kobaltionen ist zunächst wieder eine weitgehend stationäre Phase zu erkennen. Nach Überschreiten des Schwellenwertes bei einer Konzentration von ca. 0,1 mmol/l reduzierte sich dann die Anzahl an KBE fast linear (Abb. 5.1, Tab. 10.6).

5.1.6 Antibakterielle Potenz von Kupferionen

Um eine sichere Sterilisation durch Kupferionen zu gewährleisten musste die Konzentration in der infizierten Nährlösung auf ca. 0,6 mmol/l angehoben werden. Es war auch hier zunächst wieder eine weitgehend stationäre Phase des bakteriellen Wachstums zu beobachten. Erst nach Überschreiten des Schwellenwertes bei einer Konzentration von ca. 0,03 mmol/l reduzierte sich dann die Anzahl an KBE, auch hier nahezu einer linearen Funktion folgend (Abb. 5.1, Tab. 10.7).

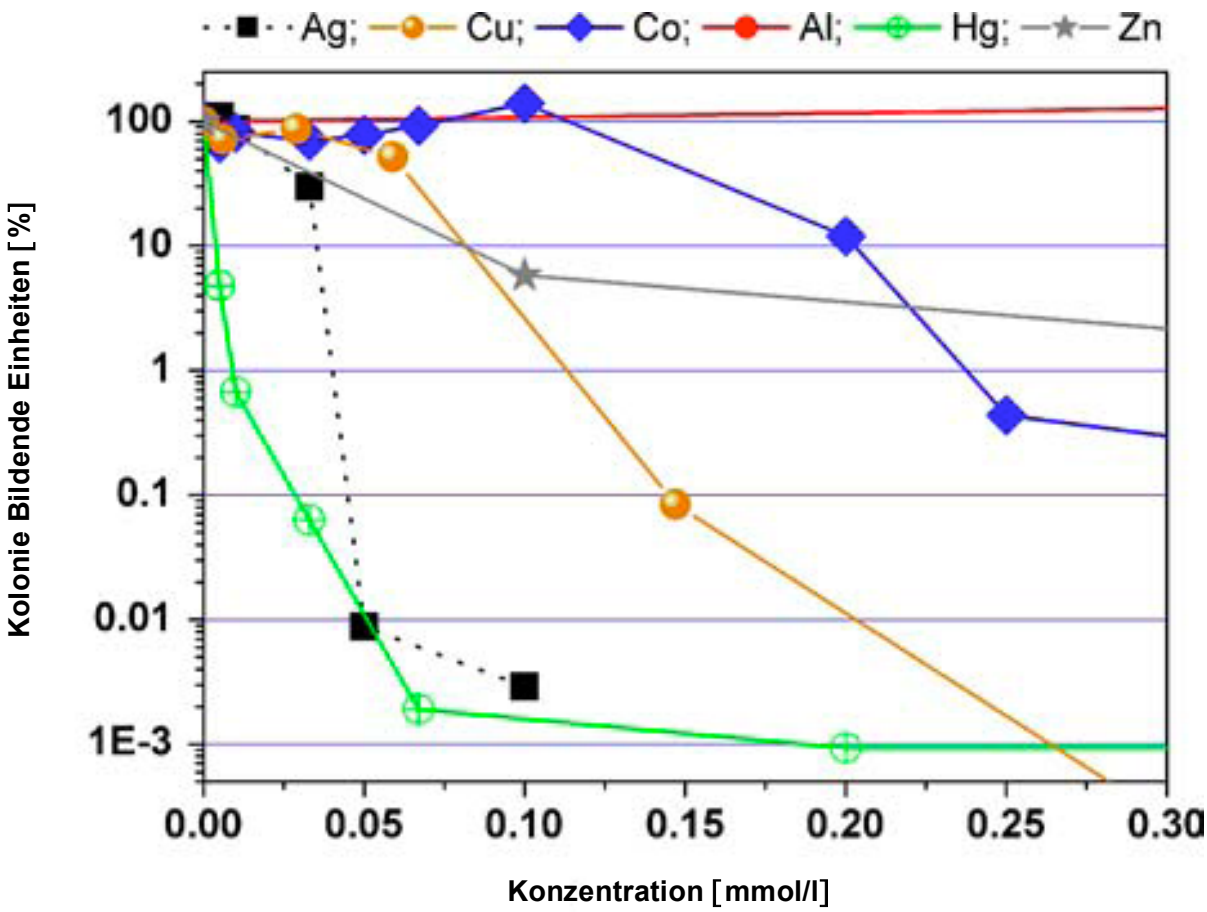

Abbildung 5.1 **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* (ATCC 35984) durch steigende Konzentrationen verschiedener Metallionen**

5.2 Untersuchungen zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Kombination verschiedener Metallionen

In einem weiteren Modell sollte quantitativ die Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 durch eine Kombination verschiedener Metallionen untersucht werden, um einen möglichen synergistischen Effekt zu explorieren. Es wurde hierzu in der Lösung eine Geamtionenkonzentration von 0,2 mmol/l gewählt. Die Zugabe der Ionenlösungen erfolgte wie zuvor durch die Beimengung von 110 µl. Diese 110 µl wurden folglich mit 100 % gleichgesetzt und, entsprechend einer 100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 und 0/100 Verteilung der zwei zu untersuchenden Ionen, der infizierten Nährlösung zugegeben.

5.2.1 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber- und Kupferionen

Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubation wurden auch hier die KBE direkt ausgezählt und notiert (Tab. 5.4). Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten wurden je 6 Versuchsreihen durchgeführt. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

	[KBE]						
Hg+ [%]	**0**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
Cu+ [%]	**100**	**80**	**60**	**50**	**40**	**20**	**0**
Mittelwert	**$5{,}8x10^5$**	**$3{,}0x10^5$**	**$1{,}2x10^5$**	**$6{,}8x10^4$**	**$3{,}3x10^4$**	**$8{,}2x10^3$**	**$2{,}5x10^3$**
Standardabweichung	$2{,}8x10^5$	$2{,}7Ex10^5$	$5{,}3x10^4$	$2{,}5x10^4$	$2{,}1x10^4$	$8{,}2x10^3$	$2{,}7x10^3$

Tabelle 5.4: Direkt ausgezählte KBE von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Quecksilber- und Kupferionen-Kombinationen [%]

Da auch in diesem Modell nach Ablauf der Inkubationszeit in der Nährlösung je 200 µl Inkubationslösung mit 200 µl der Neutralisationslösung versetzt wurden, mussten die direkt ausgezählten KBE zunächst mit 2 multipliziert werden. Im weiteren Verlauf wurden je 100 µl dieser Lösung auf den Müller-Hinton-Agarplatten ausgeimpft und inkubiert. Um folglich auch hier die Konzentration an KBE/ml zu erhalten musste das Ergebnis (KBE/µl) mit dem Faktor 10 multipliziert werden. Auch von diesen Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichungen errechnet (Tab 5.5).

	[KBE/ml]						
Hg+ [%]	**0**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
Cu+ [%]	**100**	**80**	**60**	**50**	**40**	**20**	**0**
Mittelwert	**$1{,}2x10^7$**	**$6{,}0x10^6$**	**$2{,}4x10^6$**	**$1{,}4x10^6$**	**$6{,}6x10^5$**	**$1{,}6x10^5$**	**$4{,}9x10^4$**
Standardabweichung	$5{,}6x10^6$	$5{,}4x10^6$	$1{,}1x10^6$	$5{,}0x10^5$	$4{,}3x10^5$	$1{,}6x10^5$	$5{,}5x10^4$

Tabelle 5.5: Errechnete KBE/ml [KBE/ml] von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unterschiedlicher Quecksilber- und Kupferionen-Kombinationen [%]

Auf eine Errechnung der prozentualen Reduktionsrate wurde in dem Fall der Untersuchungen zur bakteriellen Wachstumshemmung durch Quecksilber- und Kupferionen verzichtet, da keine Kontrolle ohne die Zugabe von Ionen erfolgte, und somit die Referenzgruppe fehlte.

Es konnte kein synergistischer Effekt der beiden hier untersuchten Ionen nachgewiesen werden. Bei Zugabe von ca. 0,02 mmol/l Kupferionen in die infizierte Nährlösung blieb ein antibakterieller Effekt nahezu aus. Bei steigender Konzentration der Quecksilberionen erfolgte die Reduktion des bakteriellen Wachstums weitgehend in dem Bereich der Voruntersuchungen, in denen Quecksilber als einziges antibakterielles Agens verwendet wurde. Ein synergistischer Effekt, also eine stärkere Reduktion des bakteriellen Wachstums, konnte durch die Kombination von Quecksilber- und Kupferionen nicht beobachtet werden (Abb. 5.2, Tab. 10.8).

Die weitere Auswertung der Ergebnisse unter 5.2.2 und 5.2.3 erfolgte analog der oben beschriebenen Auswertung für die bakterielle Wachstumshemmung durch Quecksilber- und Kupferionen (5.2.1).

5.2.2 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber- und Silberionen

Auch hier konnte kein synergistischer Effekt durch die Ionenkombination nachgewiesen werden. Bei Zugabe von ca. 0,02 mmol/l Silberionen in die infizierte Nährlösung stellte sich lediglich eine diskrete Reduktion des bakteriellen Wachstums ein. Bei progredienter Zugabe der antibakteriell potenteren Quecksilberionen erfolgte auch hier die Reduktion des bakteriellen Wachstums weitgehend in dem Bereich der Voruntersuchungen – sowohl der Voruntersuchungen mit Quecksilber als einzigem antibakteriellen Ion, als auch der ersten Synergismus-Testung (Quecksilber/Kupfer)(Abb. 5.2, Tab. 10.9).

5.2.3 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Silber- und Kupferionen

Wie bei den beiden vorangegangenen Untersuchungen konnte auch für diese Ionen-Kombination kein synergistischer Effekt nachgewiesen werden. Bei Zugabe von ca. 0,02 mmol/l Kupferionen in die infizierte Nährlösung blieb ein antibakterieller Effekt erneut nahezu aus, während es durch die Zugabe von Silberionen zu einer diskreten Wachstumsreduktion der Bakterien kam. Auch hier war die beobachtete Reduktion des bakteriellen Wachstums weitgehend in dem Bereich der Voruntersuchungen. Ein synergistischer Effekt, konnte also auch durch die Kombination von Silber- und Kupferionen nicht beobachtet werden (Abb. 5.2, Tab. 10.10).

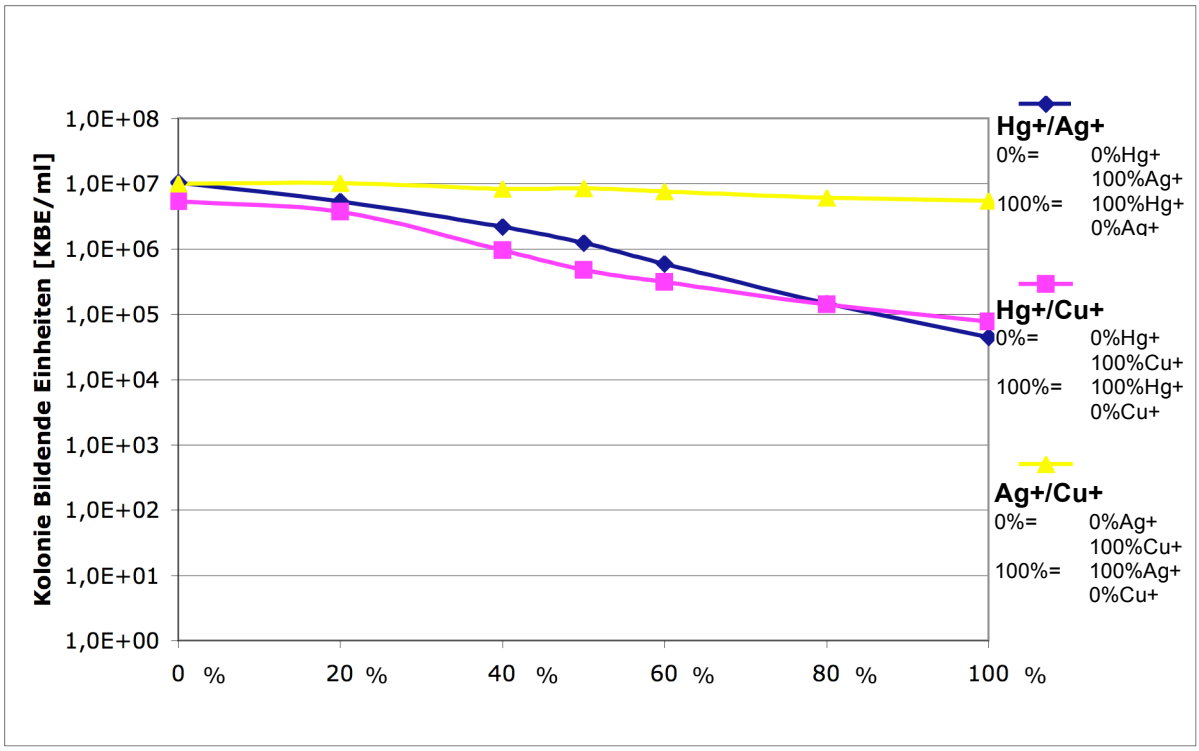

Abbildung 5.2 **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 durch verschiedene Kombinationen von Metallionen**

5.3 Antibakterielle Untersuchungen der TiO_2-Schicht

5.3.1 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640 + 10% FBS über 24 Stunden

In einem weiteren Modellversuch sollte der potentielle antibakterielle Effekt der unterschiedlich beschichteten Metallplättchen untersucht werden. Hierzu wurden nach 24h Inkubation sowohl die an den Plättchen anhaftenden als auch die im Überstand der Nährlösung vorhandenen Bakterien quantifiziert. Bereits makroskopisch fiel nach der Inkubation eine Trübung des infizierten Nährmediums auf, in welchem die unbeschichteten sowie die nur ein- und zweifach mit kupferhaltigen Schichten versehenen Plättchen bebrütet worden waren (Abb. 5.3).

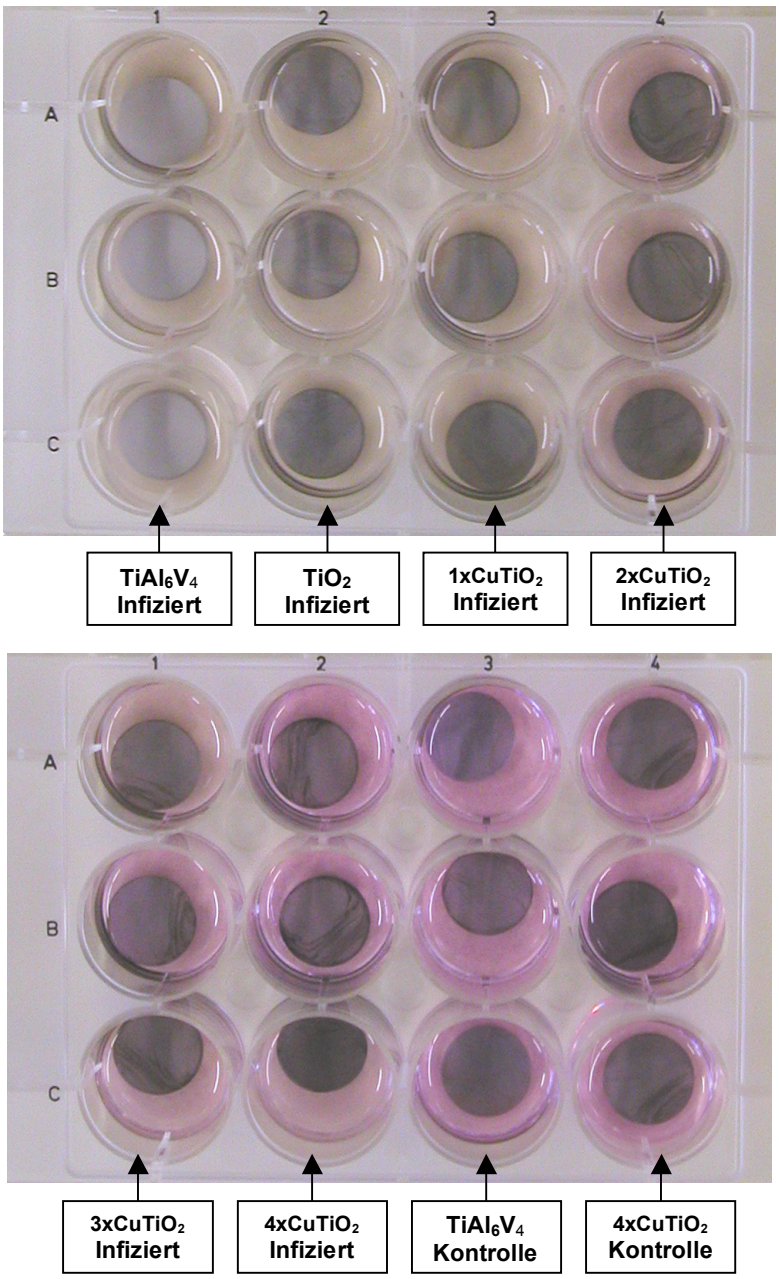

Abbildung 5.3: **Verschieden beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen nach 24h Inkubation in infizierter und keimfreier Nährlösung [*S.aureus* ATTCC 25923/RPMI 1640 + 10% FBS]. Bereits makroskopisch erkennt man die farbliche Veränderung und Trübung des Nährmediums bei den unbeschichteten Plättchen und den Beschichtungen mit niedrigem Kupfergehalt.**

Aus dem Überstand wurden je 200 µl mit je 200 µl der Neutralisationslösung versetzt und im Anschluss in verschiedenen Verdünnungen auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgeimpft und für 24h bebrütet. Die an den Plättchen anhaftenden Bakterien wurden mittels Ultraschall abgelöst und in entsprechenden Verdünnungen auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgeimpft und für 24h bebrütet. Auch hier wurden nach der 24 stündigen Inkubation die KBE direkt ausgezählt und notiert (Tab. 5.6a und b). Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten

wurden erneut je 6 Versuchsreihen durchgeführt. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

(a)

Überstand						
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
	[KBE]					
Mittelwert	**$9{,}8x10^6$**	**$6{,}6x10^6$**	**$1{,}7x10^6$**	**$1{,}6\ x10^5$**	**$1{,}2x10^4$**	**67**
SA	**$6{,}3x10^6$**	**$7{,}4x10^6$**	**$1{,}4x10^6$**	**$2{,}1\ x10^5$**	**$1{,}3x10^4$**	**50**

(b)

Anhaftend						
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
	[KBE]					
Mittelwert	**$3{,}6x10^4$**	**$6{,}6x10^4$**	**$8{,}6x10^3$**	**$4{,}8x10^2$**	**$3{,}3x10^2$**	**0**
SA	**$3{,}4x10^4$**	**$6{,}5x10^4$**	**$9{,}7x10^3$**	**$6{,}2x10^2$**	**$5{,}5x10^2$**	**0**

Tabelle 5.6a und b: Direkt ausgezählte KBE von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung (a) und anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall (b)

Für die Bebrütung der KBE aus dem Überstand wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in der Nährlösung je 200 µl Inkubationslösung mit 200 µl der Neutralisationslösung versetzt. Somit mussten in der Auswertung die direkt ausgezählten KBE zunächst mit 2 multipliziert werden. Im weiteren Verlauf wurden je 100 µl dieser Lösung auf den Müller-Hinton-Agarplatten ausgeimpft und inkubiert. Da es sich hierbei um 100 µl von 1 ml handelt wurde dass Ergebnis weiterhin mit 10 multipliziert um die KBE/ml zu erhalten. Auch von diesen Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichungen errechnet (Tab 5.7a).
Bei den von den Plättchen abgelösten und bebrüteten KBE war das Ziel sie in KBE/cm^2 darzustellen, da sie ja von einer Fläche entfernt wurden. Die Fläche der verwendeten Plättchen betrug jeweils exakt 3,8681 cm^2. Die direkt ausgezählten KBE wurden somit zunächst durch 3,8681 dividiert. In diesem Fall handelte es sich ja um 100 µl aus 10 ml welche auf den Müller-Hinton-Agarplatten bebrütet wurden. Aus diesem Grund wurde das Ergebnis mit 100 multipliziert um die abgelösten KBE/cm^2 zu erhalten. Auch von diesen Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichungen errechnet (Tab 5.7a und b)

(a)

Überstand						
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
	[KBE/ml]					
Mittelwert	**$2x10^8$**	**$1,3x10^8$**	**$3,3x10^7$**	**$3,1x10^6$**	**$2,3x10^5$**	**$1,3x10^3$**
SA	**$1,3x10^8$**	**$1,5x10^8$**	**$2,8x10^7$**	**$4,3x10^6$**	**$2,5x10^5$**	**990**

(b)

Anhaftend						
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
	[KBE/cm^2]					
Mittelwert	**$9,0x10^5$**	**$1,7x10^6$**	**$2,2x10^5$**	**$1,2x10^4$**	**$8,4x10^3$**	**0**
SA	**$8,4x10^5$**	**$1,6x10^6$**	**$2,4x10^5$**	**$1,6x10^4$**	**$1,4x10^4$**	**0**

Tabelle 5.7a und b: Errechnete KBE/ml (a) und KBE/cm^2 (b) von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung (a) und anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall (b)

Ausgehend dieser Werte wurden dann durch Verwendung der nicht parametrischen Methode und der Methode zur Evaluierung von geschlossenen Prüfverfahren [70, S. 655] die Ergebnisse auf statistische Signifikanz geprüft (Kruskal Wallis und Mann-Whitney Test). Als Kontrolle dienten hierbei die unbeschichteten $TiAl_6V_4$ Plättchen. Der Vollständigkeit halber wurden alle Gurppen (I bis VI) gegeneinander statistisch ausgewertet (Tab. 10.13 bis 10.18). Bezüglich des antibakteriellen Effektes auf die sich in der Nährlösung befindenden Bakterien konnte keine signifikante Reduktion durch die TiO_2-Schicht beobachtet werden (p=0,310). Durch die Integration von Kupferionen konnte jedoch eine hochsignifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums im Überstand beobachtet werden (p=0,002). Dies gilt bereits für die 1xCu-TiO_2-Schicht. Der antibakterielle Effekt war allerdings am ausgeprägtesten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht. Bezüglich des antibakteriellen Effekts auf die anhaftenden Bakterien konnte ebenfalls keine statistisch relevante Reduktion durch die reine TiO_2-Schicht beobachtet werden (p=0,394). Eine statistisch signifikante Reduktion durch die 1xCu-TiO_2-Schicht blieb für die abgelösten Bakterien aus (p=0,180). Für alle weiteren mit Kupfer beladenen TiO_2-Beschichtungen konnte dann eine statistisch hochsignifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums nachgewiesen werden (p=0,002). Erneut war die Reduktion am ausgeprägtesten durch die 4xCu-TiO_2-Schicht.

Zur weiteren Interpretation wurden die hieraus errechneten Ergebnisse ebenfalls in eine prozentuale Reduktionsrate der Bakterien durch die jeweiligen Plättchen überführt. Hierzu diente der Mittelwert der Kontrolle ($TiAl_6V_4$) als Referenzwert und wurde mit 100% gleichgesetzt. Anhand dieser Kontrolle wurde für jeden Wert der einzelnen Versuchsreihen die prozentuale Wachstumsreduktion gewonnen. Erneut wurden von diesen Ergebnissen Mittelwert und Standardabweichung errechnet (Tab 5.8a und b, Tab. 10.11 und 10.12) (Abb. 5.4).

(a)

Überstand						
Oberfläche	TiAl6V4	TiO_2	Cu- TiO_2	2xCu- TiO_2	3xCu- TiO_2	4xCu- TiO_2
	[%]					
Mittelwert	100	99	17	1,6	0,12	$6,8x10^{-4}$
SA	64	110	14	2,2	0,13	$5,1x10^{-4}$

(b)

Anhaftend						
Oberfläche	TiAl6V4	TiO_2	Cu- TiO_2	2xCu- TiO_2	3xCu- TiO_2	4xCu- TiO_2
	[%]					
Mittelwert	100	100	24	1,3	0,93	0
SA	93	96	27	1,7	1,5	0

Tabelle 5.8a und b: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung (a) und anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall (b)

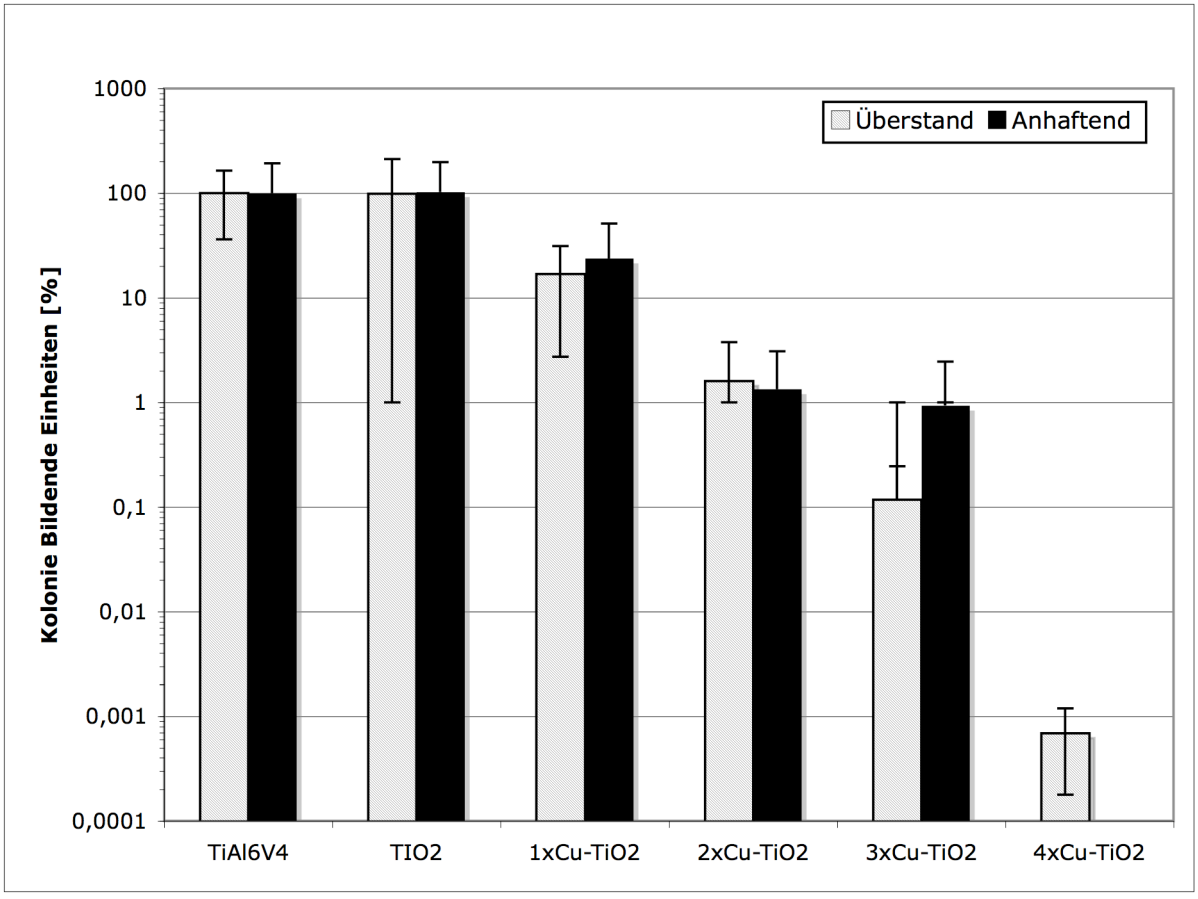

Abbildung 5.4: **Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von RPMI 1640.**

5.3.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in α-MEM + 20 % FBS über 24 Stunden

Da die Versuche an Gewebezellen mit den TiO_2-Plättchen durch das Friedrich-Baur-Institut mit α-MEM + 20% FBS als Nährlösung durchgeführt wurden, erfolgte eigens ebenfalls eine Kontrolle mit demselben Nährmedium. Als Keim diente erneut *S. aureus* ATCC 25923. Die Auswertung erfolgte analog wie unter 5.3.1 beschrieben.

Bezüglich des antibakteriellen Effektes auf die sich in der Nährlösung befindenden Bakterien konnte auch in der α-MEM Nährlösung keine signifikante Reduktion durch die TiO_2-Schicht beobachtet werden ($p=0,093$). Durch die Integration von Kupferionen war jedoch eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums im Überstand zu beobachten ($p<0,05$). Dies galt bereits für die 1xCu-TiO_2-Schicht ($p=0,009$). Der antibakterielle Effekt war allerdings am ausgeprägtesten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht. Bezüglich des antibakteriellen Effekts auf die anhaftenden Bakterien konnte unter Verwendung von α-MEM ebenfalls keine statistisch relevante Reduktion durch die TiO_2-Schicht beobachtet werden ($p=0,699$). Allerdings zeigte sich bei der 1xCu-TiO_2-Schicht eine signifikante Reduktion an KBE, diesmal für die abgelösten Bakterien ($p=0,002$). Für alle weiteren mit Kupfer beladenen TiO_2-Beschichtungen konnte ebenfalls eine statistisch hochsignifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums nachgewiesen werden ($p=0,002$). Erneut war die Reduktion am ausgeprägtesten durch die 4xCu-TiO_2-Schicht (Abb. 5.5, Tab. 10.19 und 10.20). Auch hier wurden der Vollständigkeit halber alle untersuchten Gruppen (I bis VI) gegeneinander auf statistische Signifikanz geprüft (Tab. 10.21 bis 10. 26).

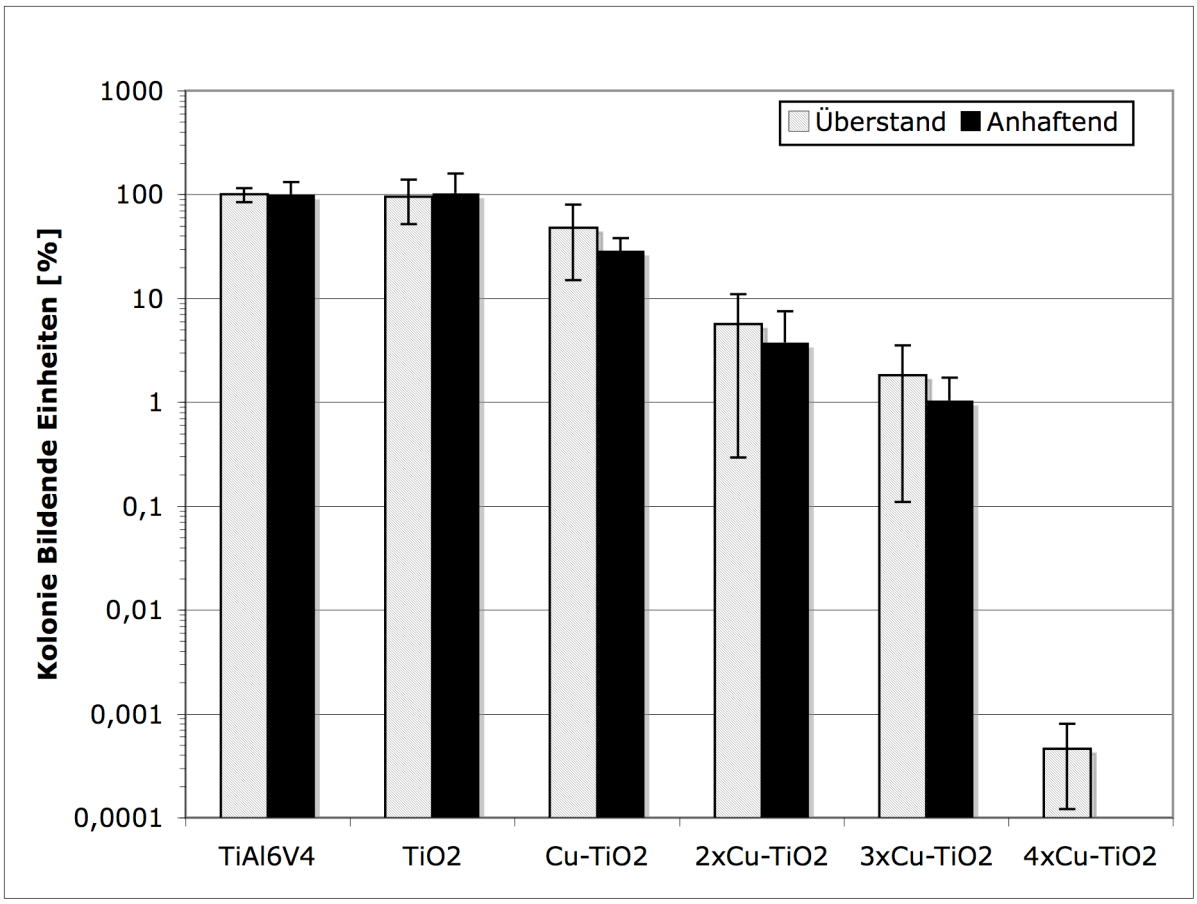

Abbildung 5.5: **Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von α-MEM.**

5.3.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit MRSA 27065 in RPMI 1640 + 10% FBS über 24 Stunden

Um ebenfalls eine Aussage über die Wirksamkeit der antiinfektiösen Beschichtung auf antibiotikaresistente Keime geben zu können, erfolgte die Durchführung einer Versuchsreihe mit einem MRSA Stamm, welcher als Isolat aus einer Implantat-assoziierten Infektion vorlag.

In den Versuchen mit MRSA 27065 konnte ebenfalls durch die TiO_2-Schicht kein antibakterieller Effekt auf die sich in der Nährlösung befindenden Bakterien beobachtet werden ($p=0,485$). Durch die Integration von Kupferionen konnte jedoch auch bei dem untersuchten MRSA eine hochsignifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums im Überstand beobachtet werden ($p=0,002$). Der antibakterielle Effekt war ebenfalls am ausgeprägtesten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht. Bezüglich des antibakteriellen Effekts auf die anhaftenden Bakterien konnte auch für den MRSA 27065 keine statistisch relevante Reduktion durch die TiO_2-Schicht beobachtet werden ($p=0,937$). Allerdings zeigte sich durch die Integration von Kupferionen in die TiO_2-Schicht eine signifikante Reduktion an KBE,

diesmal für die abgelösten Bakterien (p=0,004 für 1xCu-TiO_2 und p=0,009 für 2xCu-TiO_2) Für die 3x- und 4xCu- beladenen TiO_2-Beschichtungen konnte dann eine statistisch signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums nachgewiesen werden (p=0,002). Erneut war die Reduktion am ausgeprägtesten durch die 4xCu-TiO_2-Schicht (Abb. 5.5, Tab. 10.27 und 10.28). Auch hier wurden der Vollständigkeit halber alle untersuchten Gruppen (I bis VI) gegeneinander auf statistische Signifikanz geprüft (Tab. 10.29 bis 10. 34).

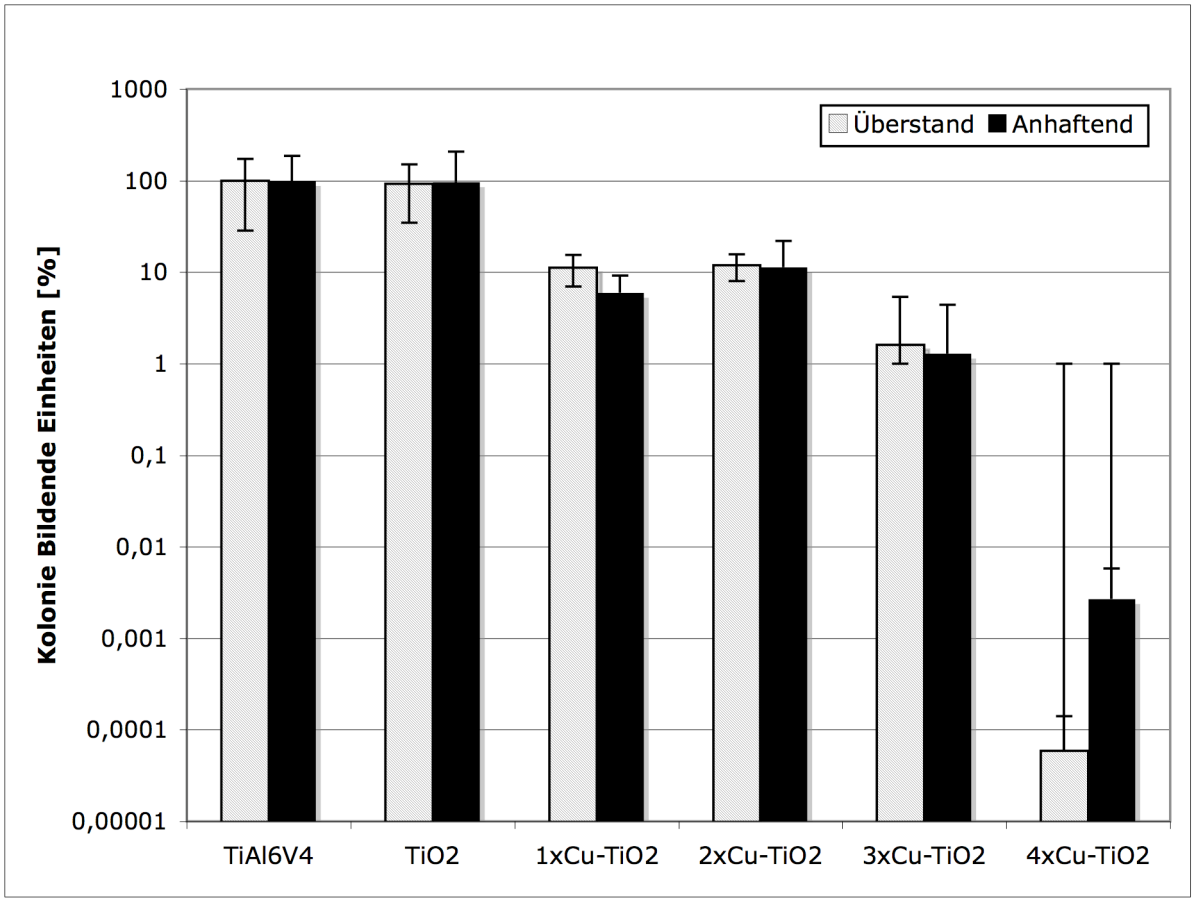

Abbildung 5.6: **Wachstum von *MRSA* 27065 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von RPMI 1640.**

5.3.3 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640 +10% FBS über 7 Tage

Um die Dauer des antibakteriellen Effekts der TiO_2-Beschichtungen nachzuweisen wurde ein Versuch mit *S. aureus* ATCC 25923 über 7 Tage durchgeführt. Hier wurde zunächst nach einer 24-stündigen Inkubation das Nährmedium gewechselt und wie beschrieben ausgeimpft und ausgewertet. Im Weiteren erfolgte ein analoges Vorgehen jeweils nach 48 Stunden. Nach insgesamt 7-tägiger Inkubation wurde der Versuch geplant beendet und die

adhärenten Bakterien abgelöst und ausgeimpft sowie die Bakterien aus dem Überstand ausgeimpft.

Die Ergebnisse bezüglich des antibakteriellen Effektes auf die sich in der Nährlösung befindenden Bakterien nach 24-stündiger Inkubation entsprachen weitgehend den vorher gewonnenen Erkenntnissen. Es konnte keine signifikante Reduktion durch die TiO_2-Schicht beobachtet werden (p=0,818). Durch die Integration von Kupferionen trat jedoch eine hochsignifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums im Überstand auf (p=0,002). Dies gilt bereits für die 1xCu-TiO_2-Schicht (p=0,002). Der antibakterielle Effekt war am ausgeprägtesten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht. Nach insgesamt 72-stündiger Inkubation war weiterhin keine Reduktion des bakteriellen Wachstums durch die TiO_2-Schicht zu verzeichnen (p=0,180). Auch die antibakterielle Wirksamkeit der 1xCu-TiO_2-Schicht war nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar (p=0,310). Alle weiteren mit Kupfer beladenen TiO_2-Schichten (2xCu-, 3xCu- und 4xCu-TiO_2) exprimierten weiterhin einen signifikanten antibakteriellen Effekt (p<0,05). Nach 120-stündiger Inkubation verloren nun auch die 2x-Cu- und die 3xCu- TiO_2-Schicht ihren antibakteriellen Effekt (p=0,818 respektive p=0,394). Nur für die 4xCu-TiO_2-Schicht war noch ein antibakterieller Effekt nach 120-stündiger Inkubation nachweisbar, allerdings ebenfalls ohne statistische Signifikanz (P=0,065) (Abb. 5.7, Abb. 5.8, Tab. 10.37). Nach insgesamt 7-tägiger Inkubation wurde der Versuch dann geplant beendet. Nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit konnte für keine mit Kupfer beladene TiO_2-Schicht mehr eine Reduktion des bakteriellen Wachstums beobachtet werden. Im Gegenteil kam es sogar bei den 1xCu- und 2xCu-TiO_2-Schichten zu einer Überwucherung an Bakterien im Nährmedium von statistischer Signifikanz (p=0,009 respektive p=0,041) (Abb.5.7, Tab. 10.48). Bezüglich des antibakteriellen Effekts auf die anhaftenden Bakterien konnte nach Beendigung des Versuches ebenfalls keine statistisch relevante Reduktion durch die TiO_2-Schicht oder die Kupfer beladenen TiO_2-Schichten beobachtet werden [TiO_2 (p=1), 1xCu-TiO_2 (p=0,937), 2xCu-TiO_2 (p=0,818), 3xCu-TiO_2 (p=0,818) und 4xCu-TiO_2 (p=0,818)] (Abb. 5.9, Tab. 10.35 bis 10.38, Tab. 10.51). Auch hier wurden der Vollständigkeit halber alle untersuchten Gruppen (I bis VI) zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten (Tag 1, 3, 5 und 7 im Überstand, Tag 7 adhärente Bakterien) gegeneinander auf statistische Signifikanz geprüft (Tab. 10.39 bis 10. 50, Tab. 10.52 bis 10.54).

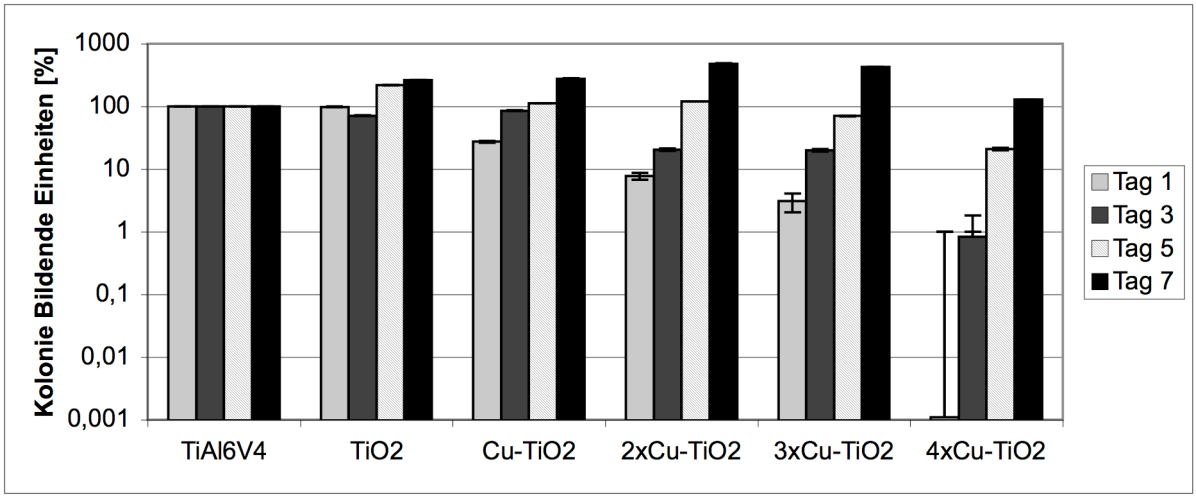

Abbildung 5.7 **Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 im Überstand von RPMI 1640 + 10% FBS nach 24h, 72h, 120h und 168h**

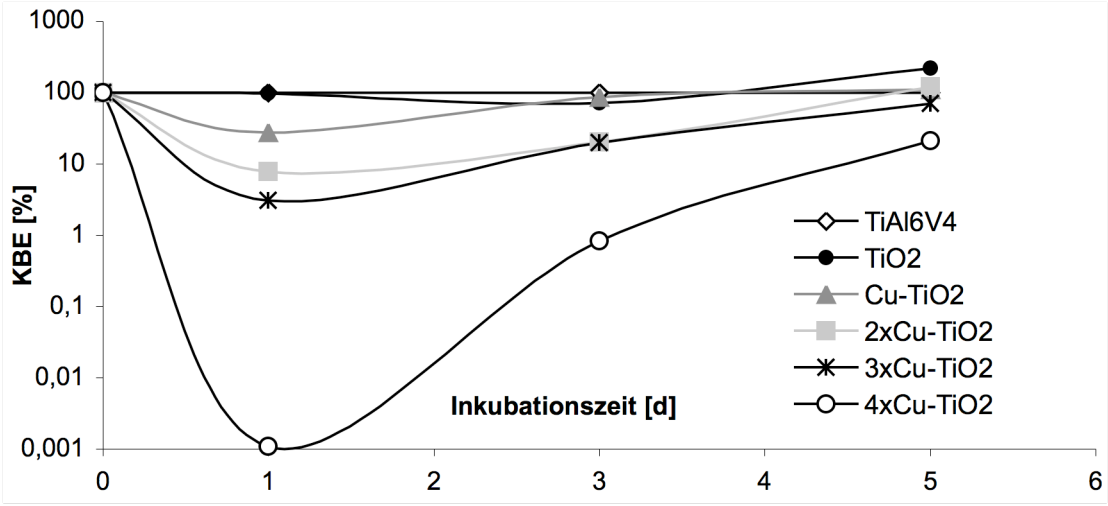

Abbildung 5.8 **Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 im Überstand von RPMI 1640 + 10% FBS nach 1, 3, und 5 Tagen [d]**

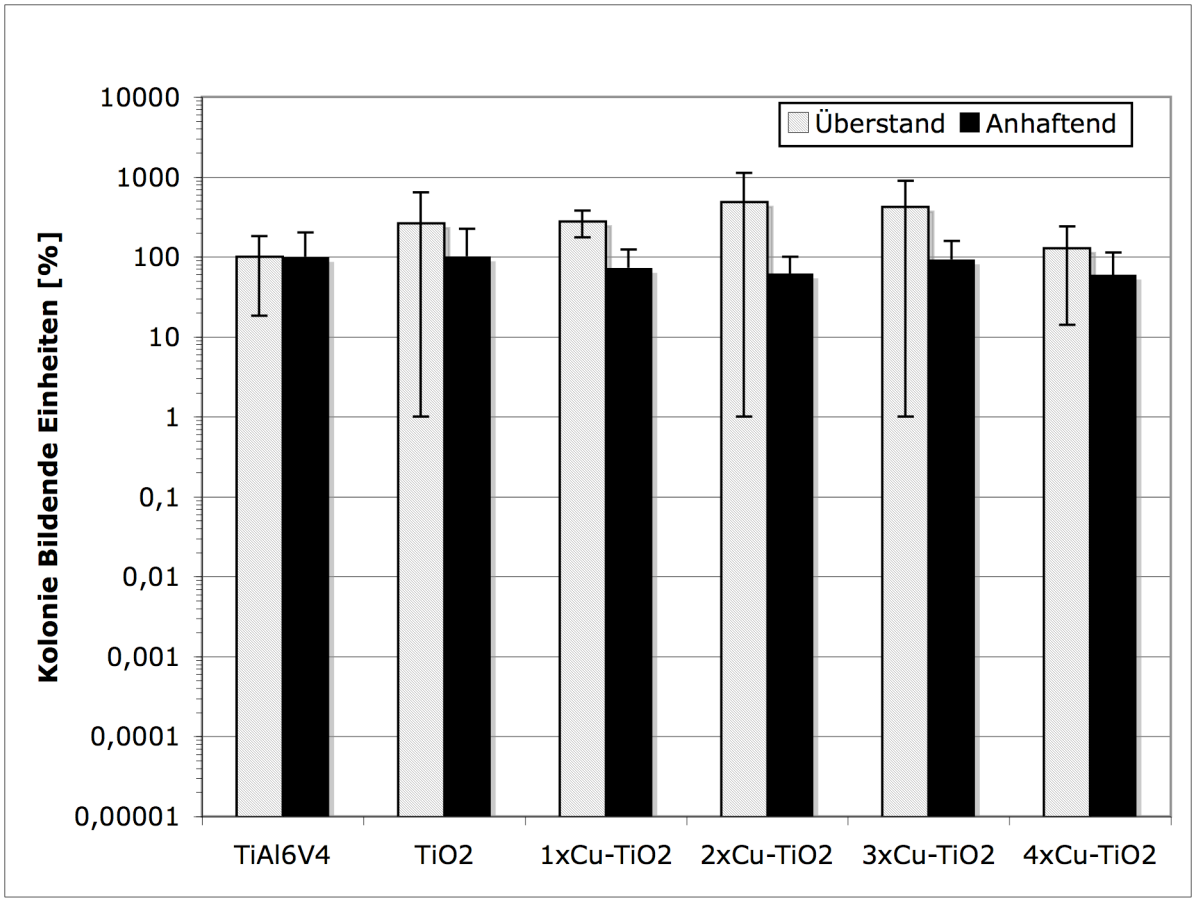

Abbildung 5.9 **Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAlV_6$-Plättchen sowie im Überstand von RPMI 1640 nach 7-tägiger Inkubation.**

6. Diskussion

Eine Vielzahl unterschiedlicher Ansätze zur Entwicklung antiinfektiöser Oberflächenbeschichtungen wurde in der Vergangenheit vorgestellt. Ein Teil findet heute auch im klinischen Alltag Anwendung. Meist unterscheiden sich die Implantate im Bezug auf die Trägersubstanz, die Beschichtungstechnologie sowie das antibakterielle Agens. Bei der vorliegenden Oberflächenbeschichtung handelt es sich um eine keramische Titan(II)oxid-Schicht, welche im Sol-Gel-Verfahren appliziert wird. Als antibiotisches Agens wurden Kupferionen verwendet, deren antibiotische Wirksamkeit seit langem bekannt ist. Im Weiteren wurden verschiedene Ionen bezüglich Ihrer antibakteriellen Potenz sowie eines möglichen synergistischen Effekts getestet. Die mikrobiologischen Tests wurden allesamt eigenständig in Kooperation mit dem Institut für Klinikhygiene der Technischen Universität München ausgeführt. Die Durchführung der Versuche zur Zytokompatibilität der verwendeten Titanoxidschicht sowie der Effekt verschiedener Metallionen auf Gewebezellen erfolgte in Kooperation durch das Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien.

In der vorliegenden Arbeit galt es, verschiedene Metallionen, verschiedene Metallionen-Kombinationen, sowie eine neuartige keramische Titan(II)oxid-Schicht für medizinische Implantate auf ihre antibakterielle Potenz und Zytokompatibilität zu untersuchen.

6.1 Diskussion der Methode

6.1.1 Mikrobiologische Testverfahren

Die Hauptvoraussetzung zur *in vitro* Untersuchung der bakteriellen Besiedelung von Implantaten ist eine möglichst präzise und quantitative Erfassung der oberflächenadhärenten Mikroorganismen. Der hierbei ablaufende Besiedlungsprozess an medizinischen Implantaten wurde bereits unter 2.1 ausführlich erläutert.

Diesen Besiedlungsprozess kann man im Laborversuch aufgrund der Komplexität nicht als Ganzes untersuchen, sondern man muss die einzelnen Phasen separat beurteilen. Dies muss insbesondere bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Der Besiedlungsprozess als solches stellt dabei einen Zyklus dar, in dem jede Phase von der vorherigen Phase abhängig ist [16, S. 481].

Bei mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich der Besiedelung von Biomaterialien werden in der Regel Antworten auf folgende grundlegenden Fragen gesucht:

- Wie ist die Fähigkeit eines standardisierten Bakterienstammes bzw. Referenzkeimes, unterschiedliche Substrate unter standardisierten Bedingungen zu besiedeln?
- Wie ist die Fähigkeit eines standardisierten Bakterien Stammes ein standardisiertes Substrat unter unterschiedlichen Bedingungen zu besiedeln?
- Wie ist die relative Fähigkeit unterschiedlicher Bakterien Stämme standardisierte Substrate unter standardisierten Bedingungen zu besiedeln?

- Wie ist die Überlebens- und Proliferationsrate von Mikroorganismen an einer Substratoberfläche, insbesondere wenn die Mikroorganismen einem potenziell schädlichen Agens gegenüber stehen?

Hierbei entsprechen bzw. reflektieren die vier grundlegenden Fragestellungen auch die vier Grundelemente der mikrobiologischen Besiedlung: Substrat, Nährmedium, Mikroorganismus und Zeit [16, S. 481].

Die systematische Untersuchung dieser Grundelemente setzt also voraus, dass die jeweils anderen Faktoren exakt kontrolliert und konstant gehalten werden. Eine wichtige Variable des Substrates sind beispielsweise dessen dreidimensionale Struktur, chemische Zusammensetzung und physikalisch-chemische Eigenschaften. Die mikrobiologische Besiedlung des Substrates stellt dabei eine Funktion der Oberfläche, der geometrischen Form und der Rauheit dar [16, S. 482]. Die beiden Hauptkriterien hinsichtlich des Nährmediums sind die Zusammensetzung sowie die Flusseigenschaften über das Substrat. Wichtige Parameter der Zusammensetzung des Nährmediums wiederum beziehen sich auf die gelösten Materialien, d.h. vorwiegend Ionen und pH-Wert, Chelatkomplexe, Proteine, Detergentien und Gase. Elektrolyte, insbesondere multivalente Kationen, können eine Adhäsion triggern, indem sie eine Querverbindung zwischen bakterieller Zellwand und Substrat schaffen. Außerdem kann die Elektrolytkonzentration Einfluss auf den pH-Wert des Nährmediums nehmen, so dass ein pH-Optimum über- oder unterschritten wird. Detergentien können die Oberflächenspannung dahingehend beeinflussen, dass durch van der Waals Kräfte abstoßende Kräfte zwischen Substrat und Bakterium wirken. Um den Durchsatz an anorganischen Materialien so gering wie möglich zu halten, sollte auf komplexe sowie mit Proteinen angereicherte Nährmedien verzichtet werden [16, S. 484].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Toxizität verschiedener Metallionen auf Bakterien untersucht. Es wurden in der Literatur eine Reihe an Faktoren beschrieben, die den toxischen Effekt von Metallionen auf Bakterien unter Laborbedingungen beeinflussen, was dann wiederum dazu führen kann, dass Bakterien höhere Konzentrationen eines potenziell toxischen Ions in einem organischen Nährmedium tolerieren [53, S. 254]. Zur Untersuchung der toxischen Wirkung von Metallionen auf Bakterien werden somit gänzlich definierte, synthetische Nährmedien empfohlen. Dennoch können auch anorganische Salze vor der toxischen Wirkung der Ionen schützen [53, S. 254]. Wenn die Versuche durchgeführt werden, müssen ferner Pufferlösungen, wie beispielsweise Thioglycolacetat-thiosulphat Neutralisationslösung von Tilton und Rosenberg [107, S. 1116] zur Neutralisation von Silberionen beschrieben, rechtzeitig und in ausreichenden Mengen vorhanden sein um weitere reminiszent wirkende Effekte der Ionen abzustoppen.

Obwohl die Wahl eines geeigneten Keims einfach erscheint, handelt es sich gerade hierbei um eine komplexe, nahezu nicht kontrollierbare Variable. Der Einfachheit halber betrachtet man in mikrobiologischen Protokollen Testkulturen als unveränderliche Einheiten. Hierbei

wird jedoch nicht berücksichtigt, dass es sich bei mikrobiologischen Kulturen um asynchrone, transiente Populationen handelt. Dabei können verschiedene Phänotypen expremiert werden [16, S. 485]. Gerade bei Organismen die Oberflächen besiedeln können sowohl adhäsive als auch nicht-adhäsive Phänotypen auftreten, weil sessile Lebensformen in ihrem Lebenszyklus eine planktonische Phase enthalten [16, S. 485, 28, S. 1865]. Da verschiedene Experimente immer zu verschiedenen Zeiten durchgeführt werden, ist es nahezu unmöglich die Reproduzierbarkeit verschiedener vorbereiteter Kulturen von Mikroorganismen zu gewährleisten. Unter ähnlichen bzw. gleichen Testbedingungen ist jedoch die Kolonialisierungsfähigkeit verschiedener Bakterienstämme relativ gut prognostizierbar [16, S. 486]. Der Untersucher muss hierbei trotzdem eine breite Variabilität der Ergebnisse tolerieren. Man kann dies durch identische Versuchsbedingungen hinsichtlich Vermehrung, Aberntung sowie Aufbewahrung der Kulturen limitieren, indem in equivalenten Experimenten gleichsinnig vorbereitete Testorganismen verwendet werden. Um die Reproduzierbarkeit auch in anderen Laboratorien zu gewährleisten, empfiehlt es sich die Untersuchungen nicht nur mit Labor eigenen Keimen durchzuführen, sondern mit ausgiebig untersuchten Standard- bzw. Referenzkeimen zu arbeiten [16, S. 486] (Tab. 6.1).

Referenzkeime zur Untersuchung der Oberflächenbesiedelung [16]		
Keim[a]	**Spezies**	**Eigenschaften**
RP62A (ATCC 35984)	*S. epidermidis*	Schleimbildner in Tryptic Soy Brooth (TSB), zeigt unterschiedliche Phasen der Schleimbildung
RP12 (ATCC 35983)	*S. epidermidis*	Schleimbildner in TSB, nicht in glukosearmer TSB
ATCC 12228	*S. epidermidis*	Referenzkeim für Antibiotikaempfindlichkeit
ATCC 14990	*S.epidermidis*	
RP14 (ATCC 35981)	*S. hominis*	Besiedelt aber proliferiert nicht in glukosearmer TSB
SP2 (ATCC 35982)	*S. hominis*	Bildet keinen Schleim in TSB
Cowan 1 (ATCC 12598, NCTC 8530)	*S. aureus*	Bindet Immunglobuline, Fibronektin und Fibrinogen
ATCC 25923	*S. aureus*	Internationaler Referenzkeim für Antibiotikaempfindlichkeit
ATCC 25922	*E. coli*	Internationaler Referenzkeim für Antibiotikaempfindlichkeit
ATCC 8739	*E. coli*	Referenzkeim zur Testung von Konservierungsmitteln
NCMB 2021	*Pseudomonas*	Meeresorganismus, besiedelt Kunststoffe
Medeiros (ATCC 27853, NCTC 10662)	*P. aeruginosa*	Internationaler Referenzkeim für Antibiotikaempfindlichkeit

[a]ATCC, American Tissue Culture Collection (Rockville, USA); NCTC, National Collection of Type Cultures (London, England); NCMB, National Collection of Marine Bacteria (Aberdeen, Schotland)

Tabelle 6.1: Referenzkeime zur Untersuchung der Oberflächenbesiedelung (nach Christensen et al.: [16])

Hinsichtlich des Zeitpunkts der Besiedlung unterscheidet man zwischen der Adhäsion als Frühphase der Besiedelung, der Besiedlung selbst, und der darauf folgenden Akkumulation (z.B. Koloniebildung oder Schleimbildung). Experimente, die die Adhäsion untersuchen, müssen generell mit dichten mikrobiologischen Suspensionen (10^6 - 10^8 KBE/ml) und kurzen Inkubationszeiten (5 min. bis 2 Std.) unter nicht-nährenden Bedingungen (Puffer, Temperatur 0° bis 4°C) arbeiten. Versuche welche die Proliferationsrate und Überlebensrate untersuchen, sollten niedrige Inokula (10^1 bis 10^6 KBE/ml), lange Inkubationszeiten (> 6 Std.) und nährende Bedingungen (flüssiges Nährmedium, Temperatur 20° bis 37°C) aufweisen [16, S. 488]. Gemäß jeweiligem Versuchsprotokoll erfolgt dann die Quantifizierung der anhaftenden Keime entweder direkt, über eine Zählmethode abgelöster Keime oder indirekt über den Nachweis biologischer Produkte. Christensen et al. [16, S. 477] haben die spezifischen Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode zusammengefasst [16, S. 489] (Tab. 6.2).

Experimentelle Ansätze zur Quantifizierung von Mikroorganismen auf Oberflächen [16]			
Methode	**Vorteile**	**Einschränkungen**	**Einsatzmöglichkeiten[a]**
Direkte Beobachtung	**Direkte Visualisierung, breite Anwendbarkeit, *in situ***	**Arbeitsintensiv, breite Streuung der Ergebnisse, zerstört Lebensformen, geringe Sensitivität**	
Lichtmikroskop	Kostengünstig, einfache Methode, zweckdienlich	Langwierig, geringe Sensitivität, benötigt durchsichtige Materialien	Hauptsächlich: 1, 2
REM	Visualisierung genauer Strukturdetails	Benötigt spezialisierte Ausrüstung, langwierig	Hauptsächlich: 1, 2, 4
Radioaktive Markierung	**Sensitiv, breite Anwendbarkeit, *in situ***	**Indirekte Zählmethode, benötigt spezialisierte Ausrüstung und gefährliche Materialien, limitiert durch Adhäsion**	Hauptsächlich: 1, 2
Zählung lebender abgelöster Organismen	**Direkte Zählmethode**	**Paradoxer Ansatz zur Kolonisationsbestimmung**	
Ausrollmethode	Kostengünstig, einfache Methode, zweckdienlich	Anwendungsbeschränkung auf Katheter und Stäbe, ungenau, breite Streuung der Ergebnisse, keine Berücksichtigung von Hohlräumen	Geringfügig: 1, 2, 3, 4
Ultraschallablösung	Genau, sensitiv, breite Anwendbarkeit	Benötigt spezialisierte Ausrüstung, langwierig	Hauptsächlich: 1, 2, 3, 4
Gefärbte Biofilme	**Kostengünstig, *in situ***	**Indirekt, geringe Sensitivität**	
„Tube method“	Kostengünstig, einfache Methode	Geringe Sensitivität, unverlässliche qualitative Ergebnisse, beschränkt auf Teströhrchen	Hauptsächlich: 3 Geringfügig: 1, 2, 4
Mikrotiterplattenmethode	Kostengünstig, zweckdienlich, verlässlich	Benötigt spezialisierte Ausrüstung, Anwendungsbeschränkung durch 96-Well Mikrotiter- und Zellkulturplatten, geringe Sensitivität	Hauptsächlich: 2, 3 Geringfügig: 1, 4
Untersuchung biologischer Produkte	***In situ,* breite Anwendbarkeit, zweckdienlich**	**Indirekt, geringe Sensitivität, benötigt spezialisierte Ausrüstung und Reagenzien**	Hauptsächlich: 1, 2, 4 Geringfügig: 3

[a] Einsatzmöglichkeiten beziehen sich auf die folgenden: (1) Besiedlung von Standardorganismen unter Standardbedingungen an unterschiedlichen Substraten. (2) Besiedlung von Standardorganismen an einem Standardsubstrat bei unterschiedlichen Bedingungen. (3) Besiedlung unterschiedlicher Organismen an Standardsubstraten unter Standardbedingungen. (4) Multiplikation und Überleben (unter ungünstigen Bedingungen) eines kolonisierenden Stammes auf ein Substrat

Tabelle 6.2: Experimentelle Ansätze zur Quantifizierung von Mikroorganismen auf Oberflächen (nach Christensen et al. [16])

6.1.2 Bestimmung der antibakteriellen Potenz einzelner Metallionen und Kombinationen von Metallionen

Wie ausführlich unter 4.2. beschrieben, erfolgte die Anzüchtung der Bakterienkulturen streng nach einem Modell von Christensen et al. [16, S. 477], wobei auch die Wahl des Nährmediums (RPMI 1640+10% FBS) den durch Christenssen et al. [16, S. 483] definierten Anforderungen an ein Nährmedium entsprach. Es kann jedoch argumentiert werden dass es sich bei den Versuchen um Vorversuche zur medizinischen Anwendung am Menschen handelt und somit die Wahl eines humanen AB Serums als Zugabe zu favorisieren gewesen wäre. Mit dem zur Durchführung der Versuche verwendeten Keims (*S.epidermidis* ATCC

35984) wurde ein Erreger gewählt, welcher häufig im Zusammenhang mit Implantat-assoziierten Infektionen steht und somit als geeignet erscheint. Im weiteren Verlauf erfolgte die einfache Ausimpfung, Bebrütung mit abschließender Auszählung der KBE. Aufgrund der gewählten Inkubationszeit von 24 Stunden auf den Agarplatten ist es theoretisch möglich das so nur subletal geschädigte Keime nicht ausreichend Zeit zur Proliferation hatten und somit nicht erfasst wurden.

6.1.3 Antibakterielle Untersuchungen der verschiedenen Oberflächenmodifikationen

6.1.3.1 Adhäsions-/Proliferationsversuche über 24 Stunden

Die Anlieferung der Titanplättchen durch das Friedrich-Baur-Institut erfolgte nach Herstellung unsteril. Vor Beginn der Versuche wurden die erhaltenen Plättchen unter einer Sicherheitswerkbank UV-sterilisiert. Bei keinem der Versuche konnte in der Folge eine Kontamination der Plättchen beobachtet werden, so dass von einer ausreichenden Sterilisation ausgegangen werden kann. Ferner war der in der Literatur beschriebene und zur Desinfektion von Wasser genutzte Photokatalytische Effekt von Titanoxid (unter UV-Bestrahlung) zu beachten. Da jedoch die Ergebnisse mit $TiAl_6V_4$ und der reinen TiO_2-Beschichtung keinen signifikanten Unterschied in der bakteriellen Besiedelung erbrachten, kann davon ausgegangen werden, dass unter den gewählten Versuchbedingungen kein wesentlicher Photokatalytischer Effekt vorlag. Ob eine Optimierung der antibakteriellen Wirkung durch Photokatalyse erreicht werden kann, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Als Keime zur Untersuchung dienten der Internationale Referenzkeim *S.aureus* ATCC 25923 und *S.aureus* MRSA 27065, welche häufig in Verbindung mit Implantat-assoziierten Infektionen stehen. Bereits durch Vorversuche wurden Toxizitätsuntersuchungen unter Verwendung des Keims *S. aureus* ATCC 25923 und verschiedenen Ionen und Konzentrationen durchgeführt. Der Vergleich der antibakteriellen Potenz der Titanoxidbeschichtung wurde anhand Auszählung der KBE, zum einen direkt aus der Nährlösung, zum anderen der adhärenten Keime nach Ablösung durch Ultraschall im Flüssigkeitsbad durchgeführt. Bei dem Verfahren der Ultraschallablösung zur Auszählung der KBE handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, welches als genau und sensitiv beschrieben wurde [16, S. 489], und auch in der Arbeitsgruppe so bereits validiert wurde [29, S. 585]. Es ist jedoch bekannt, dass Bakterien unter bestimmten Nährbedingungen einen so genannten „viable but nonculturable (VBNC)“ Zustand annehmen, also eine lebensfähige Zellform ausbilden, die sich aber in einem nicht mehr kultivierbaren Ruhestadium befindenden [114, S. 1750, 118, S. 313]. Solche VBNC Bakterien können selbstverständlich durch die durchgeführten Versuche nicht erfasst werden. Die oberflächenadhärenten Keime können unabhängig von ihrer Vitalität mittels radioaktiver Markierung erfasst werden. Eine Kombination der radioaktiven Markierung mit der Ablösung und Kultivierung kann somit einen genaueren Überblick über die Oberflächenbesiedelung durch Bakterien liefern [29, S.

588]. Mit der beschriebenen Methode wurden also ausschließlich die adhärenten und im Überstand fluktuierenden Bakterien erfasst, nicht jedoch die adhärenten und nicht kultivierbaren Keime, was jedoch für eine grundlegende Interpretation völlig ausreicht.

6.1.3.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640+10% FBS über 7 Tage

Für den Adhäsions-/Proliferationsversuch über 7 Tage gilt im Besonderem, dass die Auswertung der adhärenten Bakterien lediglich nach Abschluss der Untersuchungen erfolgte. Zusätzlich hätte eine Quantifizierung der adhärenten Bakterien ebenfalls nach 24, 72 und 120 Stunden erfolgen können, um Aussagen über die bakterielle Adhärenz nach diesen Zeitpunkten zu gewinnen.

Der Wechsel der jeweiligen infizierten Nährlösungen nach 24, 72 und 120 Stunden erscheint sinnvoll, besonders im Hinblick darauf, das eine 7-tägige Inkubation bei 37° in 1ml Nährlösung die nahezu vollständige Kondensation der Flüssigkeit zur Folge gehabt hätte. Auch *in vivo* ist von einer gewissen Veränderung der Gewebsflüssigkeit in einer Zeitspanne von 7 Tagen mit Diffusion von Ionen auszugehen.

Alternativ könnte die verbliebene antibakterielle Wirksamkeit der Oberflächenbeschichtung nach Elution der Kupferionen über verschiedene Zeiträume in sterilen Medien untersucht werden, und so indirekt eine Aussage über die Freisetzungskinetik der Ionen getroffen werden. Weitere Untersuchungen sind hier aus materialwissenschaftlicher und mikrobiologischer Sicht notwendig.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Wachstumshemmung durch Metallionen

6.2.1.1 Antibakterielle Potenzen einzelner Metallionen

Die Wachstumshemmkurven der *S. epidermidis* Kulturen zeigten wesentliche Unterschiede bezüglich der Potenz der verschiedenen verwendeten Metallionen. Die stärkste antibakterielle Potenz konnte für Quecksilber nachgewiesen werden. In absteigender Reihenfolge zeigten Silber, Kupfer, Kobalt und respektive Zink antibakterielle Potenzen. Die niedrigste antibakterielle Potenz der untersuchten Metallionen zeigte Aluminium. Generell wurde darauf geachtet, dass durch jedes verwendete Agens eine komplette Sterilisation erreicht wurde. Eine Sterilisation wurde hierbei als „eine Maßnahme, die eine völlige Keimfreiheit bezweckt“ definiert [51, S. 1503]. Nach dem Deutschen Arzneibuch bedeutet Sterilisation „Abtöten oder Entfernen aller lebensfähigen Vegetativ- und Dauerformen von pathogenen und apathogenen Mikroorganismen in Stoffen, Zubereitungen oder Gegenständen“ [51, S. 1503]. Um diese Sterilisation zu erreichen, musste allerdings bei den deutlich unterschiedlichen antibakteriellen Potenzen der einzelnen Metallionen von der ursprünglich gewählten Ausgangskonzentration von 20 mmol/l bzw. ca. 0,2 mmol in der Nährlösung, zum Teil im gravierenden Maße abgewichen werden. Für Kobalt war eine

Konzentration in der untersuchten Nährlösung von ca. 0,4 mmol/l zur Sterilisation von *S. epidermidis* notwendig, für Zink sogar ca. 10 mmol/l und für Aluminium sogar fast 20 mmol/l. Für alle untersuchten Metallionen gilt jedoch, dass die Bakterien zu Beginn ein weitgehend stationäres Wachstumsplateau gegenüber dem potentiell toxischen Agens zeigten, d.h. niedrige Metallionenkonzentrationen wurden durch die Bakterien toleriert. Erst wenn eine Schwellenkonzentration überschritten wurde, zeigte sich durch einen weiteren Konzentrationsanstieg der Ionen eine Reduktion im bakteriellen Wachstum.

Ferner zeigten die Ergebnisse, das nicht-essentielle Ionen nicht zwangsläufig einen toxischeren Effekt auf bakterielle Zellen haben als essentielle Ionen. Zwar handelt es sich bei den beiden toxischsten Agentien Quecksilber und Silber um nicht-essentielle Ionen, aber auch das Metallion mit der geringsten antibakteriellen Potenz, Aluminium, ist ein nicht-essentielles Ion. Die essentiellen Ionen Kupfer, Kobalt und Zink finden sich bezüglich der antibakteriellen Potenz in der Mitte der Wachstumshemmkurve. Überraschend scheinen auch die relativ schwachen antibakteriellen Eigenschaften von Zink, welches ja in der Medizin bei desinfizierenden Verbänden Anwendung findet.

6.2.1.2 Wachstumshemmung von Gewebezellen durch Metallionen

Um die gewonnenen Ergebnisse der antibakteriellen Potenz verschiedener Metallionen mit zytotoxischen Wirkungen auf Gewebezellen vergleichen zu können, wurden korrespondierende Untersuchungen unter exakt äquivalenten Versuchbedingungen (Zellzahl, Nährmedium, Temperatur, Inkubationsdauer, etc.) an L929 Fibroblasten durch das Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth durchgeführt.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass ein Anstieg der Metallionen Konzentration zu einer verminderten zellulären Proliferationsrate der L929 Fibroblasten führte. Lediglich für das essentielle Ion Zink war bis zu einer Konzentration von 0,002 mmol/l eine leichte Steigerung der fibroblastären Proliferationsrate zu beobachten. Quecksilber und Silber zeigten einen ähnlich zytotoxischen Effekt. Gefolgt wurde dieser von Zink und respektive Kobalt. Kupfer hingegen zeigte einen relativ schwach zytotoxischen Effekt in geringen Konzentrationen. Die geringste zytotoxische Potenz besitzt Aluminium.

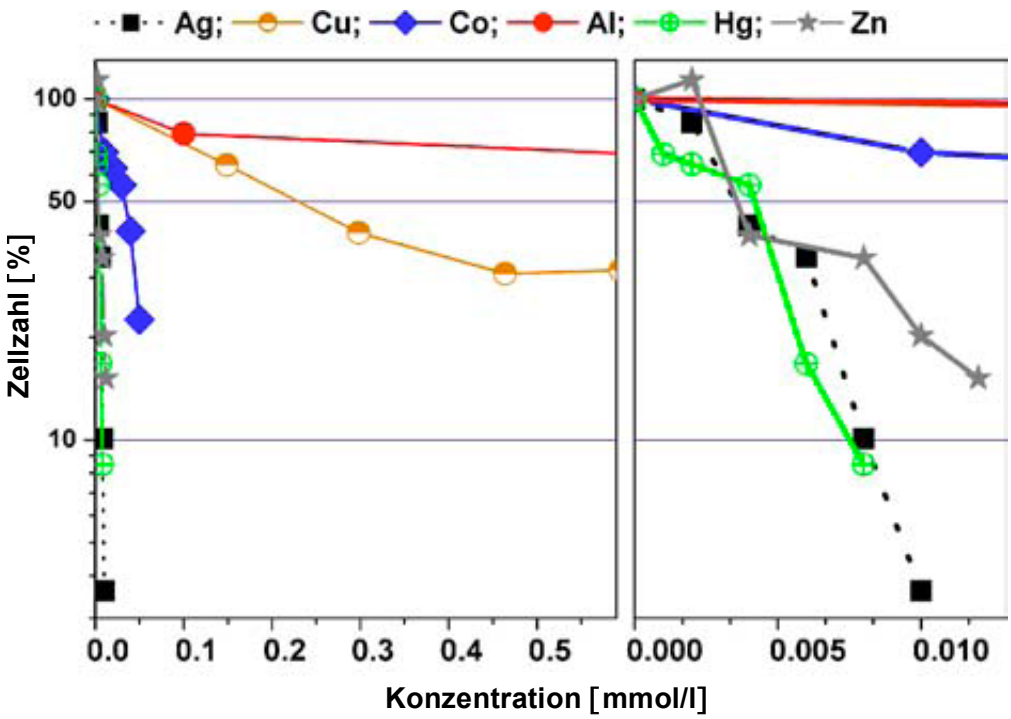

Abbildung 6.1 **Links: Zellzahl der L929 Fibroblasten bei steigenden Konzentrationen von Metallionen.**
Rechts: Vergrößerung der Darstellung von links bei niedrigen Metallionenkonzentrationen bis 0,01667 mmol/l. (aus Heidenau et al. [47])

6.2.1.3 Kombinierte Bewertung der Ergebnisse zu den bakteriellen und zytologischen Untersuchungen zur Wachstumshemmung durch Metallionen

Wie bereits in der Einführung ausführlich erwähnt, ist der toxische Effekt von Metallionen gegenüber Bakterien aber auch Gewebezellen ein bekanntes Phänomen, welches in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben wurde [27, S. 467, 43, S. 73, 85, S. 162, 106, S. 305, 119, S. 331]. Diese Studien sind jedoch zumeist inhomogen und aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen, Kulturmedien, Zelllinien und respektive Bakterien, nicht direkt vergleichbar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass die Untersuchungsbedingungen für die verschiedenen Versuchsaufbauten identisch gehalten wurden, um die relative antibakterielle Potenz eines Metallions direkt mit der induzierten Zytotoxizität zu vergleichen. Im allgemeinen stimmen hierbei unsere Ergebnisse mit den publizierten Ergebnissen anderer Autoren überein [27, S. 467, 119, S. 331].

Unsere vergleichenden Ergebnisse zeigten, daß Silber, Zink und Quecksilber bereits in relativ niedrigen Konzentrationen einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt haben. Kobalt zeigte bezüglich des zytotoxischen Effekts eine intermediäre Potenz. Die geringste Zytotoxizität bei verhältnismäßig hohen Metallionen Konzentrationen zeigten Kupfer und respektive Aluminium.

Im weitesten Sinne spiegeln diese Ergebnisse an Gewebezellen auch die Ergebnisse der bakteriellen Untersuchungen wieder. Kobalt und Zink zeigten jedoch bezüglich der antibakteriellen Potenz keinen wesentlichen Effekt in niedrigen Konzentrationen. Für Kupfer konnte allerdings bei gleichen Konzentrationen ein deutlich höherer antibakterieller als zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Zur besseren Interpretierbarkeit und Vergleichbarkeit beim Zusammenführen der Ergebnisse wurde die Konzentration der verschiedenen Metallionen errechnet, welche zum Absterben der Hälfte der L929 Fibroblasten führte („lethal dose" = tödliche Dosis für 50% der Zellen = LD_{50}). Für die LD_{50}-Metallionenkonzentration wurde dann die entsprechende relative Reduktionsrate an bakteriellen KBE ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.4 dargestellt.

Metallionen	**LD_{50} (L929) (mmol/l)**	**Reduktionsrate des bakt. Wachstums bei LD_{50} Konzentration**
Silber Ag^{+}	$3{,}5 \times 10^{-3}$	0,93
Zink Zn^{2+}	$3{,}6 \times 10^{-3}$	1,11
Quecksilber Hg^{2+}	$4{,}2 \times 10^{-3}$	7,58
Kupfer Cu^{2+}	$2{,}3 \times 10^{-1}$	$2{,}5 \times 10^{4}$
Kobalt Co^{2+}	$3{,}4 \times 10^{-2}$	1,42
Aluminium Al^{3+}	1,8	0,46

Tabelle 6.3 **LD_{50} der untersuchten Metallionen für L929 Fibroblasten und relative Reduktionsraten des bakteriellen Wachstums bei der jeweiligen LD_{50}-Metallionenkonzentration**

Dieser Vergleich zeigt deutlich die unterschiedlichen antibakteriellen Eigenschaften der einzelnen Metallionen bei vergleichbarer Zytotoxizität und bringt die Ergebnisse in ein Verhältnis zueinander. Es konnte so deutlich gezeigt werden, dass die relativ starken antibakteriellen Effekte von Silber und Quecksilber auf Kosten der Zytokompatibilität gehen, also die Ionen bei vergleichbarer antibakterieller Wirkung eine deutlich höhere Zytotoxizität ausüben als beispielsweise Kupfer. Silber und Quecksilber sind somit äußerst effektive antibakterielle Substanzen, jedoch gleichzeitig extrem zytotoxisch. Bei der LD_{50}-Konzentration zeigte Aluminium als Metallion kaum einen antibakteriellen Effekt. Kobalt- und Zinkionen besitzen bei nur mäßigem antibakteriellem Effekt bereits eine ausgeprägte Zytotoxizität. Hinsichtlich der untersuchten Metallionen zeigte sich Kupfer als antibakterielles Agens den anderen untersuchten Ionen deutlich überlegen. Für Kupfer fand sich die höchste relative Reduktionsrate bakteriellen Wachstums bei entsprechender LD_{50}-Metallionenkonzentration. Im Vergleich zu anderen Metallionen können also Kupferionen vergleichsweise sicher auf Implantate aufgebracht werden, da diese aller Wahrscheinlichkeit nach einen antibakteriellen Effekt zeigen, ohne die Biokompatibilität signifikant

einzuschränken. In der Folge wurde für unsere weiterführenden Untersuchungen Kupfer als antibakterielles Agens in die TiO_2-Schicht eingebracht.

6.2.1.4 Antibakterielle Potenz verschiedener Kombinationen von Metallionen

Die Therapie einer Vielzahl von bakteriellen Infektionen, u.a. auch die eines infizierten Implantates, bedarf zur adäquaten Therapie einer Kombination an Antibiotika [26, S. 1421]. Dies beruht auf den Effekten der Kombinationstherapie von Chemotherapeutika. Die Kombinationstherapie kann hierbei additiv, synergistisch aber auch antagonistisch wirken. Generell wird durch die sinnvolle Kombination verschiedener Chemotherapeutika eine Verstärkung der antibakteriellen Wirkung, eine Verminderung der Resistenzbildung und das Erzielen eines breiteren Wirkspektrums angestrebt. Bei einer solchen Kombinationstherapie müssen allerdings auch eine Reihe an Vorraussetzungen erfüllt sein. So müssen alle Kombinationspartner den Infektionsort erreichen, auf dass eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration am Infektionsort erreicht wird. Ferner darf keine Unterdosierung bei einem fraglichen Synergismus erfolgen [61, S. 633]. Dies führt jedoch bei Implantat-assoziierten Infektionen bereits zu einer deutlichen Problematik. Wie in der Einführung beschrieben, ist ein häufiges Problem der Implantat-assoziierten Infektionen das aufgrund mangelnder Durchblutung der Implantate die Chemotherapeutika (Antibiotika) nicht den Zielort erreichen. So ist trotz Serum-Antibiotika-Spiegel im therapeutischen Bereich, die lokale Wirkstoffkonzentration am Implantat oft nicht ausreichend [19, S. 139]. Des Weiteren muss, um eine sinnvolle Kombinationstherapie durchzuführen, der Erreger auf alle verwendeten Kombinationspartner sensibel sein. Eine Kombination von Chemotherapeutika mit ähnlich schwerwiegenden Nebenwirkungen sollte hierbei allerdings vermieden werden. Man unterscheidet weiter zwischen einer Kombinationstherapie bei Monoinfektionen, einer Kombinationstherapie bei Mischinfektionen (s. Abb. 6.3) und einer Omnispektrumtherapie, welche ein lückenloses antibakterielles Spektrum anstrebt und nur bei wenigen lebensbedrohlichen Erkrankungen oder immuninkompetenten Patienten indiziert ist [61, S. 634].

Bezüglich der Kombination von Metallionen gibt es unterschiedliche Berichte. Es wurde beschrieben, daß Magnesium und Zink den toxischen Effekt von Nickel auf Mikroorganismen lindern. Andere Berichte wiederum zeigten, dass Nickel und Cadmium synergistisch auf die Wachstumshemmung von *Klebsiella pneumoniae* und antagonistisch auf eine Hemmung des Wachstums, der Photosyntheseleistung und der N_2-Fixation von *Anabaena inequalis* wirken [53, S. 255].

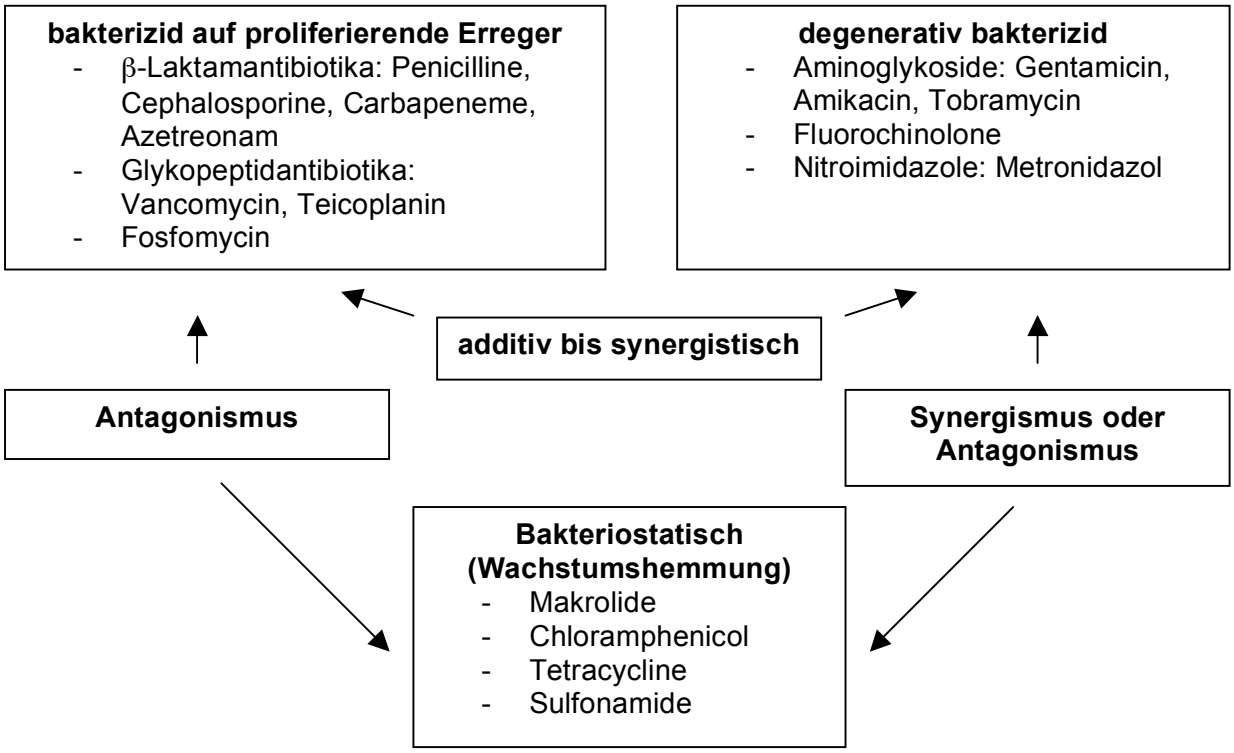

Abbildung 6.2 **Effekte der Kombinationstherapie von Chemotherapeutika**
Beispiele für sinnvolle Kombinationen: β-Laktamantibiotika + Aminoglykosid (verschiedene Wirkungsorte: Bakterienzellwand und Ribosomen), zwei β-Laktamantibiotika (Wirkung auf verschiedene Bindungsproteine), β-Laktamantibiotika + Metronidazol (Ausweitung auf Anaerobier), Vancomycin + Rifampicin (Verhinderung sekundärer Resistenzen).
(Nach Karow et al. [61])

Bei den von uns durchgeführten Versuchen wurden verschiedene Metallionen kombiniert, um einen möglichen synergistischen Effekt zu untersuchen. Da, wie durch die eigenen Versuche bereits ausführlich dargestellt, die unterschiedlichen Metallionen eine deutliche unterschiedlich ausgeprägte antibakterielle Potenz besitzen, wurde eine Gesamtionenkonzentration der jeweils zwei Metallionen (Hg^+/Ag^+, Hg^+/Cu^{2+} und Ag^+/Cu^{2+}) von 0,02 mmol/l gewählt.

Es sei hier bereits vorweggenommen, dass für keine der untersuchten Kombinationen (Hg^+/Ag^+, Hg^+/Cu^{2+} und Ag^+/Cu^{2+}) ein nennenswerter synergistischer bzw. inhibitorischer Effekt zu beobachten war. Die Wachstumshemmung bei den Hg^+/Cu^{2+} und Ag^+/Cu^{2+} Kombinationen waren praktisch ausschließlich durch Quecksilber bzw. Silber bedingt. Die erzielte Wachstumshemmung dieser Untersuchungen entsprach den vorher gewonnenen Ergebnissen aus den Wachstumshemmkurven. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich u.a darin, dass Kupfer bei den eingesetzten Konzentrationen noch keine nennenswerten

antibakteriellen Eigenschaften besitzt. Des Weiteren lässt sich hieraus schließen, dass die Kombination eines weiteren Ions nicht die Toxizität des Kupfers in geringen Dosierungen zu steigern vermag. Auch für die Kombination von Quecksilber mit Silber konnte keine Steigerung der antibakteriellen Potenz beobachtet werden. Es erscheint also, dass ein synergistischer Effekt nicht durch die Kombination der von uns untersuchten Metallionen erreicht werden kann. Dies wiederum hat aller Wahrscheinlichkeit nach den Grund, dass die untersuchten Metallionen über einen ähnlichen Wirkmechanismus ihre antibakteriellen Eigenschaften entwickeln.

6.2.2 Untersuchungen der TiO_2-Oberflächenbeschichtungen

6.2.2.1 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640+10% FBS über 24h

Als Kontrolle für die durchgeführten Versuche dienten $TiAl_6V_4$-Plättchen, da diese Legierung häufig als Material für medizinische Implantate in Orthopädie und Unfallchirurgie verwendet wird. Das bakterielle Wachstum auf den untersuchten $TiAl_6V_4$-Plättchen und in den untersuchten Überständen wurde somit 100% gleichgesetzt, da von keinem antibakteriellen Effekt auszugehen war.

Im Vergleich zu den $TiAl_6V_4$-Plättchen konnte kein verändertes Anhaftverhalten von Bakterien für $TiAl_6V_4$-Plättchen mit einer TiO_2-Schicht beobachtet werden ($p=0,699$). Im Allgemeinen konnte jedoch für die verschiedenen $TiAl_6V_4$-Plättchen, die mit einer Kupferhaltigen TiO_2-Schicht beschichtet waren, eine hochsignifikante Reduktion der Zahl von anhaftender Bakterien gezeigt werden ($p=0,002$). Der antibakterielle Effekt auf anhaftende Bakterien war am deutlichsten bei der vierfach aufgebrachten kupferhaltigen Oberflächenbeschichtung ($4xCu\text{-}TiO_2$), wobei eine Reduktion des bakteriellen Wachstums um 6 Zehnerpotenzen im Vergleich zu den unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen zu verzeichnen war ($p=0,002$). Mehrfach Kupferbeschichtungen ($4xCu\text{-}TiO_2$) expremierten also eine signifikant höhere antibakterielle Aktivität auf anhaftende Bakterien als eine einfach Kupferbeschichtung ($1xCu\text{-}TiO_2$) ($p<0,05$).

Es ist davon auszugehen, dass die anhaftenden Bakterien eine bestimmte Konzentration an Kupfer tolerieren können. Sobald dieser Schwellwert überschritten wird, folgt ein signifikanter Abfall an anhaftenden Bakterien und respektive Koloniebildender Einheiten (KBE) um einige Zehnerpotenzen. Ein ähnlicher Effekt war ja bereits bei den bakteriellen Hemmkurven durch Metallionen beobachtet und beschrieben worden.

Auch die Bakterien im Überstand wurden durch die TiO_2-Schicht nicht in ihrem Wachstum beeinflusst. Das Einbringen von Kupferionen führte allerdings wiederum zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums ($p<0,05$), diesmal im untersuchten Überstand. Wie auch bei den Plättchen anhaftenden Bakterien konnte die ausgeprägteste Reduktion des bakteriellen Wachstums für den Überstand der $4xCu\text{-}TiO_2$-beschichteten Plättchen beobachtet werden.

Somit ist davon auszugehen, dass Kupferionen aus der Oberflächenbeschichtung freigesetzt werden, und nicht nur an der Beschichtungsoberfläche, sondern auch im umgebenden Medium wirksam werden. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass bei einer Mehrfachbeschichtung auch Ionen aus tiefer gelegenen Schichten freigesetzt werden.
Nach der aktuellen Definition bedeutet Desinfektion eine „Maßnahme, die durch Abtötung, Inaktivierung bzw. Entfernung von Mikroorganismen eine Reduzierung der Keimzahl um mindestens fünf Zehnerpotenzen erreicht, damit von dem desinfizierten Material keine Infektion mehr ausgehen kann“ [51, S. 338]. Aufgrund der von uns gewonnenen Ergebnisse kann bei dem antibakteriellen Effekt der 4xCu-TiO_2 Schicht von einer Desinfektion gesprochen werden.

6.2.2.2 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in α-MEM +20% FBS über 24h

Um die eigenen mikrobiologischen Ergebnisse bezüglich der Biokompatibilität in Verhältnis zu setzen, wurden durch das Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth Versuche mit Gewebezellen und den TiO_2-beschichteten Plättchen durchgeführt. Wie oben beschrieben, wurde hierbei allerdings α-MEM als Nährmedium verwendet. Um die gewonnenen Ergebnisse also direkt miteinander zu vergleichen, insbesondere auch die Wachstumshemmkurven, wurde eine Versuchsreihe der mikrobiologischen Untersuchungen mit α-MEM + 20% FBS als Nährlösung für die Plättchenversuche durchgeführt.
Auch unter Verwendung von α-MEM als Nährmedium konnte kein Effekt auf das Wachstumsverhaltens von Bakterien durch die reine TiO_2-Schicht festgestellt werden. Erst durch das Einbringen von Cu^{2+}-Ionen in die TiO_2-Schicht konnte wieder eine signifikante Reduktion von anhaftenden Bakterien gezeigt werden (p=0,02). Der antibakterielle Effekt auf anhaftende Bakterien, war abermals am deutlichsten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht. Die Reduktion anhaftender Bakterien betrug erneut 6 Zehnerpotenzen im Vergleich zu den unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (p=0,02). Die signifikant höhere antibakterielle Aktivität auf anhaftende Bakterien die mehrfach Kupferbeschichtungen (4xCu-TiO_2) im Vergleich zu einer einfach Kupferbeschichtung (1xCu-TiO_2) exprimierten, war also nicht abhängig von den von uns verwendeten Nährmedien.

Auch führte das Einbringen von Kupferionen zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums (p=0,02) im untersuchten Überstand mit α-MEM als Nährmedium. Die ausgeprägteste Reduktion bakteriellen Wachstums für den Überstand im α-MEM Nährmedium konnte ebenfalls für die 4xCu-TiO_2-Schicht beobachtet werden (p=0,02).
Die Ergebnisse, die mit α-MEM als Nährmedium gewonnen wurden, entsprachen weitgehend den Ergebnissen, die bereits für RPMI 1640 als Nährmedium diskutiert wurden. Der antibakterielle Effekt der verwendeten Kupfer-TiO_2 Schichten wurde also nicht

wesentlich durch die von uns verwendeten Nährmedien beeinflusst, so dass die Ergebnisse der Zelltests (FBI Bayreuth) direkt mit den eigenen Ergebnissen verglichen werden konnten.

6.2.2.3 Untersuchungen zur Oberflächenbesiedlung durch Gewebezellen

Die Zellzahl und korrespondierende mitochondrale Aktivität der MC3T3-E1 Zellen sind in Abbildung 6.3 gegenüber gestellt. Erneut wurden die Werte gegenüber $TiAl_6V_4$, einem klinisch etabliertem Metall verglichen. Das Wachstum der Zellen an den $TiAl_6V_4$-Plättchen wurde mit 100% gleichgesetzt.

Es konnte ein signifikanter Anstieg der Zellzahl (p=0,002) als auch der mitochondralen Aktivität (p=0,0007) an den rein TiO_2-beschichteten Plättchen gegenüber den unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen beobachtet werden. Für die 1xCu-TiO_2-beschichteten Plättchen zeigte sich ebenfalls ein leichter Anstieg der Zellproliferationsrate, jedoch ohne den Nachweis statistischer Signifikanz (p>0,05). Im Gegensatz dazu fand sich für die 4xCu-TiO_2-beschichteten Plättchen ein signifikanter Rückgang der Zellzahl (p=0,002) sowie der mitochondralen Aktivität ($p=0,9x10^{-7}$) (Abb. 6.3).

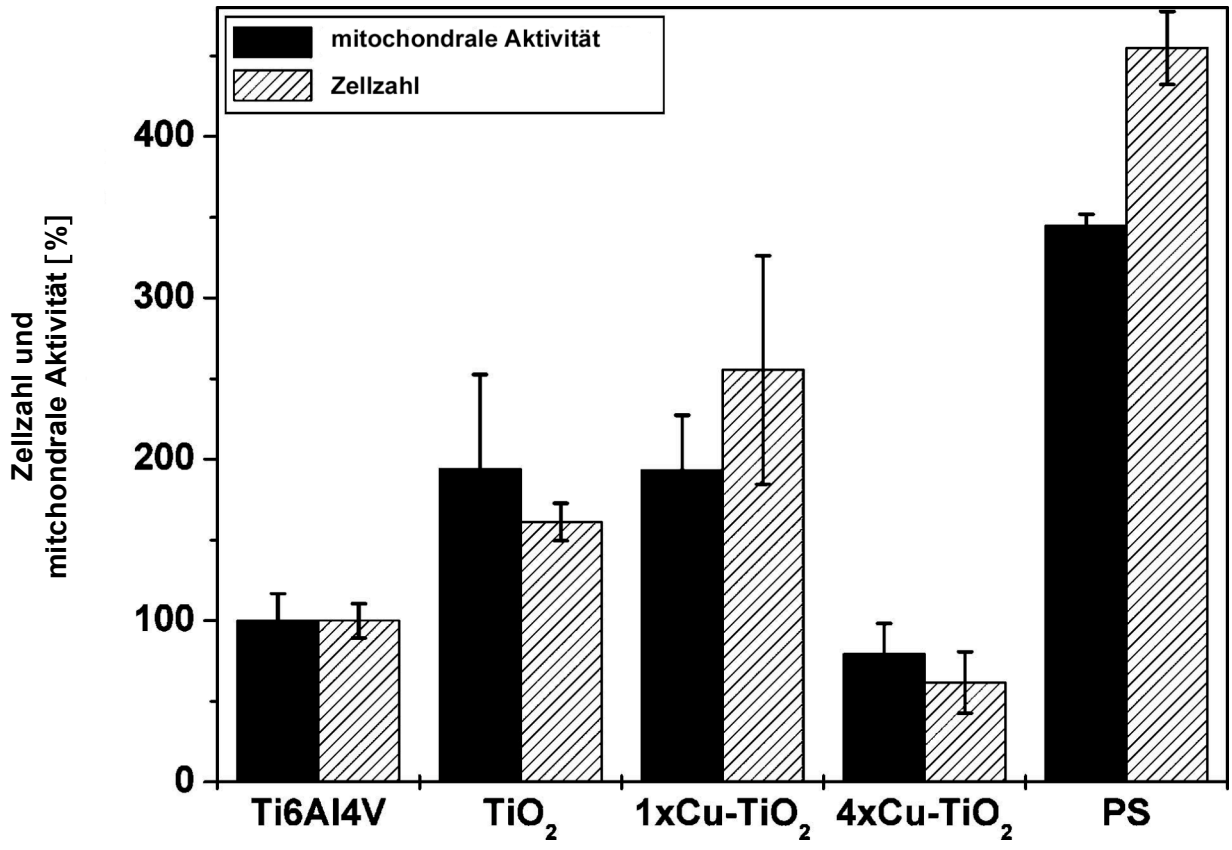

Abbildung 6.3 **Wachstum und mitochondrale Aktivität der Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1 Zellen im Nährmedium beschichteter und unbeschichteter $TiAl_6V_4$-Plättchen nach 48h Inkubation (aus Heidenau et al. [47])**

Am Friedrich-Baur-Institut wurden zusätzlich REM-Untersuchungen der Osteoblasten-ähnlichen Zellen durchgeführt. Beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 6.4a-d gegenübergestellt. Die Zellen, welche am unbeschichteten $TiAl_6V_4$ anhafteten, erscheinen hierbei im Allgemeinen spindelförmiger im Vergleich zu den Zellen, welche an den beschichteten Plättchen anhafteten. Die an den unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen haftenden Zellen zeigten weniger Tendenz zur Ausbreitung an der Oberfläche nach 48 Stunden (Abb. 6.4a). Die Morphologie der Gewebezellen an den TiO_2-beschichteten Plättchen war ähnlich der Zellmorphologie auf den $TiAl_6V_4$-Plättchen. Man konnte jedoch eine zunehmende Ausbreitung der Zellen auf den TiO_2, 1xCu-TiO_2-beschichteten Plättchen und sogar auf den 4xCu-TiO_2-beschichteten Plättchen erkennen. Durch den Effekt der Kupferionen waren aber gleichzeitig beschädigte Zellen (1xCu-TiO_2-beschichtete Plättchen) und sogar abgestorbene Zellen (4xCu-TiO_2-beschichtete Plättchen) in der Rasterelektronenmikroskopie zu erkennen. In allen Bildern mit einer höheren Auflösung konnten jedoch Zellmembranen mit einer typischen Beschaffenheit beobachtet werden. Ferner sah man fokale Kontakte, die von den Zellen zu den verschiedenen Oberflächen aufgebaut wurden.

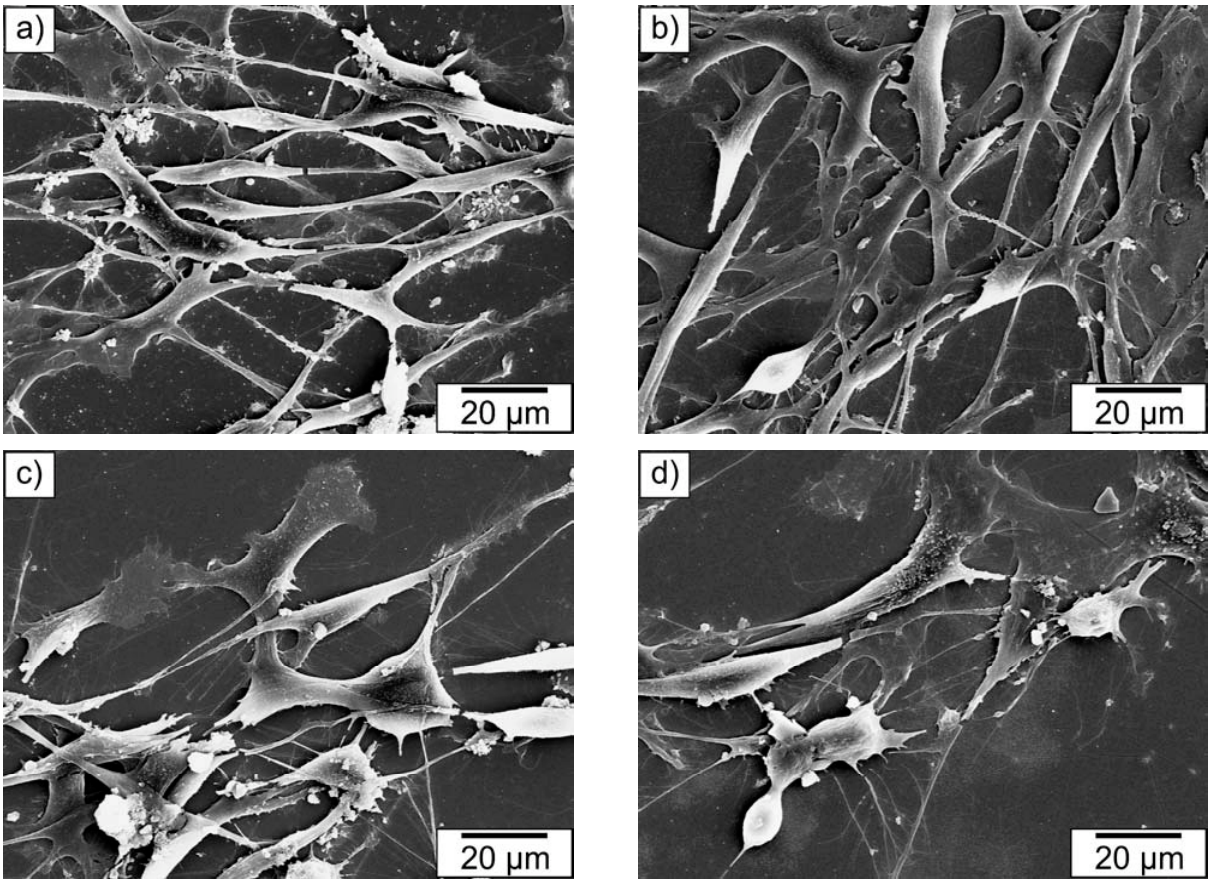

Abbildung 6.4 **REM-Aufnahmen von MC3T3-E1 Zellen auf unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (a), TiO_2-beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (b), 1xCu TiO_2-beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (c) und 4xCu TiO_2-beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (d) (aus Heidenau et al. [47])**

6.2.2.4 Proliferations-/Adhäsionsversuche mit MRSA 27065 in RPMI 1640+10% FBS über 24h

Zunehmende Probleme bei der Implantation von Totalendoprothesen in der Orthopädie bereiten MRSE und MRSA [57, S. 125], so dass in einer weiteren Versuchsreihe der antibakterielle Effekt der Cu-TiO_2 beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen auf antibiotikaresistente Keime (MRSA 27065) untersucht wurde. Als Nährmedium diente in diesem Fall erneut RPMI 1640 supplemiert mit 10% FBS.

Für die verschiedenen $TiAl_6V_4$-Plättchen mit einer Cu-TiO_2-Schicht konnte wieder eine signifikante Reduktion von anhaftenden Bakterien (MRSA) gezeigt werden. Der antibakterielle Effekt auf anhaftende Bakterien (MRSA) war wiederum am deutlichsten bei der 4xCu-TiO_2-Schicht, wobei die Reduktion erneut 6 Zehnerpotenzen im Vergleich zu den unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen betrug ($p=0,02$). Die signifikant höhere antibakterielle Aktivität auf anhaftende Bakterien durch die mehrfach Kupferbeschichtungen (4xCu-TiO_2) im Vergleich zu einer einfach Kupferbeschichtung (1xCu-TiO_2) ($p=0,02$), war also nicht auf fakultativ pathogene Keime beschränkt, sondern zeigte sich ebenfalls bei einem antibiotika resistenten Keim (MRSA 27065).

Auch führten die Kupferionen zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums (KBE) von MRSA ($p=0,02$) im untersuchten Überstand des Nährmediums. Die ausgeprägteste Reduktion bakteriellen Wachstums im Überstand konnte auch hier für die 4xCu-TiO_2 beobachtet werden ($p=0,02$).

6.2.2.5 Proliferations-/Adhäsionsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 und RPMI 1640+10% FBS über 7 Tage

Um einen längerfristigen antibakteriellen Effekt der Cu-TiO_2-Schicht nachzuweisen, wurden Versuche mit den Plättchen über 168 Stunden durchgeführt. Hierbei wurden nach zunächst 24h, nach 72h, nach 120h und abschließend nach insgesamt 168h der Überstand ausgeimpft und die darin wachsenden Bakterien quantifiziert. Nach 168h wurden zudem die an die Plättchen anhaftenden Bakterien abgelöst und ebenfalls quantifiziert. Wie zu erwarten entsprachen die Ergebnisse nach 24h den Ergebnissen die bereits in den Vorversuchen beobachtet worden waren. Hierbei war auch das bakterielle Wachstum im Überstand nicht durch die TiO_2-Schicht beeinflusst, das Einbringen von Kupferionen führte wiederum zu einer signifikanten Hemmung des bakteriellen Wachstums ($p<0,05$) im untersuchten Überstand. Die ausgeprägteste Reduktion des bakteriellen Wachstums im Überstand konnte wie zuvor für die 4xCu-TiO_2-Schicht beobachtet werden ($p=0,002$). Auch für die 2xCu- und die 3x-Cu-TiO_2-Schicht konnte eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums nach 24h beobachtet werden ($p=0,002$).

In den Untersuchungen des Überstandes nach 72h konnte eine Reduktion des bakteriellen Wachstums durch die mehrfach Cu-TiO_2-Schichten beobachtet werden ($p<0,05$). Für die 1xCu-TiO_2-Schicht konnte nach 72-stündiger Inkubation keine signifikante Reduktion des

bakteriellen Wachstums mehr nachgewiesen werden (p=0,310). Der ausgeprägteste Effekt war weiterhin für die 4x-Cu-TiO_2-Schicht zu beobachten. Es war jedoch auch hier ein deutlicher Anstieg an ausgezählten KBE zu verzeichnen. Da die Zellkulturplatten sowie die Nährlösung jeweils steril gewechselt wurden, liegt es nahe, dass es sich hierbei um an den Plättchen anhaftende Bakterien handelte, welche sich nach Mediumwechsel (und damit Entfernung freigesetzter Ionen) vermehren konnten. Die Reduktion des bakteriellen Wachstums durch die verschiedenen Cu-TiO_2-Schicht nahm auch nach 120h Inkubationszeit weiter ab und war dann auch für die 4xCu-TiO_2-Schicht nicht mehr statistisch signifikant (p>0,05). Nach 168h Inkubation war ebenfalls für keine der Beschichtungen mehr eine bakterielle Reduktion im Überstand nachweisbar. Es kam bei den 1x- und 2x Cu-TiO_2-Schichten sogar zu einer statistisch signifikanten Überwucherung nach 168h im Überstand (p<0,05).

Auch bezüglich der ausgezählten KBE der an den Plättchen anhaftenden Bakterien nach 168h Inkubation konnte für keine der verwendeten Cu-TiO_2-Schichten mehr ein antibakterieller Effekt nachgewiesen werden (p>0,05). Am ehesten ist dies wohl auf eine progrediente Überwucherung an Bakterien zurückzuführen, welche seit Beginn der Versuche an den Plättchen adhärent waren. Durch den regelmäßigen Wechsel des Nährmediums mit Entfernung der freigesetzten Ionen wurden somit wieder bakterielle Wachstumsbedingungen geschaffen. In vivo ist jedoch eine weitaus längere Wirksamkeit der Ionen zu erwarten, da der Diffusionsgradient im Implantat-Knochen-Interface einen längeren Verbleib der kontinuierlich freigesetzten antibakteriellen Ionen erwarten lässt.

6.3 Zusammenführung der Ergebnisse, Diskussion und Bewertung der Schicht

Obwohl Silber in der Medizin derzeit wohl eine führende Rolle als antibakterielles Metallion spielt, zeigen unsere Ergebnisse, dass Kupferionen bei verhältnismäßig geringer Zytotoxizität über einen deutlich höheren antibakteriellen Effekt verfügen als alle anderen von uns untersuchten Metallionen. Eine Konzentration von 0,23 mmol/l Kupfer (II) war die so genannte LD_{50}-Konzentration für die L929-Zellen. Diese Konzentration überschritt bereits den Schwellenwert zur Reduktion bakteriellen Wachstums deutlich (0,15 mmol/l). Kupferionen erscheinen somit in der Wahl als antibakterielles Agens vorzüglich geeignet. Einen synergistischen Effekt unterschiedlicher Metallionen, wie er für viele Antibiotikakombinationen beschrieben wurde, konnten wir in unseren Versuchen nicht nachweisen.

Die Untersuchungen mit den TiO_2-beschichteten Plättchen konnten eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums für die Kupfer-TiO_2-beschichteten Plättchen bei erhaltener Zytokompatibilität nachweisen. Der ausgeprägteste antibakterielle Effekt wurde bei der 4xCu-TiO_2-Schicht beobachtet. Die hierfür beobachteten Werte der Zytokompatibilität (mitochondrale Aktivität und Zellzahl) zeigten sich jedoch vermindert.

Eine exakte Bestimmung des Kupfergehaltes in den Cu-TiO_2-Schichten und der Ionenfreisetzung steht noch aus. Aufgrund der vorher gewonnenen Ergebnisse der Ionenhemmkurven, der Zytokompatibilität und des antibakteriellen Effektes der Cu-TiO_2-beschichteten Plättchen ist jedoch anzunehmen, dass die Kupferfreisetzung aus der Schicht zu einer Ionenkonzentration in der Nährlösung zwischen 0,15 und 0,23 mmol/l führte. Um diese Annahme zu bestätigen sind weitere werkstoffwissenschaftliche Untersuchungen notwendig.

Auch unsere Versuche mit einem antibiotikaresistenten Keim, namentlich *MRSA* 27065, ein Erreger aus einem klinischen Isolat einer Endoprothesen-assoziierten-Infektion, zeigten einen antibakteriellen Effekt der Cu-TiO_2-Schichten. Auch hier war der stärkste antibakterielle Effekt durch die 4xCu-TiO_2-Schicht zu verzeichnen. In einer Vielzahl an Fällen steht bei Implantation bzw. Reimplantation von Endoprothesen kein Antibiogramm zur Verfügung. Auch dürfen „andere Erreger“, die zwar nur in ca. 2% der Fälle mit Implantatinfektionen assoziiert werden [26, S. 1419] und resistente Keime nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. In diesen Fällen, wie auch im Falle einer MRSA-Infektion, können Metallionen respektive Kupferionen eine antimikrobielle Wirksamkeit entfalten.
Nichts desto trotz sind auch Resistenzmechanismen von Mikroorganismen gegenüber Metallionen bekannt [13, S. 198]. Diese Resistenzen können entweder durch Plasmide oder Chromosomen ausgebildet werden. Hierbei werden Resistenzmechanismen gegenüber essentiellen Ionen meist durch Chromosomen ausgebildet und sind in der Regel komplexer als die Mechanismen, welche durch Plasmide vermittelt werden. Bei den durch Plasmide vermittelten Resistenzmechanismen handelt es sich wiederum meist um Effluxmechanismen für toxische Ionen [13, S. 199]. Eine Übersicht der beschriebenen Resistenzmechanismen von Mikroorgansimen gegenüber Metallionen ist in Tabelle 6.4 gegeben.

- Ausschluss von Metallionen über eine Permeabilitätsbarriere
- Aktiver Transport der Metallionen weg von der Zelle/ dem Mikroorganismus
- Intrazelluläre Sequestration der Metallionen durch Bindung an Proteine
- Extrazelluläre Sequestration
- Enzymatische Entgiftung des Metallions zur einer weniger toxischen Form
- Reduktion der Sensitivität von zellulären Bestandteilen gegenüber Metallionen

Tabelle 6.4 Resistenzmechanismen von Mikroorganismen gegenüber Metallionen (nach Bruins et al. [13])

Die Möglichkeit von Bakterien, Resistenzmechanismen gegenüber Metallionen zu entwickeln legt also die Vermutung nahe, dass es bei einer häufigen Verwendung von Metallionen als antimikrobielles Agens zu einer zunehmenden Ausbildung von Resistenzen kommen kann.

In der Literatur wird Kupfer (II) in einer Konzentration von 0,1 bis 1 mg/l als antimikrobiell wirksam auf unterschiedliche Organismen beschrieben [106, S. 298]. Bei einer molaren Masse des Kupfer (II) von 63,546 g/mol entspricht dies einer Konzentration zwischen 0,16 bis 1,6 mmol/l. In unseren eigenen Untersuchungen wurde der „threshold“ bei ca. 0,15 mmol/l überschritten. Eine sichere Sterilisation war dann durch 0,6 mmol/l Kupfer (II) Ionen gewährleistet.

Als essentielles Ion ist Kupfer allerdings für die Balance von Zellen notwendig. Hierbei ist Kupfer ein integraler Bestandteil von Enzymen oder als Kofaktor für die Funktion von Enzymen notwendig. Der menschliche Körper enthält zwischen 80-100 mg Kupfer [100, S. 469], während der Kupferbedarf von Mikroorgansimen relativ gering ist und bei Konzentrationen zwischen 1-10 µM liegt [15, S. 121]. Normalerweise betragen Aufnahme und Ausscheidung von Kupfer beim Menschen 2-5 mg/Tag [50, S. 459]. Im Blut liegt Kupfer wiederum vorwiegend in gebundener Form an Albumin und Coeruloplasmin vor. Die Homeostase erfolgt über die Leber, welche die biliäre Kupferelimination reguliert [100, S. 471]. Den genausten Anhalt über den Kupfergehalt im Körper liefert eine Leberbiopsie. Die Bestimmung der Superoxiddismutase in Erythrozyten kann wiederum zur Diagnose eines Kupfermangels herangezogen werden. Aufgrund der Kupferhomeostase ist die Kupferplasmakonzentration ein träger Indikator für einen Kupfermangel [100, S. 471]. Bei der hepatolentikulären Degeneration (Morbus Wilson, Kupferspeicherkrankheit) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung infolge einer Mutation des Wilson-Gens (ATPase 7B-Gen auf Chromosom 13q14,3) [50, S. 459]. Das Wilson Gen kodiert das Wilson-Protein, eine P-Typ-ATPase mit Kupfertransportfunktion. Durch den Funktionsverlust kommt es zu einer verminderten biliären Ausscheidung von Kupfer und einer pathologischen Kupferspeicherung in Leber und Stammganglien. Weiterhin ist beim M. Wilson das Coeruloplasmin, das normalerweise 95% des Serumkupfers bindet, stark vermindert. Bereits im Kindesalter kommt es zu einer Manifestation des M. Wilson als Lebererkrankung und nach dem 12. Lebensjahr zusätzlich als neurologische Erkrankung [50, S. 459]. Die hepatische Manifestation des M. Wilson reicht von einer asymptomatischen Erhöhung der Transaminasen bis zur fulminanten Hepatitis. Das Endstadium bildet die Leberzirrhose. Neurologisch manifestiert sich der M. Wilson als Parkinsonähnliches Syndrom. Weiterhin kommt es zu Augensymptomen (Kayser-Fleischer’ Kornealring), zur Coombs-negativen hämolytischen Anämie und selten zu Nierenfunktionsstörungen oder Kardiomyopathien [50, S. 459]. Zur Diagnose werden ein verminderter Coeruloplasmin- und Gesamt-Kupfergehalt des Plasmas, freies Kupfer und eine erhöhte Kupferausscheidung im Urin herangezogen [50, S. 459]. Als Therapie wird der Kupferchelatbildner D-Penicillamin verwendet, welcher am effektivsten die Kupferausscheidung fördert [67, S. 496]. Weiterhin wird eine lebenslange kupferarme Diät empfohlen [50, S. 460]. Exogen bedingte Kupfervergiftungen werden von Lüllmann et al. [67, S. 496] als nicht vorkommend beschrieben. Kupfersalze wirken in

verdünnten Lösungen adstringiernd an Schleimhäuten und hemmen damit die eigene Resorption, höhere Konzentrationen lösen Erbrechen aus [67, S. 496]. Gunay et al. [38, S. 243] beschrieben jedoch eine Serie von exogenen Kupfervergiftungen. Hier entspricht die Diagnosestellung auch gleich der Therapie (Vermeidung weiterer Kupferzufuhr) [38, S. 243]. Bei einem potentiellen Einsatz der Cu-Titanoxid Schicht als anti-infektiöses Agens auf metallischen Implantaten muss also in der Anamnese ein M. Wilson des Patienten sicher ausgeschlossen werden können. Im Zweifel sollte auf eine Applikation der Schicht verzichtet werden. Aufgrund der dünnen Schichtdicke (ca. 100nm) und der insgesamt geringen Kupfermenge im Vergleich zum Gesamtkupfergehalt im Körper ist jedoch beim Gesunden keine Nebenwirkung zu erwarten.

Anders verhält es sich bei Silber, welches wie Eingangs bereits erwähnt ein Fremdstoff ohne bisher erkennbare Wertigkeit als Spurenelement für den menschlichen Körper ist [63, S. 237]. Obwohl Silber über den Urin und Faeces ausgeschieden wird [63, S. 237] kann es v.a. bei der Verwendung silberhaltiger Medikamente zur sog. Argyrie kommen [51, S. 109]. Bei der Argyrie (gr. αργυρος Silber) handelt es sich um Ablagerungen von Silbersalzen, die sich über die gesamte Lebensdauer ansammeln, in Haut, Schleimhaut und verschiedenen inneren Organen [63, S. 237] welche zur schiefergrauen Verfärbung selbiger führen [51, S. 109].

Weitere mögliche Komplikationen in der therapeutischen Verwendung von Kupfer könnten dagegen durch Allergien entstehen. In der Dermatologie werden so genannte allergische Kontaktektzeme beschrieben. Hierbei lösen Ekzematogene eine Typ-IV-Reaktion aus. Häufige metallische Kontaktallergene sind Nickelsulfat, Kobaltchlorid [52, S. 329, 87, S. 125], Chrom oder Quecksilber [52, S. 329]. Auch für Kupfer, wenn jedoch in einem geringeren Maße, wurden Immunreaktionen beschrieben. Diese reichen von der immunologischen Kontakturtikaria, der allergischen Kontaktdermatitis, der systemischen allergischen Reaktion bis zur Kontaktstomatitis [52, S. 328]. Wenn man aber die weite Verbreitung des Metalls in Medizin (Intrauterinpessar(IUP)), als Münzgeld, Modeschmuck und in der Industrie berücksichtigt, sind eindeutige Berichte über die Sensibilisierung durch das Metall extrem selten. Noch seltener sind Fälle, die sich durch eine Kupfersensibilisierung als klinisch relevant manifestieren [52, S. 328]. Zu einer systemischen Kontaktdermatitis kann es kommen, wenn Kupferhaltige Implantate oxidiert werden, welches die Freisetzung von freien Kupferionen zur Folge hat. Diese werden über Epithelien absorbiert und auf hämatogenem oder lymphogenem Wege zu Haut und Schleimhäuten transportiert [52, S. 331]. Hier werden die Allergene von Antigenpräsentierenden Zellen abgefangen und daraufhin von T-Zellen erkannt, welche die Bildung von Zytotoxischen Lymphozyten und Zytokinen triggern [52, S. 331]. Dies mobilisiert Neutrophile und Eosinophile, welche eine Dilatation und eine erhöhte Permeabilität von Kapillaren bewirken. Die Folge ist dann die Ausbildung eines Ekzems [52, S. 331]. IUP's und Dentalimplantate scheinen in der Medizin

das höchste Kupfersensibilisierungspotential zu haben [52, S. 331]. In der Orthopädie können Implantatallergien wiederum die Versagensursache von beispielsweise Knieendoprothesen darstellen [4, S. 900]. Bereits mit Einbringen der Implantatmaterialien wird ein Entzündungsreiz gesetzt, wobei Intensität und Verlauf der Immunantwort von der Reaktionsbereitschaft und materialbedingten Faktoren wie Toxizität, Korrosions- und Verschleißverhalten oder Funktionsanpassung abhängen [105, S.60]. Kupfer wird als weitgehend resistent gegenüber Korrosion beschrieben. Humanes Plasma oder Serum sind allerdings äußerst korrodierende physiologische Medien und können so einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer systemischen Immunisierungsreaktion haben [52, S. 329]. Edelstahl oder Kobalt-Chrom-Legierungen, wie sie für orthopädische Implantate verwendet werden, enthalten klassische Kontaktallergene wie Nickel, Chrom oder Kobalt [105, S. 60]. Auch Knochenzement enthält Bestandteile (Acrylate, N,N-Di-methyl-p-Toluidin, Benzoylperoxid, Hydrochinon oder Gentamicin) die als mögliche Kontaktallergene in Frage kommen [104, S. 956]. Sowohl bei Verdacht auf eine knochenzementbedingte Implantatunverträglichkeit [104, S. 958] als auch bei Verdacht auf eine Metallunverträglichkeit [105, S. 63] gehört zur allergologischen Abklärung ein Epikutantest. Ein entsprechender Epikutantest könnte auch bei dem Verdacht auf eine Kupferallergie durchgeführt werden [52, S. 330].

Bezüglich einer prolongierten Freisetzungskinetik von Kupfer aus den Cu-TiO_2-Schichten wurde eine besonders ausgeprägte antibakterielle Wirksamkeit in den ersten 24h beobachtet. Anhand der eigenen bakteriellen Ergebnisse nimmt die Freisetzung aus der Schicht nach 24 Stunden relativ rasch ab. Auch hier könnte man in weiteren Versuchen eine Kupferbestimmung durchführen, um die Kupferfreisetzung aus den Schichten zu quantifizieren. Da der Zeitpunkt der Implantation mit dem so genannten „Race for the surface“ über „das künftige Schicksal des Implantats“ [36, S. 107] entscheidet, mag aber gerade die von uns angenommene Freisetzungskinetik (Freisetzungsmaximum in den ersten 24h) ein Positivum darstellen.

Alles in allem lassen die gewonnenen Ergebnisse durchaus auf eine klinische Etablierbarkeit der TiO_2-Schicht schließen. Im Besonderen, da es bisher zwar eine Reihe an viel versprechenden Ansätzen, aber noch keine endgültige Lösung des Problems der Implantat-assoziierten Infektionen gibt. Aufgrund der Erfahrungen mit ionenbasiernten Beschichtungen, welche sich als in vitro zytokompatibel mit antibakteriellem Effekt erwiesen haben [9, S. 892, 54, S. 524] und dem Ausbleiben der klinischen Wirksamkeit [71, S. 602] oder dem Auftreten von Komplikationen [56, S. 1055, 99, S. 789] welche auch in Verbindung mit der Wirkung der Ionen gebracht werden können [56, S. 1059], müssen jedoch vor klinischer Einführung der Cu-TiO_2-Schicht noch eine Reihe an Tests durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

Implantat-assoziierte Infektionen stellen in Orthopädie und Unfallchirurgie ein zentrales Problem dar und führen zu schwerwiegenden Komplikationen. Um die Inzidenz von Implantat-assozierten Infektionen zu verringern, werden neue Strategien und antiinfektiöse Oberflächen entwickelt und optimiert. Ionen als antimikrobielle Agenzien sind schon seit langer Zeit bekannt und finden zum Teil auch heute klinische Anwendung. Mit der Entwicklung einer TiO_2-Schicht für medizinische Implantate hat das Friedrich-Baur-Institut eine Beschichtung für Biomaterialien geschaffen, welche zunächst durch die Vergrößerung der ubiquitär auf Titan-Implantaten vorkommenden TiO_2-Schicht zu einer Verbesserung der Biokompatibilität und des Einwachsverhaltens führen sollte. Zusätzlich besteht jedoch die Möglichkeit, sie mit Metallionen als antibakterielles oder vielmehr antimikrobielles Agens zu beladen. Da die Beschichtung im Sol-Gel-Verfahren hergestellt und über Tauchvorgänge appliziert wird, besteht die Möglichkeit, auch komplexe und strukturierte Implantate zu beschichten und mehrere Lagen der potenziell antiinfektiösen Schicht aufzubringen und folglich auch eine höhere Konzentration des antiinfektiösen Agens aufzutragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst die antibakterielle Potenz verschiedener Metallionen und Metallionen-Kombinationen zu untersuchen. Durch das Friedrich-Baur-Institut wurden korrespondierende Versuche zur Zytokompatibilität der gleichen Metallionen durchgeführt. Weiterhin wurden mit Kupfer beladene TiO_2-beschichtete Plättchen ($TiAl_6V_4$) auf ihre antibakterielle Potenz untersucht. Parallel wurden wiederum Versuche durch das FBI zur Zytokompatibilität der gleichen Plättchen durchgeführt.

Die stärkste antibakterielle Wirksamkeit zeigte Quecksilber, jedoch gleichzeitig auch die stärkste Zytotoxizität in bereits geringen Konzentrationen. Kupfer hingegen führte bei der LD_{50} Reduktionsrate, welche zur Abtötung der Hälfte der untersuchten Gewebezellen führte, zu einer deutlich überproportionalen Hemmung des bakteriellen Wachstums und offenbarte das weitaus günstigste Verhältnis zwischen Zytokompatibilität und antibakterieller Wirksamkeit. Obwohl derzeit häufig Silberionen Verwendung in medizinischen Applikationen finden, scheint Kupfer bezüglich seiner vermeintlich geringen Zytotoxizität und hierbei deutlich höheren antibakteriellen Potenz zur Integration in medizinische Implantate äußerst geeignet. Bei den untersuchten Metallionen-Kombinationen konnte kein synergistischer Effekt nachgewiesen werden. Für die weiteren Versuche mit den beschichteten Plättchen wurde somit Kupfer als einziges antibakterielles Agens in die TiO_2-Schicht integriert.

Die Untersuchungen zur Zytokompatibilität sowie antibakteriellen Wirksamkeit der TiO_2-Schicht wurden mit unbeschichteten und beschichteten $TiAl_6V_4$ Plättchen durchgeführt. Durch mehrfache Tauchvorgänge während des Herstellungsprozesses lagen mit TiO_2, 1xCu-TiO_2, 2xCu-TiO_2, 3xCu-TiO_2 und 4xCu-TiO_2 beschichtete Plättchen vor. Im Vergleich zu den unbeschichteten Plättchen konnte für die TiO_2-beschichteten Plättchen ohne Kupferintegration keine antibakterielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Für alle Kupfer-TiO_2 beschichteten Plättchen konnte jedoch ein signifikanter antibakterieller Effekt

nachgewiesen werden. Der beobachtete Effekt war am ausgeprägtesten bei der 4x$Cu\text{-}TiO_2$ Beschichtung. Auch bei einem antibiotikaresisten *MRSA* konnte der antibakterielle Effekt der $Kupfer\text{-}TiO_2$ Beschichtung nachgewiesen werden. Bei eigens durchgeführten Langzeituntersuchungen zeigte sich ein Freisetzungspeak der Ionen aus der TiO_2-Schicht in den ersten 24 Stunden, mit kontinuierlicher Freisetzung über mehrere Tage.

In den vergleichenden, durch das Friedrich-Baur-Institut durchgeführten Versuchen zur Zytokompatibilität der Plättchen konnte eine statistisch signifikante Verbesserung der Zytokompatibilität durch die TiO_2-Beschichtung festgestellt werden. Auch für die einfachen $Cu\text{-}TiO_2$-beschichteten Plättchen fand sich noch eine verbesserte Zytokompatibilität, während Schichten mit dem höchsten Kupfergehalt zytotoxisch wirkten.

Kupfer zeigte sich von den von uns untersuchten Ionen am besten als antibakterielles Agens für medizinische Implantate geeignet. Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse bezüglich eines deutlichen antibakteriellen Effektes bei gleichzeitig erhaltener Zytokompatibilität scheint die Applikation einer mit Kupfer beladenen TiO_2-Schicht auf medizinische Implantate, wie beispielsweise Prothesen in der Tumor- oder Revisionschirurgie, als neuer antimirkrobieller Ansatz möglich. Durch Modifikation des Kupfergehaltes könnte je nach Infektionsrisiko eine maßgeschneiderte Oberfläche – mit Wirksamkeit gegen antibiotikaresistente Keime – aufgebracht werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Abad, F.X., Pintó, R.M., Diez, J.M., Bosch, A. Disinfection of Human Enteric Viruses in Water by Copper and Silver in Combination with Low Levels of Chlorine. Appl. Env. Microbiol. 60 (1994) 2377-2383
2. Ahrens, H., Gosheger, G., Streibürger, A., Geber, C., Hardes, J. Antimikrobielle Silberbeschichtung von Tumorprothesen. Onkologe. 12 (2006) 145-151
3. An, Y.H., Stuart, G.W., McDowell, S.J., McDaniel, S.E., Kang, Q., Friedman, R.J. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. J. Orthop. Res. 14 (1996) 846-849
4. Bader, R., Mittelmeier, W., Steinhauser, E. Versagensanalyse von Knieendoprothesen. Orthopäde 9 (2006) 896-903
5. Bast, E. „Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken“ Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001
6. Berbari, E.F., Hanssen, A.D., Duffy, M.C., Steckelberg, J.M., Ilstrup, D.M., Harmsen, W.S., Osmon, D.R. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. Clin. Infect. Dis. 27 (1998) 1247-1254
7. Borkow, G., Gabbay, J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. FASEB J. 18 (2004) 1728-1730
8. Borkow, G., Gabbay, J. Copper as a Biocidal Tool. Curr. Med. Chem. 12 (2005) 2163-2175
9. Bosetti, M., Masse, A., Tobin, E., Cannas, M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials. 23 (2002) 887-892
10. Boy, O., Reinstorf, R. Knie-Totalendoprothese (TEP). In: „Qualität sichtbar machen. BQS-Qualitätsreport 2002“, Mohr, V.D., Bauer, J., Döbler, K., Fischer, B., Woldenga, C. (Hrsg.), BQS Bundesgeschäftsstelle Qualitätsicherung GmbH, Düsseldorf, 2003, 96-108
11. Boy, O., Reinstorf, R. Totalendoprothese (TEP) bei Coxarthrose. In: „Qualität sichtbar machen. BQS-Qualitätsreport 2002“, Mohr, V.D., Bauer, J., Döbler, K., Fischer, B., Woldenga, C. (Hrsg.), BQS Bundesgeschäftsstelle Qualitätsicherung GmbH, Düsseldorf, 2003, 166-174
12. Breusch, S.J., Aldinger, P.R., Thomsen, M., Ewerbeck, V., Lukoschek, M. Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik Teil I: Prothesenstiel. Unfallchirurg 103 (2000) 918-931
13. Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45 (2000) 198-207
14. Capanna, R., Morris, H.G., Campanacci, D., Del Ben, M., Campanacci, M. Modular uncemented prosthetic reconstruction after resection of tumours of the distal femur. J. Bone. Joint. Surg. Br. 76 (1994) 178-186
15. Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS. Microbiol. Rev. 14 (1994) 121-137

16. Christensen G.D., Baldassari L., Simpson W.A.: Methods for Studying Microbial Colonization of Plastics. Methods Enzymol. 253 (1995) 477-500
17. Cooney, T.E. Bactericidal activity of copper and noncopper paints. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 16 (1995) 444-450
18. Cooney, J.J., Tang, R.J. Quantifying effects of antifouling paints on microbial biofilm formation. Methods. Enzymol. 310 (1999) 637-644
19. Cordero, J., Garcia-Cimbrelo, E.: Mechanisms of bacterial resistance in implant infection. Hip. International. 10 (2000) 139-144
20. Costerton, J.W., Marrie, T.J., Cheng, K.J.: Phenomena of Bacterial Adhesion. In „Bacterial Adhesion – Mechanisms and Physiological Significance“, Savage, D.C., Fletcher, M. (Ed.), Plenum Press, New York-London, 1985, 3-43
21. Darouiche, R.O. Treatment of infections associated with surgical implants. N. Engl. J. Med. 350 (2004) 1422-1429
22. Dollwet, H.H., Sorenson, J.R. Historic uses of copper compounds in medicine. Trace. Elem. Med. 2 (1985) 80-87
23. Edebo, L., Singh, M.P., Hoglund, S. Inactivation of some coliphages with copper-thiol complexes. J. Gen. Virol. 1 (1967) 567-570
24. Elek, S.D., Conen, P.E. The virulence of Staphylococcus pyogenes for man: a study of the problems of wound infection. Br. J. Exp. Pathology, 38 (1957) 573-586
25. Epstein, L., Bassein, S. Pesticide Applications of Copper on Perennial Crops in California, 1993 to 1998. J. Environ. Qual. 30 (2001) 1844-1847
26. Geipel, U., Herrmann, M. Das infizierte Implantat. Teil 1: Bakteriologie. Orthopade 33 (2004) 1411-1428.
27. Gellert, G., Stommel, A., Trujillano, A.B. Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with Vibrio fischeri. Chemosphere 39 (1999) 467-476
28. Gilbert, P., Collier, P.J., Brown, M.R. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. Antimicrob. Agents. Chemother. 34 (1990) 1865-1868
29. Gollwitzer, H., Ibrahim, K., Meyer, H., Mittelmeier, W., Busch, R., Stemberger, A. Antibacterial poly (D, L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. J. Antimicrob Chemother. 51 (2003) 585-591
30. Gollwitzer, H., Gerdesmeyer, L. Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In:“Ossäre Integration“ Gradinger R., Gollwitzer H.(Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio, 2006, 1. Auflage, 62-68
31. Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P., Busscher, H.J. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. Biomaterials 23 (2002) 1417-1423

32. Gristina, A.G., Coserton, J.W., Bacterial Adherence to Biomaterials and Tissue. J Bone Joint Surg. Am. 67 (1985) 264-273
33. Gristina, A.G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science. 237 (1987) 1588-1595
34. Gristina, A.G., Jennings, R.A., Naylor, P.T., Myrvik, Q.N., Webb, L.X. Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 33 (1989) 813-816
35. Gristina, A.G., Naylor, P.T., Myrvik, N. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. Orthop. Clin. North Am. 22 (1991) 363-371
36. Gristina, A.G. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. Clin. Orthop. Relat. Res. 298 (1994) 106-118
37. Guggenbichler, J.-P., Böswald, M., Lugauer, S., Krall T. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. Infection 27 (1999) 16-23
38. Gunay, N., Yildirim, C., Karcioglu, O., Gunay, N.E., Yilmaz, M., Usalan, C., Kose, A., Togun, I. A Series of Patients in the Emergency Department Diagnosed with Copper Poisoning: Recognition Equals Treatment. Tohoku J. Exp. Med. 209 (2006) 243-248
39. Gustilo, R.B., Merkow, R.L., Tempelmann, D. The management of open fractures. J. Bone Joint Surg. Am. 72 (1990) 299-304
40. Habash, M., Reid, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. J. Clin. Pharmacol. 39 (1999) 887-898
41. Halstead, W. S. Ligature and suture material: The employment of fine silk in preference to catgut and the advantages of transficion of tissues and vessels in control of hemorrhage - also an account of the introduction of gloves, gutta-percha tissue and silver foil. JAMA 60 (1913) 1119-1126
42. Harris, W.H., Sledge, C.B. Total hip and total knee replacement (2). N. Engl. J. Med. 323 (1990) 801-807
43. Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous A. Effect of heavy metals on Pseudomonas aeruginosa and Bacillus thuringiensis. Bioresour. Technol. 65 (1998) 73-82
44. Head, W.C., Bauk, D.J., Emerson, R.H. Titanium As the Material of Choice for Cementless Femoral Components in Total Hip Arthroplasty. Clin. Orthop. Relat. Res. 311 (1995) 85-90
45. Heidenau, F., Stenzel, F., Schmidt, H., Ziegler, G. Offenporige, bioaktive Oberflächenbeschichtungen auf Titan. Biomaterialien 1 (2001) 19-24
46. Heidenau, F., Stenzel, F., Ziegler, G. Structured Porous Titania as a Coating for Implant Materials. Key Eng. Mat. Vols. 192-195 (2001) 87-90
47. Heidenau, F., Mittelmeier, W., Detsch, R., Haenle, M., Stenzel, F., Ziegler, G., Gollwitzer, H. A novel antibacterial titania coating: Metal ion toxicity and in vitro surface colonization. J Mater Sci Mater Med. 16 (2005) 883-888

48. Heidenau, F., Stenzel, F., Ziegler, G., Gollwitzer, H., Mittelmeier, W. Friedrich-Baur-Beteiligungs GmbH Offenlegungsschrift: Antiinfektiöse, biokompatible Titanoxid-Beschichtung für Implantate sowie Verfahren zu deren Herstellung. Patent (DE10243132) (2006) 1-10
49. Hendricks, S.K., Kwok C., Shen M., Horbett T.A., Ratner B.D., Bryers J.D.: Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation. J Biomed. Mater. Res. 50 (2000) 160-170
50. Herold, G. „Innere Medizin“, Gerd Herold, Köln, 2003
51. Hildebrandt, H. „Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 258. Auflage“ Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1998
52. Hostynek, J.J., Maibach, H.I. Copper hypersensitivity: dermatologic aspects. Dermatol. Ther. 17 (2004) 328-333
53. Hughes, M.N., Poole R.K. „Metals and Micro-organism“ Chapman and Hall, London, 1989
54. Illingworth, B.L., Tweden, K., Schroeder, R.F., Cameron, J.D. In vivo efficacy of silver-coated (Silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm producing bacteria, Staphylococcus epidermidis. J. Heart Valve Dis. 7(1998) 524-530
55. Inman, R.D., Gallegos, K.V., Brause, B.D., Redecha, P.D., Christian, C.L. Clinical and microbial features of prosthetic joint infection. Am. J. Med. 77 (1984) 47-53
56. Ionescu, A., Payne, N., Fraser, A.G., Giddings, J., Gunkemeier, G.L., Butchart, E.G. Incidence of embolism and paravalvar leak after St. Jude Silzone valve implantation: experience from the Cardiff Embolic Risk Factor Study. Heart 89 (2003) 1055-1061
57. Ip, D., Yam, S.K., Chen, C.K. Implications of the changing pattern of bacterial infections following total joint replacement. J. Orthop. Surg. (Hong Kong). 13 (2005) 125-130
58. Ji, G., Silver, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. J. Ind. Microbiol. 14 (1995) 61-75
59. Johnson, G.M., Lee, D.A., Regelmann, W.E., Gray, E.D., Peters, G., Quie, P.G. Interference with granulocyte function by Staphylococcus epidermidis slime. Infect. Immun. 54 (1986) 13-20
60. Karlstrom, A.R., Levine, R.L. Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 5552-5556
61. Karow, T., Lang, R. „Allgemeine und Spezielle Parmakologie und Toxikologie Vorlesungsorientierte Darstellung“ 2003
62. Kim, J-H, Cho, H., Ryu, S.E., Choi, M.U. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. Arch. Biochem. Biophys. 382 (2000) 72-80
63. Lansdown, A.B.G. Critical observations on the neurotoxicity of silver. Crit. Rev. Toxicol. 37 (2007) 237-250

64. Lemons, J.E. Application of materials in medicine and dentistry; Introduction. In: „Biomaterials Science“, Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (Hrsg.), Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, 1996, 283-358
65. Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N.P., Raschke, M. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. Bone 32 (2003) 521-531
66. Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 67 (2003) 593-602
67. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. „Pharmakologie und Toxikologie“ Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1999, 14. Auflage
68. Malawer, M.M., Chou, L.B. Prosthetic survival and clinical results with use of large-segment replacements in the treatment of high-grade bone sarcomas. J. Bone Joint Surg. Am. 77 (1995) 1154-1165
69. Malchau, H., Herberts, P., Eisler, T., Garellcik, G., Söderman, P. The Swedish Total Hip Replacement Register. J. Bone Joint Surg. Am. 84 A Suppl. 2 (2002) 2-20
70. Marcus R., Peritz E. and Gabriel K R.: On closed testing procedures with spezial reference to ordered analysis of variance. Biometrika 1976 63(3):655-660
71. Masse, A., Bruno, A., Bosetti, M., Biasibetti, A., Cannas, M., Gallinaro, P. Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results. J. Biomed. Mater. Res. 53 (2000) 600-604
72. Mittermayer, F., Krepler, P., Dominikus, M., Schwameis, E., Sluga, M., Heinzl, H. Kotz, R. Long term follow up of uncemented tumor endoprostheses for the lower extremity. Clin. Orthop. Relat. Res. 388 (2001) 167-177
73. Nablo, B.J., Prichard, H.L., Butler, R.D., Klitzman, B., Schoenfisch, M.H. Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release. Biomaterials 26 (2005) 6984-6990
74. Naylor, P., Myrvik, Q., Gristina, A.G. Antibiotic Resistance of Biomaterial-Adherent Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci. Clin Orthop Relat Res. 261 (1990) 126-133
75. Nies, D.H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in Microbes. Plasmid 27 (1992) 17-28
76. Nies B. PMMA as a Drug Carrier. In: „Biomaterials in surgery“, Walenkamp, G.H.I.M. (Hrsg.), Thieme, Stuttgart-New York, 1998, 1. Auflage, 52-54
77. Olefjord, I., Hansson, S. Surface analysis of four dental implant systems. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 8 (1993) 32-40
78. Perdreau-Remington, F., Stefanik, D., Peters, G., Ludwig, C., Rütt, J., Wenzel, R., Pulverer, G. A four-year prospective study on microbial ecology of explanted prosthetic

hips in 52 patients with “aseptic” prosthetic joint loosening. Eur. J. Clin. Micobiol. Infect. Dis. 15 (1996) 160-165

79. Petrides, P.E. Wasser und Bioelemente. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Petrides, P.E., Löffler, G. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1998, 6. Auflage, 5-30
80. Petrides, P.E. Spurenelemente. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Petrides, P.E., Löffler, G. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1998, 6. Auflage, 623-645
81. Poole R.K., Gadd G.M.: Metals: Microbe Interactions, pp.1-37. IRL Press, Oxford (1989)
82. Price, J.S., Tencer, A.F., Arm, D.M., Bohach, G.A. Controlled release of antibiotics from coated orthopaedic implants. J. Biomed. Mater. Res. 30 (1996) 281-286
83. Proctor, R.A., Peters, G. Small Colony Variants in Staphylococcal Infections: Diagnostic and Therapeutic Implications. Clin. Inf. Dis. 27 (1998) 419-423
84. Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., Peters, G. Staphylococal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. Clin. Inf. Dis. 27, Suppl. 1 (1998) 68-74
85. Ramamoorthy, S., Kushner, D.J. Binding of mercuric and other heavy metal ions by microbial growth media. Microb. Ecol. 2 (1975) 162-176
86. Raschke M., Schmidmeier G. Biologisierung von Implantaten in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates. Unfallchirurg 107 (2004) 653-663
87. Rassner, G., Steinert, U., Schlagenhauff, B. „Dermatologie Lehrbuch und Atlas“ Urban und Fischer Verlag, München-Jena, 2000, 6. Auflage
88. Rohr, U., Senger, M., Selenka, F., Turley, R., Wilhelm, M. Four Years of Experience with Silver-Copper Ionization for Control of Legionella in a German University Hospital Hot Water Plumbing System. Clin. Inf. Dis. 29 (1999) 1507-1511
89. Rowatt, E., Williams, J.P. The effect of multivalent ions on the inactivation of bacteriophage ϕX174 by lipopolysaccharide from Escherichia coli C. Biochem J. 231 (1985) 765-768
90. Ruchholtz, S., Träger, G., Nast-Kolb, D. Die infizierte Hüftgelenksendoprothese, Unfallchirurg 4 (2004) 307-317
91. Rupp, M.E., Archer, G.L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin. Inf. Dis. 19 (1994) 231-245
92. Rushton, D.N., Brindley, G.S., Polkey, C.E., Browning, G.V. Implant infections and antibiotic-impregnated silicone rubber coating. J. Neurol. Neurosurg. Psychatry. 52 (1989) 223-229
93. Rutlow, M. Wiliam Stewart Halstead. Arch. Surg. 135 (2000) 1478
94. Sagripanti, J.L., Routson, L.B., Lytle, C.D. Virus inactivation by copper or iron ions alone in the presence of peroxide. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) 4374-4376

95. Sagripanti, J.L., Routson L.B., Bonifacino, A.C., Lytle, C.D. Mechanism of copper-mediated inactivation of herpes simplex virus. Antimicrob. Agents. Chemother. 41 (1997) 812-817
96. Sagripanti, J.L., Lightfoote, M.M. Cupric and ferric ions inactivate HIV. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 12 (1996) 333-337
97. Sanderson, P.J. Infection in orthopaedic implants. J. Hosp. Infect. 18 (1991) Suppl A 367-375
98. Schaff, H.V., Carrel, T.P., Steckelberg, J.M., Grunkemeier, G.L., Holubkov, R. Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial (AVERT): protocol of a multicenter randomized trial. J. Heart Valve Dis. 8(1999) 131-139
99. Schaff, H.V., Carrel, T.P., Jamieson, W.R., Jones, K.W., Rufilanchas, J.J., Cooley, D.A., Hetzer, R., Stumpe, F., Duveau, D., Moseley, P., van Boven, W.J., Grunkemeier, G.L., Kennard, E.D., Holubkov, R., Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial. Paravalvular leak and other events in silzone-coated mechanical heart valves: a report from AVERT. Ann. Thorac. Surg. 73 (2002) 785-792
100. Schümann, K., Classen, H.G., Dieter, H.H., Multhaup, G., Rükgauer, M., Summer, K.H., Bernhardt, J., Biesalski, H.K. Hohenheim Consensus Workshop: Copper. Eur. J. Clin. Nutr. 56 (2002) 469-483
101. Siebenreicher, H. Oligodynamischer Wirkung der Metalle und Metallsalze. Kolloid Z. 59 (1939) 243-253
102. Sinha, R.K., Morris, F., Shah, S.A., Tuan, R.S. Surface Composition of Orthopaedic Implant Metals Regulates Cell Attachement, Spreading, and Cytoskeletal Organization of Primary Human Osteblasts In Vitro. Clin. Orthop. Relat. Res. 305 (1994) 258-272
103. Stout, J.E., Lin, Y.S., Goetz, A.M., Muder, R.R. Controlling Legionella in hospital water systems: experience with the superheat-and-flush method and copper-silver ionization. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 19 (1998) 911-914
104. Thomas, P., Schuh, A., Summer, B., Mazoochian, F., Thomsen, M. Knochenzementallergie. Orthopäde. 35 (2006) 956-960
105. Thomas, P. Allergie durch Implantatwerkstoffe. Orthopäde 32 (2003) 60-64
106. Thurman, R.B., Gerba, C.P. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. Crit. Rev. Env. Control 18 (1989) 295-315
107. Tilton, R.C., Rosenberg, B. Reversal of the silver inhibition of microorgansims by agar. Appl. Environ. Microbiol. 35 (1978) 1116-1120
108. Umbach, K. Genius in der Giftküche. Spiegel 35 (2004) 128-129
109. Vogely, H.C, Oosterbos, C.J., Puts, E.W., Nijhof, M.W., Nikkels, P.G., Fleer, A., Tonino, A.J., Dhert, W.J., Verbout, A.J. Effects of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant-site infection in a rabbit tibial model. J. Orthop. Res. 18 (2000) 485-493

110. von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G., Götz, F. A Site-Directed Staphylococcus aureus hemB Mutant Is a Small-Colony Variant Which Persists Intracellularly. J. Bact. 179 (1997) 4706-4712
111. von Eiff, C., Heilmann, C., Peters, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18 (1999), 843-846
112. von Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W., Becker, K. Infections associated with medical devices: Pathogenesis, Management and Prophylaxis. Drugs 65 (2005) 179-214
113. von Nägeli, C.W. Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. Neue Denkschr. Allgemein. Schweiz. Gesellsch. Ges. Naturwiss. 33 (1893) 1-51
114. Watson, S.P., Clements, M.O., Foster, S.J. Characterization of the Starvation-Survival Response of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 189 (1998) 1750-1758
115. Weber, D.J., Rutala, W.H. Use of metals as microbivides in preventing infections in healthcare. In: „Disinfection, Sterilization, and Preservation“, Block, S.S. (Ed.) Lippincott Williams and Wilkins, New York, 2001, fith edition 415-430,
116. Williams, D.F. Tissue biomaterials interaction. J. Mater. Sci. (1987) 3421-3445
117. Wirganowicz, P.Z., Eckhardt, J.J., Dorey, F.J., Eilber, F.R., Kabo, J.M. Etiology and results of tumor endoprosthesis revision surgery in 64 patients. Clin. Orthop. Rel. Res. 358 (1999) 64-74
118. Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes D.J., Colwell, R.R. Survival and viability of non-culturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. 8 (1982) 313-323
119. Yamamoto, A., Honma, R., Sumita, M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. Biomed. Mater. Res. 39 (1998) 331-340
120. Ziegler, G., Heidenau F. (2007) Die Historie des Friedrich-Baur-Forschungsinstituts für Biomaterialien und der BioCer Entwicklungs-GmbH (http://www.fbi-biomaterialien.de), Stand 09.03.2007
121. Zimmerli, W., Ochsner, P.E. Management of infections associated with prosthetic joints. Infection 31 (2003) 99-108
122. ZoBell, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial acitvity. J. Bacteriol. 46 (1943) 39-56

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Implantation einer Knie-Total-Endoprothese in einem Reinraum Operationssaal	**7**
Abbildung 3.1	Mechanismus der Sepsis am Bewegungsapparat [33]	**11**
Abbildung 3.2	Molekulare Sequenz der bakteriellen Anlagerung, Adhäsion, Aggregation und Dispersion an Substratoberflächen [33]	**12**
Abbildung 3.3	Röntgenkontrolle 6 Monate post operativ nach primärer Hüft-TEP rechts	**16**
Abbildung 3.4	Antibiotische Strategie [39]	**17**
Abbildung 3.5	Zelluläre Wirkorte antibakterieller Pharmaka [67]	**20**
Abbildung 3.6	Verschiedene Angriffspunkte von Ionen auf die Bakterienzelle [2]	**23**
Abbildung 3.7	Wirkmechanismus der toxischen Eigenschaften von Kupfer gegenüber Mikroorganismen [8]	**24**
Abbildung 3.8a	Gentamicin beschichteter Marknagel (UTN-Protect, Synthes) mit Einschlagbügel [86]	**26**
Abbildung 3.8b	Implantation des UTN-Protect bei liegendem Fixateur externe [86]	**26**
Abbildung 3.9	Tumormegaendoprothese MUTARS® silberbeschichtet [2]	**28**
Abbildung 5.1	Wachstumshemmung von *S. epidermidis* (ATCC 35984) durch steigende Konzentrationen verschiedener Metallionen	**48**
Abbildung 5.2	Wachstumshemmung von *S. epidermidis* (ATCC 35984) durch verschiedene Metallionen Kombinationen	**51**
Abbildung 5.3	Verschieden Beschichtete $TiAl_6V_4$-Plättchen nach 24h Inkubation in infizierter und keimfreier Nährlösung [*S. aureus* ATCC 25923/RPMI 1640 + 10% FBS]	**52**
Abbildung 5.4	Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von RPMI 1640	**55**
Abbildung 5.5	Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von α-MEM	**57**
Abbildung 5.6	Wachstum von MRSA 27065 auf der Oberfläche von TiO_2-beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen sowie im Überstand von RPMI 1640	**58**
Abbildung 5.7	Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 im Überstand von RPMI 1640 + 10% FBS nach 24h, 72h, 120h und 168h	**60**
Abbildung 5.8	Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 im Überstand von RPMI 1640 + 10% FBS nach 1, 3 und 5 Tagen	**60**
Abbildung 5.9	Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 auf beschichteten sowie unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen nach 168h Inkubation	**61**

Abbildung 6.1 Zellzahl der L929 Fibroblasten bei steigenden Konzentrationen von Metallionen [47] **70**

Abbildung 6.2 Effekte der Kombinationstherapie von Chemotherapeutik [61] **73**

Abbildung 6.3 Wachstum und mitochondrale Aktivität der Osteoblastenähnlichen MC3T3-E1 Zellen im Nährmedium beschichteter sowie unbeschichteter $TiAl_6V_4$-Plättchen [47] **76**

Abbildung 6.4 REM-Aufnahmen von MC3T3-E1 Zellen auf unbeschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (a), TiO_2–beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (b), 1xCu-TiO_2-beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (c) und 4xCu-TiO_2-beschichteten $TiAl_6V_4$-Plättchen (d) [47] **77**

10. Anhang

10.1 Antibakterielle Potenz einzelner Metallionen (Kapitel 5.1)

Gerundete Konzentration	Exakte Konzentration
0	0
0,005	0,00495495
0,006	0,00590808837924
0,01	0,00990991
0,02	0,01981982
0,03	0,029544189
1/30	0,03303303
0,05	0,04954955
0,06	0,059088379
1/15	0,06606607
0,1	0,0990991
0,15	0,147720948
0,2	0,1981982
0,25	0,24774775
0,3	0,295441896
1/3	0,33033032
0,4	0,3963964
0,5	0,4954955
0,6	0,590883792
1	0,99099099
3	2,954418962
5	4,4954955
10	9,9099099
20	19,811982
40	39,633964

Tabelle 10.1 **Gegenüberstellung der gerundeten Ionenkonzentrationen [Gerundete Konzentration] und der exakten Ionenkonzentrationen [Exakte Konzentration] beide in [mmol/l] in der infizierten Nährlösung**

10.2 Antibakterielle Potenz von Silberionen (Kapitel 5.1.1)

	[%]				
Ag+ [mmol/l]	**0**	**0,01**	**0,05**	**0,1**	**0,2**
Probe 1	170	91	1,5	0	0
2	97	130	19	$4{,}3\times10^{-3}$	0
3	40	130	5,4	0	0
4	67	100	67	0,013	0
5	100	190	160	0,026	0
6	120	100	43	0,038	0
Mittelwert	**100**	**120**	**50**	**0,013**	**0**
Standardabweichung	46	36	60	0,015	0

Tabelle 10.2: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Silberionen-Konzentrationen [mmol/l]**

10.3 Antibakterielle Potenz von Quecksilberionen (Kapitel 5.1.2)

	[%]				
Hg+ [mmol/l]	**0**	**0,01**	**0,025**	**1/30**	**0,05**
Probe 1	82	3,1	0	0	0
2	190	11	0	0	0
3	210	22	0	0	0
4	66	1	$1{,}0\times10^{-4}$	0	0
5	37	12	0,35	$2{,}0\times10^{-4}$	0
6	15	16	0,45	0	0
Mittelwert	**100**	**11**	**0,13**	**$3{,}4\times10^{-5}$**	**0**
Standardabweichung	81	8	0,21	$8{,}3\times10^{-5}$	0

Tabelle 10.3: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Quecksilberionen-Konzentrationen [mmol/l]**

10.4 Antibakterielle Potenz von Aluminiumionen (Kapitel 5.1.3)

	[%]					
Al+ [mmol/l]	**0**	**1**	**5**	**10**	**20**	**40**
Probe 1	130	140	110	0,28	0	0
2	120	120	120	1,2	0	0
3	130	110	120	2,4	0	0
4	48	340	280	0,73	0	0
5	100	390	340	0,26	0	0
6	60	240	280	2,7	0	0
Mittelwert	**100**	**220**	**210**	**1,3**	**0**	**0**
Standardabweichung	37	120	100	1,1	0	0

Tabelle 10.4: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Aluminiumionen-Konzentrationen [mmol/l]**

10.5 Antibakterielle Potenz von Zinkionen (Kapitel 5.1.4)

	[%]							
Zn+ [mmol/l]	**0**	**0,1**	**0,5**	**1**	**2,5**	**5**	**10**	**20**
Probe 1	140	4,4	1,9	0,62	0,038	$2,7x10^{-3}$	0	0
2	190	18	1	0,54	0,031	$6,1x10^{-3}$	0	0
3	130	5	0,78	0,39	0,05	$6,3x10^{-3}$	0	0
4	42	5	0,37	0,34	0,05	$7,4x10^{-3}$	$1,3x10^{-4}$	0
5	53	1,3	0,46	0,41	0,013	$7,7x10^{-3}$	$1,3x10^{-4}$	0
6	46	0,63	0,33	0,42	0,031	$5,5x10^{-3}$	$6,3x10^{-5}$	0
Mittelwert	**100**	**5,8**	**0,81**	**0,45**	**0,036**	**$6x10^{-3}$**	**$5,2x10^{-5}$**	**0**
SA	61	6,4	0,6	0,1	0,014	$1,8x10^{-3}$	$6,2x10^{-5}$	0

Tabelle 10.5: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Zinkionen-Konzentrationen [mmol/l]**

10.6 Antibakterielle Potenz von Kobaltionen (Kapitel 5.1.5)

	[%]					
Co+ [mmol/l]	**0**	**0,005**	**0,01**	**1/30**	**0,05**	**1/15**
Probe 1	67	100	140	88	100	130
2	130	120	120	94	98	99
3	110	55	65	53	94	140
4	180	37	50	74	56	100
5	74	51	37	37	56	130
6	37	37	74	74	61	83
Mittelwert	**100**	**67**	**81**	**70**	**78**	**110**
Standardabweichung	53	35	40	22	23	22
	[%]					
Co+ [mmol/l]	**0,1**	**0,2**	**0,25**	**1/3**	**0,4**	**0,5**
Probe 1	110	6,3	0,366	0	0	0
2	320	35	0,74	0,0148	0	0
3	190	0,74	1,48	$3,7x10^{-3}$	$4,81x10^{-3}$	0
4	120	3,7	0	0,0592	0	0
5	12	20	0,0259	1,11	0	0
6	92	4,1	$3,7x10^{-3}$	0,2	$3,7x10^{-3}$	0
Mittelwert	**140**	**12**	**0,436**	**0,231**	**$1,42x10^{-3}$**	**0**
Standardabweichung	100	13	0,588	0,437	$2,22x10^{-3}$	0

Tabelle 10.6: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Kobaltionen-Konzentrationen [mmol/l]**

10.7 Antibakterielle Potenz von Kupferionen (Kapitel 5.1.6)

	[%]							
Cu++ [mmol/l]	**0**	**0,006**	**0,03**	**0,06**	**0,15**	**0,3**	**0,6**	**3**
Probe 1	86	79	75	41	0,13	0	0	0
2	73	88	79	65	0,11	0	0	0
3	77	73	77	53	0,29	0	0	0
4	88	81	83	69	0,055	0	0	0
5	71	83	77	77	0,057	$2x10^{-3}$	0	0
6	79	71	86	67	0,1	0	0	0
7	81	45	43	28	0	0	0	0
8	240	100	83	39	$3,9x10^{-3}$	0	0	0
9	110	28	180	29	$2x10^{-3}$	$2x10^{-3}$	0	0
Mittelwert	**100**	**72**	**87**	**52**	**0,084**	**$4,4x10^{-4}$**	**0**	**0**
SA	52	23	38	18	0,93	$8,7x10^{-4}$	0	0

Tabelle 10.7: **Wachstumshemmung von *S. epidermidis* ATCC 35984 in Prozent [%] nach 24-stündiger Inkubation unter Zugabe unterschiedlicher Kupfer-Konzentrationen [mmol/l]**

10.8 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber- und Kupferionen (Kapitel 5.2.1)

	[KBE/ml]						
Hg+ [%]	**0**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
Cu+ [%]	**100**	**80**	**60**	**50**	**40**	**20**	**0**
Probe 1	$9{,}6x10^6$	$4{,}4x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$6x10^5$	$5{,}8x10^4$	$3x10^4$
2	$7{,}0x10^6$	$3{,}4x10^6$	$3{,}4x10^6$	$1x10^6$	$8x10^5$	$3{,}6x10^5$	$1{,}5x10^5$
3	$3{,}8x10^6$	$2{,}6x10^6$	$3{,}4x10^6$	$8x10^5$	$2x10^5$	$3{,}6x10^5$	$7{,}6x10^4$
4	$1{,}5x10^7$	$3{,}6x10^6$	$2{,}2x10^6$	$1{,}6x10^6$	$1{,}2x10^6$	$2x10^4$	520
5	$1{,}7x10^7$	$5{,}2x10^6$	$3{,}2x10^6$	$1{,}8x10^6$	$1x10^6$	$1{,}8x10^5$	$4{,}2x10^3$
6	$1{,}7x10^7$	$1{,}7x10^7$	$1{,}4x10^6$	$2x10^6$	$1{,}4x10^5$	$6x10^3$	$4x10^4$
Mittelwert	$\mathbf{1{,}2x10^7}$	$\mathbf{6x10^6}$	$\mathbf{2{,}4x10^6}$	$\mathbf{1{,}4x10^6}$	$\mathbf{6{,}6x10^5}$	$\mathbf{1{,}6x10^5}$	$\mathbf{4{,}9x10^4}$
SA	$5{,}6x10^6$	$5{,}4x10^6$	$1{,}1x10^6$	$5x10^5$	$4{,}3x10^5$	$1{,}6x10^5$	$5{,}5x10^4$

Tabelle 10.8: **Errechnete KBE/ml [KBE/ml] von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unterschiedlicher Quecksilber- und Kupferionen-Kombinationen [%]**

10.9 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Quecksilber- und Silberionen (Kapitel 5.2.2)

	[KBE/ml]						
Hg+ [%]	**0**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
Ag+ [%]	**100**	**80**	**60**	**50**	**40**	**20**	**0**
Probe 1	$3{,}4x10^6$	$1{,}8x10^6$	$1{,}4x10^6$	$5{,}5x10^5$	$2{,}6x10^5$	$1{,}5x10^5$	$5{,}6x10^4$
2	$4{,}6x10^6$	$7{,}6x10^6$	$4x10^5$	$5{,}7x10^5$	$4{,}6x10^5$	$6{,}2x10^4$	$4{,}4x10^4$
3	$3x10^6$	$8{,}4x10^6$	$1x10^6$	$3x10^5$	$2{,}1x10^5$	$4{,}2x10^4$	$1x10^4$
4	$1{,}3x10^7$	$5{,}6x10^5$	$1{,}1x10^6$	$3{,}6x10^5$	$2{,}6x10^5$	$1{,}2x10^6$	$6{,}3x10^5$
5	$1x10^7$	$2x10^6$	$1{,}1x10^6$	$9{,}6x10^5$	$3{,}4x10^5$	$4{,}4x10^5$	$1{,}6x10^5$
6	$2{,}1x10^6$	$4{,}6x10^6$	$1{,}3x10^6$	$4{,}6x10^5$	$5{,}8x10^5$	$1{,}6x10^6$	$1{,}9x10^5$
Mittelwert	$\mathbf{6x10^6}$	$\mathbf{4{,}2x10^6}$	$\mathbf{1{,}1x10^6}$	$\mathbf{5{,}3x10^5}$	$\mathbf{3{,}5x10^5}$	$\mathbf{5{,}8x10^5}$	$\mathbf{1{,}8x10^5}$
SA	$4{,}4x10^6$	$3{,}3x10^6$	$3{,}5x10^5$	$2{,}3x10^5$	$1{,}4x10^5$	$6{,}5x10^5$	$2{,}3x10^5$

Tabelle 10.9: **Errechnete KBE/ml [KBE/ml] von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unterschiedlicher Quecksilber- und Silberionen-Kombinationen [%]**

10.10 Bakterielle Wachstumshemmung durch die Kombination von Silber- und Kupferionen (Kapitel 5.2.3)

	[KBE/ml]						
Ag+ [%]	**0**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
Cu+ [%]	**100**	**80**	**60**	**50**	**40**	**20**	**0**
Probe 1	$2{,}8x10^5$	$1{,}5x10^5$	$4x10^4$	$2{,}2x10^4$	$8x10^3$	840	160
2	$2{,}2x10^5$	$2x10^5$	$4{,}8x10^4$	$2{,}4x10^4$	$8x10^3$	700	300
3	$2x10^5$	$1{,}6x10^5$	$5{,}2x10^4$	$2{,}4x10^4$	$6{,}0x10^3$	560	280
4	$9{,}2x10^6$	$4x10^6$	$3x10^6$	$1{,}8x10^6$	$6{,}0x10^5$	$9{,}6x10^5$	840
5	$3x10^6$	$4{,}8x10^6$	$2{,}6x10^6$	$2{,}6x10^6$	$1{,}2x10^6$	$7x10^5$	400
6	$4{,}6x10^6$	$2{,}8x10^6$	$2{,}6x10^6$	$2{,}6x10^6$	$2{,}2x10^6$	$4{,}6x10^4$	$1x10^4$
Mittelwert	**$2{,}9x10^6$**	**$2x10^6$**	**$1{,}4x10^6$**	**$1{,}2x10^6$**	**$6{,}7x10^5$**	**$3x10^5$**	**$2x10^3$**
SA	$3{,}6x10^6$	$2{,}1x10^6$	$1{,}5x10^6$	$1{,}3x10^6$	$8{,}9x10^5$	$4{,}4x10^5$	$3{,}9x10^3$

Tabelle 10.10: **Errechnete KBE/ml [KBE/ml] von *S. epidermidis* ATCC 35984 nach 24-stündiger Inkubation unterschiedlicher Silber- und Kupferionen-Kombinationen [%]**

10.11 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit S. aureus ATCC 25923 in RPMI 1640 + 10% FBS über 24 Stunden (Kapitel 5.3.1)

Überstand	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	40	13	0	0,02	$3,2x10^{-4}$	$2x10^{-5}$
2	45	31	0,1	0,018	$1,1x10^{-4}$	$1x10^{-3}$
3	45	2,6	21	$8x10^{-4}$	$5,1x10^{-3}$	$1x10^{-3}$
4	130	240	29	2,5	0,25	$4,1x10^{-5}$
5	150	240	18	5,5	0,2	$1x10^{-3}$
6	180	61	34	1,5	0,24	$9,9x10^{-4}$
[%]						
Mittelwert	**100**	**99**	**17**	**1,6**	**0,12**	**$6,8x10^{-4}$**
SA	**64**	**110**	**14**	**2,2**	**0,13**	**$5,1x10^{-4}$**

Tabelle 10.11: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Anhaftend	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	31	28	0,014	$5,6x10^{-3}$	$2,8x10^{-3}$	0
2	8,6	22	0,05	0,011	0	0
3	140	21	0,019	$2,8x10^{-3}$	$8,4x10^{-3}$	0
4	140	120	60	1,1	1,1	0
5	250	260	46	3,1	3,9	0
6	31	170	38	3,9	0,56	0
[%]						
Mittelwert	**100**	**100**	**24**	**1,3**	**0,93**	**0**
SA	**93**	**96**	**27**	**1,7**	**1,5**	**0**

Tabelle 10.12: **Errechnete KBE/cm^2 [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen, anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	2	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,125
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,261
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.13: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	7,75	46,50	Mann-Whitney U	10,500
	3	6	5,25	31,50	Wilcoxon W	31,500
	Total	12			Z	-1,205
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,228
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[a]
[KBE/ml]	2	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	4	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,567
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	6	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,123
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,261
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.14: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	8,50	51,00	Mann-Whitney U	6,000
	4	6	4,50	27,00	Wilcoxon W	27,000
	Total	12			Z	-1,922
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,055
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065[a]
[KBE/ml]	3	6	8,50	51,00	Mann-Whitney U	6,000
	5	6	4,50	27,00	Wilcoxon W	27,000
	Total	12			Z	-1,922
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,055
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065[a]
[KBE/ml]	3	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	6	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,567
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/ml]	4	6	7,83	47,00	Mann-Whitney U	10,000
	5	6	5,17	31,00	Wilcoxon W	31,000
	Total	12			Z	-1,281
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,200
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[a]
[KBE/ml]	4	6	8,67	52,00	Mann-Whitney U	5,000
	6	6	4,33	26,00	Wilcoxon W	26,000
	Total	12			Z	-2,085
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,037
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.15: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	1	6	5,50	33,00	Mann-Whitney U	12,000
	2	6	7,50	45,00	Wilcoxon W	33,000
	Total	12			Z	-,964
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,335
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394[a]
[KBE/cm²]	1	6	8,00	48,00	Mann-Whitney U	9,000
	3	6	5,00	30,00	Wilcoxon W	30,000
	Total	12			Z	-1,446
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,148
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,089
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.16: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	2	6	8,33	50,00	Mann-Whitney U	7,000
	3	6	4,67	28,00	Wilcoxon W	28,000
	Total	12			Z	-1,761
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,078
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,093[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	5	6	9,00	54,00	Mann-Whitney U	3,000
	6	6	4,00	24,00	Wilcoxon W	24,000
	Total	12			Z	-2,678
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.17: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm^2]
[KBE/cm^2]	3	6	8,00	48,00	Mann-Whitney U	9,000
	4	6	5,00	30,00	Wilcoxon W	30,000
	Total	12			Z	-1,441
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,150
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/cm^2]	3	6	8,00	48,00	Mann-Whitney U	9,000
	5	6	5,00	30,00	Wilcoxon W	30,000
	Total	12			Z	-1,441
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,150
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/cm^2]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	4	6	7,08	42,50	Mann-Whitney U	14,500
	5	6	5,92	35,50	Wilcoxon W	35,500
	Total	12			Z	-,563
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,573
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/cm^2]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.18: **Statistische Auswertung [KBE/cm^2] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

10.12 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit S. aureus ATCC 25923 in α-MEM + 20 % FBS über 24 Stunden(Kapitel 5.3.2)

Überstand	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	110	69	14	4,1	0,12	$1,4x10^{-5}$
2	90	68	16	1,1	0,5	$6,9x10^{-4}$
3	120	48	28	11	0,5	$6,9x10^{-4}$
4	90	160	90	2,5	4,0	$2,8x10^{-5}$
5	100	97	62	1,6	3,7	$6,9x10^{-4}$
6	83	130	76	14	2,1	$6,7x10^{-4}$
[%]						
Mittelwert	**100**	**95**	**48**	**5,6**	**1,8**	**$4,6x10^{-4}$**
SA	**16**	**43**	**33**	**5,3**	**1,7**	**$3,4x10^{-4}$**

Tabelle 10.19: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung (α-MEM + 20 % FBS)**

Anhaftend	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	95	170	44	1,3	0,14	0
2	84	55	33	1,7	0,63	0
3	84	150	17	9,0	1,5	0
4	63	73	29	0,63	1,1	0
5	150	150	27	1,9	2,1	0
6	130	36	25	8	0,84	0
[%]						
Mittelwert	**100**	**100**	**29**	**3,8**	**1**	**0**
SA	**31**	**56**	**9**	**3,7**	**0,68**	**0**

Tabelle 10.20: **Errechnete KBE/cm^2 [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen, anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall (Inkubation in α-MEM + 20 % FBS)**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	8,33	50,00	Mann-Whitney U	7,000
	2	6	4,67	28,00	Wilcoxon W	28,000
	Total	12			Z	-1,777
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,076
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,093[a]
[KBE/ml]	1	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	3	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,580
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.21: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	7,75	46,50	Mann-Whitney U	10,500
	3	6	5,25	31,50	Wilcoxon W	31,500
	Total	12			Z	-1,205
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,228
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.22: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	9,42	56,50	Mann-Whitney U	,500
	4	6	3,58	21,50	Wilcoxon W	21,500
	Total	12			Z	-2,807
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	4	6	8,08	48,50	Mann-Whitney U	8,500
	5	6	4,92	29,50	Wilcoxon W	29,500
	Total	12			Z	-1,527
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,127
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,132[a]
[KBE/ml]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.23: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	1	6	6,08	36,50	Mann-Whitney U	15,500
	2	6	6,92	41,50	Wilcoxon W	36,500
	Total	12			Z	-,407
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,684
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,083
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.24: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/cm^2]	2	6	9,33	56,00	Mann-Whitney U	1,000
	3	6	3,67	22,00	Wilcoxon W	22,000
	Total	12			Z	-2,741
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004[a]
[KBE/cm^2]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,903
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,903
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,102
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	5	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.25: **Statistische Auswertung [KBE/cm^2] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/cm^2]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm^2]	4	6	8,08	48,50	Mann-Whitney U	8,500
	5	6	4,92	29,50	Wilcoxon W	29,500
	Total	12			Z	-1,524
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,128
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,132[a]
[KBE/cm^2]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-3,077
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.26: **Statistische Auswertung [KBE/cm^2] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: α-MEM + 20 % FBS.**

10.23 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit MRSA 27065 und RPMI 1640 + 10% FBS über 24 Stunden (Kapitel 5.3.2)

Überstand	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	190	180	16	14	0,057	$1,9x10^{-4}$
2	100	100	15	19	9,3	$1,4x10^{-4}$
3	190	140	14	8,7	0,26	0
4	47	43	7,9	9,3	0	0
5	40	34	5,9	9,3	0	$1,7x10^{-5}$
6	37	58	8,5	11	0	$9,3x10^{-6}$
[%]						
Mittelwert	**100**	**93**	**11**	**12**	**1,6**	**$5,9x10^{-5}$**
SA	**71**	**58**	**4,2**	**3,9**	**3,8**	**$8,3x10^{-5}$**

Tabelle 10.27: **Errechnete KBE/ml [%] von *MRSA* 27065 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Anhaftend	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	140	71	4,4	9,9	$4,6x10^{-3}$	$4,6x10^{-3}$
2	230	80	8,3	7,4	7,6	0
3	140	320	5,5	32	0,15	$4,6x10^{-3}$
4	15	46	11	7,8	$4,6x10^{-3}$	0
5	68	37	2,5	2,5	0	0
6	9,7	31	3,7	8,3	0	$6,9x10^{-3}$
[%]						
Mittelwert	**100**	**97**	**6,0**	**11**	**1,3**	**$2,7x10^{-3}$**
SA	**85**	**110**	**3,3**	**11**	**3,1**	**$3,1x10^{-3}$**

Tabelle 10.28: **Errechnete KBE/cm^2 [%] von *MRSA* 27065 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen, anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	7,25	43,50	Mann-Whitney U	13,500
	2	6	5,75	34,50	Wilcoxon W	34,500
	Total	12			Z	-,723
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,470
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.29: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,903
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	7,00	42,00	Mann-Whitney U	15,000
	6	6	6,00	36,00	Wilcoxon W	36,000
	Total	12			Z	-,498
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,618
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.30: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	5,92	35,50	Mann-Whitney U	14,500
	4	6	7,08	42,50	Wilcoxon W	35,500
	Total	12			Z	-,562
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,574
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/ml]	3	6	9,00	54,00	Mann-Whitney U	3,000
	5	6	4,00	24,00	Wilcoxon W	24,000
	Total	12			Z	-2,419
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,016
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	4	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	5	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,599
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/ml]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.31: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	1	6	6,67	40,00	Mann-Whitney U	17,000
	2	6	6,33	38,00	Wilcoxon W	38,000
	Total	12			Z	-,160
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,873
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,33	56,00	Mann-Whitney U	1,000
	3	6	3,67	22,00	Wilcoxon W	22,000
	Total	12			Z	-2,727
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,08	54,50	Mann-Whitney U	2,500
	4	6	3,92	23,50	Wilcoxon W	23,500
	Total	12			Z	-2,491
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[2]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,898
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,913
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.32: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen]. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	4	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,562
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	5	6	7,33	44,00	Mann-Whitney U	13,000
	6	6	5,67	34,00	Wilcoxon W	34,000
	Total	12			Z	-,846
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,397
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.33: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2]. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	3	6	5,50	33,00	Mann-Whitney U	12,000
	4	6	7,50	45,00	Wilcoxon W	33,000
	Total	12			Z	-,964
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,335
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394[a]
[KBE/cm²]	3	6	8,83	53,00	Mann-Whitney U	4,000
	5	6	4,17	25,00	Wilcoxon W	25,000
	Total	12			Z	-2,250
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,024
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,026[a]
[KBE/cm²]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/cm²]	4	6	9,17	55,00	Mann-Whitney U	2,000
	5	6	3,83	23,00	Wilcoxon W	23,000
	Total	12			Z	-2,571
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,010
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/cm²]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,908
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.34: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI. Testkeim: *MRSA* 27065, Nährmedium: RPMI 1640 + 10% FBS.**

10.24 Adhäsions-/Proliferationsversuche mit *S. aureus* ATCC 25923 in RPMI 1640 +10% FBS über 7 Tage(Kapitel 5.3.3)

Überstand	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	TiAl6V4	TiO_2	Cu- TiO_2	2xCu- TiO_2	3xCu- TiO_2	4xCu- TiO_2
Probe1	65	110	11	0,32	0,011	0
2	81	150	21	0,16	$4,2x10^{-4}$	$1,2x10^{-3}$
3	97	56	20	3,1	0,27	0
4	81	65	39	0,81	0,84	$1,1x10^{-3}$
5	180	97	37	0,41	1	$1,6x10^{-3}$
6	97	110	36	42	16	$2,6x10^{-3}$
[KBE/ml]						
Mittelwert	100	99	27	7,8	3,1	1,1E-03
SA	40	34	12	17	6,5	1,0E-03

Tabelle 10.35: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Tag 3						
Überstand	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Oberfläche	TiAl6V4	TiO_2	Cu- TiO_2	2xCu- TiO_2	3xCu- TiO_2	4xCu- TiO_2
Probe1	120	12	61	11	0,73	0
2	120	98	49	1,1	34	0,98
3	98	150	150	24	37	$9,8x10^{-5}$
4	73	61	86	12	17	0,73
5	86	37	73	11	15	3,2
6	98	73	98	61	16	0,11
[KBE/ml]						
Mittelwert	100	71	86	20	20	0,83
SA	20	47	35	21	13	1,2

Tabelle 10.36: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 72 stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Tag 5						
Überstand	**Gruppe 1**	**Gruppe 2**	**Gruppe 3**	**Gruppe 4**	**Gruppe 5**	**Gruppe 6**
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	12	84	160	48	36	24
2	72	170	60	48	12	26
3	130	600	60	72	96	36
4	130	170	240	240	140	13
5	110	200	110	130	120	13
6	140	96	48	180	12	13
[KBE/ml]						
Mittelwert	**100**	**220**	**110**	**120**	**70**	**21**
SA	**50**	**190**	**75**	**79**	**58**	**9,5**

Tabelle 10.37: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 120 stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Tag 7						
Überstand	**Gruppe 1**	**Gruppe 2**	**Gruppe 3**	**Gruppe 4**	**Gruppe 5**	**Gruppe 6**
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	67	67	400	130	67	0,33
2	33	33	230	100	33	100
3	33	$1x10^3$	330	400	130	1,3
4	67	67	100	$1,8x10^3$	470	170
5	170	67	300	300	530	230
6	230	330	300	200	$1,3x10^3$	270
[KBE/ml]						
Mittelwert	**100**	**260**	**280**	**480**	**420**	**130**
SA	**82**	**380**	**100**	**640**	**480**	**110**

Tabelle 10.38: **Errechnete KBE/ml [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 168 stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen im Überstand der Nährlösung**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 1	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	6,25	37,50	Mann-Whitney U	16,500
	2	6	6,75	40,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,243
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,808
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,903
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.39: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] nach 24-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 1	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	3	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,898
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	8,83	53,00	Mann-Whitney U	4,000
	6	6	4,17	25,00	Wilcoxon W	25,000
	Total	12			Z	-2,250
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,024
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,026[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.40: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2] nach 24-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 1	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	8,50	51,00	Mann-Whitney U	6,000
	4	6	4,50	27,00	Wilcoxon W	27,000
	Total	12			Z	-1,922
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,055
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065[a]
[KBE/ml]	3	6	9,33	56,00	Mann-Whitney U	1,000
	5	6	3,67	22,00	Wilcoxon W	22,000
	Total	12			Z	-2,722
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	4	6	7,25	43,50	Mann-Whitney U	13,500
	5	6	5,75	34,50	Wilcoxon W	34,500
	Total	12			Z	-,722
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,470
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
[KBE/ml]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.41: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI nach 24-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 3	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	7,92	47,50	Mann-Whitney U	9,500
	2	6	5,08	30,50	Wilcoxon W	30,500
	Total	12			Z	-1,376
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,169
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/ml]	1	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	3	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,135
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,256
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	4	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,898
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,898
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	1	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.42: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] nach 72-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 3	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	5,83	35,00	Mann-Whitney U	14,000
	3	6	7,17	43,00	Wilcoxon W	35,000
	Total	12			Z	-,645
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,519
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/ml]	2	6	8,83	53,00	Mann-Whitney U	4,000
	4	6	4,17	25,00	Wilcoxon W	25,000
	Total	12			Z	-2,254
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,024
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,026[a]
[KBE/ml]	2	6	8,58	51,50	Mann-Whitney U	5,500
	5	6	4,42	26,50	Wilcoxon W	26,500
	Total	12			Z	-2,009
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,045
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	9,08	54,50	Mann-Whitney U	2,500
	6	6	3,92	23,50	Wilcoxon W	23,500
	Total	12			Z	-2,491
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.43: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2] nach 72-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 3	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	9,25	55,50	Mann-Whitney U	1,500
	4	6	3,75	22,50	Wilcoxon W	22,500
	Total	12			Z	-2,651
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	5	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,887
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,882
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	4	6	5,83	35,00	Mann-Whitney U	14,000
	5	6	7,17	43,00	Wilcoxon W	35,000
	Total	12			Z	-,643
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,520
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/ml]	4	6	9,33	56,00	Mann-Whitney U	1,000
	6	6	3,67	22,00	Wilcoxon W	22,000
	Total	12			Z	-2,727
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.44: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI nach 72-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 5	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	4,83	29,00	Mann-Whitney U	8,000
	2	6	8,17	49,00	Wilcoxon W	29,000
	Total	12			Z	-1,607
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,108
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,132[a]
[KBE/ml]	1	6	6,58	39,50	Mann-Whitney U	17,500
	3	6	6,42	38,50	Wilcoxon W	38,500
	Total	12			Z	-,080
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,936
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/ml]	1	6	6,25	37,50	Mann-Whitney U	16,500
	4	6	6,75	40,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,243
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,808
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/ml]	1	6	7,42	44,50	Mann-Whitney U	12,500
	5	6	5,58	33,50	Wilcoxon W	33,500
	Total	12			Z	-,890
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,373
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394[a]
[KBE/ml]	1	6	8,50	51,00	Mann-Whitney U	6,000
	6	6	4,50	27,00	Wilcoxon W	27,000
	Total	12			Z	-1,928
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,054
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.45: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] nach 120-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 5	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	8,00	48,00	Mann-Whitney U	9,000
	3	6	5,00	30,00	Wilcoxon W	30,000
	Total	12			Z	-1,446
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,148
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/ml]	2	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	4	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,125
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,261
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
[KBE/ml]	2	6	8,58	51,50	Mann-Whitney U	5,500
	5	6	4,42	26,50	Wilcoxon W	26,500
	Total	12			Z	-2,012
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,044
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041[a]
[KBE/ml]	2	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	5	6	7,42	44,50	Mann-Whitney U	12,500
	6	6	5,58	33,50	Wilcoxon W	33,500
	Total	12			Z	-,885
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,376
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.46: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2] nach 120-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 5	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	6,42	38,50	Mann-Whitney U	17,500
	4	6	6,58	39,50	Wilcoxon W	38,500
	Total	12			Z	-,081
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,936
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/ml]	3	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	5	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,125
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,261
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
[KBE/ml]	3	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
[KBE/ml]	4	6	7,83	47,00	Mann-Whitney U	10,000
	5	6	5,17	31,00	Wilcoxon W	31,000
	Total	12			Z	-1,286
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,199
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[q]
[KBE/ml]	4	6	9,50	57,00	Mann-Whitney U	,000
	6	6	3,50	21,00	Wilcoxon W	21,000
	Total	12			Z	-2,892
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.47: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI nach 120-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 7	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	1	6	5,83	35,00	Mann-Whitney U	14,000
	2	6	7,17	43,00	Wilcoxon W	35,000
	Total	12			Z	-,669
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,503
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/ml]	1	6	3,92	23,50	Mann-Whitney U	2,500
	3	6	9,08	54,50	Wilcoxon W	23,500
	Total	12			Z	-2,500
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009[a]
[KBE/ml]	1	6	4,33	26,00	Mann-Whitney U	5,000
	4	6	8,67	52,00	Wilcoxon W	26,000
	Total	12			Z	-2,089
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,037
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041[a]
[KBE/ml]	1	6	5,17	31,00	Mann-Whitney U	10,000
	5	6	7,83	47,00	Wilcoxon W	31,000
	Total	12			Z	-1,299
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,194
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[a]
[KBE/ml]	1	6	6,17	37,00	Mann-Whitney U	16,000
	6	6	6,83	41,00	Wilcoxon W	37,000
	Total	12			Z	-,323
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,747
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.48: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 7	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	2	6	5,25	31,50	Mann-Whitney U	10,500
	3	6	7,75	46,50	Wilcoxon W	31,500
	Total	12			Z	-1,214
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,225
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240[a]
[KBE/ml]	2	6	5,00	30,00	Mann-Whitney U	9,000
	4	6	8,00	48,00	Wilcoxon W	30,000
	Total	12			Z	-1,451
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,147
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,180[a]
[KBE/ml]	2	6	5,67	34,00	Mann-Whitney U	13,000
	5	6	7,33	44,00	Wilcoxon W	34,000
	Total	12			Z	-,816
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,414
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
[KBE/ml]	2	6	6,83	41,00	Mann-Whitney U	16,000
	6	6	6,17	37,00	Wilcoxon W	37,000
	Total	12			Z	-,323
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,747
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/ml]	5	6	7,67	46,00	Mann-Whitney U	11,000
	6	6	5,33	32,00	Wilcoxon W	32,000
	Total	12			Z	-1,121
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,262
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.49: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2] nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
Tag 7	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/ml]
[KBE/ml]	3	6	6,67	40,00	Mann-Whitney U	17,000
	4	6	6,33	38,00	Wilcoxon W	38,000
	Total	12			Z	-,162
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,871
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/ml]	3	6	6,33	38,00	Mann-Whitney U	17,000
	5	6	6,67	40,00	Wilcoxon W	38,000
	Total	12			Z	-,160
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,873
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/ml]	3	6	8,67	52,00	Mann-Whitney U	5,000
	6	6	4,33	26,00	Wilcoxon W	26,000
	Total	12			Z	-2,093
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,036
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041[a]
[KBE/ml]	4	6	6,75	40,50	Mann-Whitney U	16,500
	5	6	6,25	37,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,241
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,810
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/ml]	4	6	8,08	48,50	Mann-Whitney U	8,500
	6	6	4,92	29,50	Wilcoxon W	29,500
	Total	12			Z	-1,524
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,128
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,132[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.50: **Statistische Auswertung [KBE/ml im Überstand der Nährlösung] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Tag 7						
Anhaftend	**Gruppe 1**	**Gruppe 2**	**Gruppe 3**	**Gruppe 4**	**Gruppe 5**	**Gruppe 6**
Oberfläche	**TiAl6V4**	**TiO_2**	**Cu- TiO_2**	**2xCu- TiO_2**	**3xCu- TiO_2**	**4xCu- TiO_2**
Probe1	19	32	28	38	38	0
2	19	13	56	110	38	38
3	38	6,1	19	38	75	2,8
4	94	40	110	19	130	94
5	150	280	150	75	210	94
6	280	240	75	94	75	130
[%]						
Mittelwert	**100**	**100**	**73**	**63**	**94**	**60**
SA	**100**	**120**	**50**	**37**	**65**	**54**

Tabelle 10.51: **Errechnete KBE/cm^2 [%] von *S. aureus* ATCC 25923 nach 168 stündiger Inkubation mit verschiedenartig beschichteten Plättchen, anhaftend an die Plättchen nach Ablösung durch Ultraschall**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm²]
[KBE/cm²]	1	6	6,50	39,00	Mann-Whitney U	18,000
	2	6	6,50	39,00	Wilcoxon W	39,000
	Total	12			Z	,000
					Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000[a]
[KBE/cm²]	1	6	6,58	39,50	Mann-Whitney U	17,500
	3	6	6,42	38,50	Wilcoxon W	38,500
	Total	12			Z	-,081
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,936
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/cm²]	1	6	6,75	40,50	Mann-Whitney U	16,500
	4	6	6,25	37,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,244
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,807
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/cm²]	1	6	6,17	37,00	Mann-Whitney U	16,000
	5	6	6,83	41,00	Wilcoxon W	37,000
	Total	12			Z	-,324
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,746
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/cm²]	1	6	7,25	43,50	Mann-Whitney U	13,500
	6	6	5,75	34,50	Wilcoxon W	34,500
	Total	12			Z	-,728
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,466
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.52: **Statistische Auswertung [KBE/cm²] der Gruppe I [$TiAl_6V_4$] gegenüber den Gruppen II, III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm^2]
[KBE/cm^2]	2	6	6,33	38,00	Mann-Whitney U	17,000
	3	6	6,67	40,00	Wilcoxon W	38,000
	Total	12			Z	-,161
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,872
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
[KBE/cm^2]	2	6	6,25	37,50	Mann-Whitney U	16,500
	4	6	6,75	40,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,241
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,810
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/cm^2]	2	6	5,83	35,00	Mann-Whitney U	14,000
	5	6	7,17	43,00	Wilcoxon W	35,000
	Total	12			Z	-,643
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,520
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/cm^2]	2	6	7,00	42,00	Mann-Whitney U	15,000
	6	6	6,00	36,00	Wilcoxon W	36,000
	Total	12			Z	-,481
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,630
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699[a]
[KBE/cm^2]	5	6	7,25	43,50	Mann-Whitney U	13,500
	6	6	5,75	34,50	Wilcoxon W	34,500
	Total	12			Z	-,730
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,466
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.53: **Statistische Auswertung [KBE/cm^2] der Gruppe II [TiO_2] gegenüber den Gruppen III, IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe V [3xCu-TiO_2] gegenüber der Gruppe VI [4xCu-TiO_2] nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

Ranks					Test Statistics[b]	
	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks		[KBE/cm^2]
[KBE/cm^2]	3	6	6,75	40,50	Mann-Whitney U	16,500
	4	6	6,25	37,50	Wilcoxon W	37,500
	Total	12			Z	-,242
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,809
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818[a]
[KBE/cm^2]	3	6	5,83	35,00	Mann-Whitney U	14,000
	5	6	7,17	43,00	Wilcoxon W	35,000
	Total	12			Z	-,646
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,518
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589[a]
[KBE/cm^2]	3	6	7,00	42,00	Mann-Whitney U	15,000
	6	6	6,00	36,00	Wilcoxon W	36,000
	Total	12			Z	-,481
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,630
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699[a]
[KBE/cm^2]	4	6	5,67	34,00	Mann-Whitney U	13,000
	5	6	7,33	44,00	Wilcoxon W	34,000
	Total	12			Z	-,821
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,412
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485[a]
[KBE/cm^2]	4	6	6,67	40,00	Mann-Whitney U	17,000
	6	6	6,33	38,00	Wilcoxon W	38,000
	Total	12			Z	-,162
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,871
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937[a]
					a Not corrected for ties.	
					b Grouping Variable: Gruppe	

Tabelle 10.54: **Statistische Auswertung [KBE/cm^2] der Gruppe III [1xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen IV, V und VI [mit verschiedenartigen Beschichtungen] sowie der Gruppe IV [2xCu-TiO_2] gegenüber den Gruppen V und VI nach 168-stündiger Inkubation. Testkeim: *S. aureus* ATCC 25923, Nährmedium: RPMI 1640 +10% FBS.**

11. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Maximilian Haenle
Geburtstag- und ort:	16.10.1978 in München
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schul- und Berufsausbildung:

seit Mai '07	Assistenzarzt an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock
Juli '06 – April '07	Assistenzarzt auf der Perioperativen Intensivstation (PIT 1) der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Rostock
Januar '05 - Juni '06	Assistenzarzt an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock
Herbst '04	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
Oktober '03 - Oktober '04	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus München Bogenhausen (Chirurgie), Royal North Shore Hospital Sydney Australien (Innere Medizin), Klinikum Rechts der Isar München (Innere Medizin) und am Hospital Traumatológico Concepción Chile (Orthopädie)
Herbst '03	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Zweites Staatsexamen)
Herbst '01	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Erstes Staatsexamen)
Oktober '00 - November '03	Klinisches Studium an der TU München
Herbst '00	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
November '98 – Oktober '00	Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
Juni '97	A-Levels am Bradfield College, Reading, Berkshire, UK

12. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Reiner Gradinger, der es mir ermöglichte an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Technischen Universität München die vorliegende Dissertation durchzuführen.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier, für die ursprüngliche Vergabe des Themas und der damit verbundenen Möglichkeit, die Dissertation durchzuführen, danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Hans Gollwitzer, dem Betreuer meiner Dissertation, für die kompetente und engagierte Betreuung während des praktischen Teils der Arbeit, und für die anregende Diskussion und den überaus engagierten Einsatz während der Korrektur.

Ausserdem möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader bedanken – obwohl er nicht an der Vergabe des Themas beteiligt war half er maßgeblich bei der Korrektur der Dissertation mit. Ausserdem habe ich von ihm das Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten gelernt – wofür ich PD Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader ganz besonders dankbar bin.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Ines Kappstein für die Möglichkeit der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen im Institut für Klinikhygiene der Technischen Universität München bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr.-Ing. Günter Ziegler und Dipl.-Chem. Frank Heidenau vom Friedrich-Baur-Forschungsinstitut in Bayreuth. Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich für die Herstellung der Plättchen und die Möglichkeit zur Verwendung der Gewebezelluntersuchungsergebnisse bedanken.

Außerdem Danke ich Tanja und meiner Familie für ihre Geduld, Unterstützung und Anteilnahme!