

Aus der
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Dipl. Ing. E.-J. Richter

Auswirkungen von Beschichtungen auf die Oberflächenstruktur und
Keimbesiedlung von Silikonen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu
Würzburg

vorgelegt von
Alexander Florian Kutz
aus Bad Pyrmont

Würzburg, November 2004

Referent: Prof. Dr. med. dent. A. Renk

Koreferent: Prof. Dr.–Ing. R. Thull

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2005

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner lieben Familie
in Dankbarkeit
gewidmet

	Inhaltsverzeichnis	Seite
1	Einleitung	1
1.1	Definition der Bioverträglichkeit	1
1.2	Obturator, Resektionskörper und Epithese	2
1.2.1	Obturator und Resektionskörper	3
1.2.2	Die Epithese	4
1.3	Problematik der Silikonformteile	4
1.4	Die Fremdkörper-assoziierte Infektion	5
1.5	Bakterien und Biofilme	7
1.5.1	Zelluläre Adhäsion	8
1.5.2	Interzelluläre Adhäsion	9
1.6	Immunreaktion und Entzündung	10
1.7	Nachweismethoden von Bakterien	10
1.7.1	Kurzer Überblick der Nachweismethoden	11
1.7.2	Sichtbarmachen von Bakterien	11
1.8	Verhinderung der Ausbildung eines Biofilms	12
1.9	Werkstoff Silikon	13
1.10	Oberflächenmodifikationen	15
1.10.1	Oberflächenmodifikation des Silikons mit einer Titan-Iridium-Schicht	15
1.10.2	Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht	16
1.11	Problemstellung	17
2	Material und Methode	18
2.1	Herstellung der Probekörper	18
2.1.1	Herstellung der Gipsform	18
2.1.2	Silikon und Polymerisation	19
2.2	Oberflächenmodifikationen	20
2.2.1	Oberflächenmodifikation mit einer Titan-Iridium-Schicht	20
2.2.2	Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht	20
2.3	Oberflächencharakterisierung	21
2.4	Vorbereitungen der Probekörper für die Rasterelektronenmikroskopie	21
2.4.1	Fixierung und Entwässerung	21

2.4.2	Kritisch-Punkt-Trocknung (Critical Point Drying – CPD)	22
2.4.3	Goldbedampfung/Sputtern	23
2.5	Vorbereitende Maßnahmen für die mikrobiologischen Analysen	24
2.5.1	Bakterienstämme	24
2.5.2	Ansetzen des Nährmediums	24
2.5.3	Züchten der Bakterienkulturen	25
2.5.4	Vorbereitung der Probekörper	25
2.6	Mikrobiologische Untersuchungen	25
2.6.1	Gemeinsame Vorbereitungsprozedur – Anzüchten der Bakterien auf den Probekörpern	26
2.6.2	Die klassische Analyse	27
2.6.2.1	Waschen der Probekörper im Nährmedium	27
2.6.2.2	Ablösen der Bakterien von den Probekörpern	28
2.6.2.3	Verdünnungsreihe	28
2.6.2.4	Ausplattieren der verdünnten Bakterienlösungen	29
2.6.3	Ermittlung der Keimbesiedelung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs	30
2.6.3.1	Waschen der Probekörper und Fixieren der Bakterien	30
2.6.3.2	Färben der Probekörper mit SYBR [®] Green I	31
2.6.4	Analyse im Fluoreszenzmessgerät SPECTRAFluor Plus	32
2.6.4.1	Einstellungen des Fluoreszenzmessgeräts	33
2.7	Visualisierung der gemessenen Werte mit einem Fluoreszenzmikroskop	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Oberflächencharakterisierung der Silikone und ihrer Beschichtungen	35
3.1.1	Natürliche Silikonoberfläche	35
3.1.2	Natürliche Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs	36
3.1.3	Titan-Iridium beschichtete Silikonoberfläche	37
3.1.4	Titan-Iridium beschichtete Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs	38
3.1.5	Amphoter beschichtete Silikonoberfläche	39
3.1.6	Amphoter beschichtete Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs	40

3.2	Ergebnisse der klassischen Analyse	40
3.3	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen	42
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Bilder	47
4	Diskussion	50
4.1	Kritik an der Auswahl der Silikone	50
4.2	Kritik an der Auswahl der Bakterien	50
4.3	Kritik der Methoden	51
4.3.1	Diskussion der Analytik	51
4.3.2	Diskussion der Bakterienablösung von der Oberfläche	52
4.3.3	Silikone im Fluoreszenzmessgerät	52
4.3.4	Der Farbstoff SYBR [®] Green I	53
4.3.5	Diskussion der Fluoreszenzmessung	54
4.4	Kritik an der Auswahl der Beschichtungen	54
4.4.1	Oberflächenmodifikation mit einer Titan-Iridium-Schicht	54
4.4.2	Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht	55
4.5.	Ergebniskritik	56
4.6	Weitere mögliche Denkansätze	58
4.7	Schlussfolgerungen und Prognose	58
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	69
7.1	Materialliste	69
7.2	Tabellen	75
	Curriculum Vitae	
	Danksagung	

1 Einleitung

Die Implantation körperfremder Materialien in der modernen Medizin gewinnt heutzutage immer mehr an Bedeutung, um nach angeborenen Körperdefekten, Traumen, Tumorsektionen oder auch in der plastisch-ästhetischen Chirurgie, Körpersubstanzdefizite wieder herzustellen oder eingeschränkte oder verlorene Körperfunktionen zu ergänzen oder zu rekonstruieren.

1.1 Definition der Bioverträglichkeit

Alle implantierbaren Materialien müssen bioverträglich sein. Für den Begriff „bioverträglich“ werden je nach Autor unterschiedliche Definitionen verwendet. Im Jahre 1986 wurde von der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien eine Konferenz zur Vereinheitlichung der Terminologie einberufen, auf der folgende Definitionen festgelegt wurden (WILLIAMS, 1988):

„biocompatibility“: „The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application.“

„biomaterial“: „A non-viable material, used in a medical device, intended to interact with biological systems.“

Nach WILLIAMS (1988) werden folgende Forderungen an Biomaterialien gestellt:

- nicht toxisch
- es dürfen keine Entzündungsreaktionen oder Allergien ausgelöst werden
- bei Langzeitkontakt gutes Verheilen, das heißt feste Verbindung zwischen Gewebe und Implantat, da es sonst durch auftretende Scherkräfte zu Zellschädigungen und Infektionen kommen kann
- bei Blutkontakt hämokompatibel
- bio- bzw. korrosionsstabil
- sterilisierbar

Allerdings erfüllen Biomaterialien nicht immer alle genannten Forderungen. Die Verwendung bioverträglicher Materialien in der Medizin hat neben zahlreichen Vorteilen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, einige entscheidende Nachteile. Einer davon ist das mögliche Auftreten einer sogenannten Fremdkörper-assoziierten oder Implantat-assoziierten Infektion (GRISTINA 1987). Die Inzidenz dieser Infektionen schwankt von 4% bei Hüftendoprothesen bis hin zu 100% für Urinkatheter nach dreiwöchigem Einsatz (DANKERT et al. 1986, DENSTED et al. 1998). Der Grund derartiger Infektionen ist in der bakteriellen Besiedlung der Oberfläche dieser Biomaterialien zu suchen.

Aber nicht nur bei vollständig implantierten Biomaterialien, sondern auch beim Einsatz von entfernbar Implantaten wie Stimmbandprothesen, Epithesen, Obturatoren oder Resektionskörpern, die in einem nicht sterilen Gebiet implantiert werden und meistens aus dem Werkstoff Silikon angefertigt sind, ist die Verweildauer auf Grund nicht mehr tolerierbarer Besiedlung mit Mikroorganismen beschränkt. Im Fall der Stimmbandprothesen ist daher die Einsatzzeit auf drei bis vier Monate limitiert (WILSON 1996). Erfahrungen aus der Praxis der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik zeigen, dass ähnliche, wenn nicht gar kürzere Einsatzzeiten für inkorporierte Silikonkörper zu verzeichnen sind.

1.2 Obturator, Resektionskörper und Epithese

Bereits in vorchristlichen Kulturkreisen ist der Ersatz von Körperteilen durch künstliche Anfertigungen nachgewiesen worden. Die Anfänge der Gesichtsprothetik reichen vermutlich bis ins 2. Jahrhundert n. Chr. zurück. Hierbei handelte es sich bedingt durch Krankheit oder Trauma verloren gegangene Körperteile, wie zum Beispiel Nasen und Ohren. Diese wurden oft kunstvoll mit unterschiedlichsten Materialien, die aber größtenteils organischen Ursprungs und somit vergänglich waren, nachgebildet, um die körperliche Entstellung zu verbergen. Erst im 16. Jahrhundert begann mit dem französischen Chirurgen Ambroise Paré die Ära der „modernen“ Epithetik. (RENK 1997)

1.2.1 Obturator und Resektionskörper

Der Obturator (lat. obturare: verstopfen) ist ein prothetischer Ersatz zum Verschluss von angeborenen Körperöffnungen und Gewebsdefekten. Vor allem dient ein Obturator als Verschlussplatte, z.B. zum Verschließen von Gaumenspalten und Gaumendefekten, um die natürliche Sprache wiederherzustellen.

Ein Resektionskörper (lat. resecare: wegschneiden) hingegen ist ein prothetischer Ersatz, der nach Resektionsoperationen wie Tumor- und Traumaoperationen als defektprothetische Maßnahme eingesetzt wird und fehlende Gesichtsteile ergänzt. Im Oberkiefer dichtet ein Resektionskörper die Mundhöhle funktionell von der Nasenhöhle ab und steht in engem Kontakt mit den Defekträndern am Gaumen sowie an Wange und Lippe.

Der Einfachheit halber wird im folgenden zwischen dem Obturator und dem Resektionskörper nicht mehr unterschieden und nur noch der Begriff „Obturator“ verwendet.

Mechanisch soll der Obturator die Nahrungsaufnahme erleichtern und das Eindringen von Speisen in den Nasenraum verhindern; zudem obliegt ihm die Stützung der angrenzenden Gesichtsteile. Respiratorisch versetzt er den Patienten in die Lage, Luftströme im Nasen- und Rachenraum willkürlich zu kontrollieren. Phonetisch dient der Obturator dazu, ungewollte suprapalatinale Resonanzen zum Verschwinden zu bringen, das heißt das Näseln zu beseitigen. Daher muss die anatomische Anpassung des Obturators bei der Phonation der sich kontrahierenden vorhandenen Restmuskulatur, bzw. Velum- und Rachenmuskulatur eine ausreichende Berührungsfläche haben.

Ferner wird ein Obturator zum Offenhalten von künstlich geschaffenen Körperhöhlen, beispielsweise bei Kieferzysten nach Zystostomien, eingesetzt. Dementsprechend ist er bei Zysten angezeigt, die durch ihre Größe oder Form bedingt nicht vollständig entfernt werden können.

Zweckmäßigerweise gibt es für Obturatoren unterschiedliche Werkstoffe. Zum einen wird er aus Polymethylmetacrylat oder Titan als „fester“ Obturator, zum anderen aus Silikon als „weicher“ oder „weichbleibender“ Obturator hergestellt.

Polymethylmetacrylat- oder Titanformteile sind nicht fest sitzende Obturatoren und müssen am Defekt gesichert werden, damit sie nicht von selbst aus der Körper- oder Knochenhöhle herausrutschen und vom Patienten versehentlich verschluckt werden. Hierbei können Klammern, Magnete oder Fadenverankerungen nützlich sein.

Das weiche oder weichbleibende Silikonformteil findet seine Verankerung in Unterschnitten des Defekts und benötigt selten spezielle Verankerungselemente. Der Silikonobturator kann entweder direkt in der Mundhöhle angefertigt oder mittels Abformung indirekt labortechnisch hergestellt werden. Er ist weich und wird daher vom Patienten viel angenehmer empfunden als der harte Obturator.

1.2.2 Die Epithese

Unter einer Epithese (gr. epithesis: herauflegen) versteht man ein individuell modelliertes Organersatzstück aus verschiedenen Materialien zur Deckung von Defekten, insbesondere im Gesicht. Es werden Nasen, Augen, Ohren, Wangen, Lippen und andere fehlende Gesichtsteile ergänzt. Der heutzutage am häufigsten verwendete Werkstoff ist das Silikon. Gegenüber anderen Werkstoffen bietet das weiche Silikon den wesentlichen Vorteil, sich dem angrenzenden Gewebe anzuschmiegen und ist somit für eine unauffällige und dichte Epithesenrandgestaltung ideal.

1.3 Problematik der Silikonformteile

Allen Silikonformteilen, die eine Verbindung zum Mund-, Nasen- und/oder Rachenraum aufweisen, ist die Problematik der raschen Keimbesiedlung gemein. Der ständige Kontakt mit Speichel und allen darin enthaltenen Inhaltsstoffen führt zu einer schnellen Kontamination mit Bakterien, Pilzen und Hefen (vgl.

Abbildung 1). Hierdurch entsteht innerhalb von kürzester Zeit auf und um den Silikonkörper ein keimbelastetes Milieu (LEEMING et al. 1998). Durch diese Keimbelastung kann es vermehrt zu Infektionen kommen.



Abbildung 1: Verkeimter Resektionskörper (nach 12 Wochen in situ)

1.4 Die Fremdkörper-assoziierte Infektion

Verantwortlich für die Fremdkörper-assoziierten Infektionen sind Mikroorganismen. Hauptsächlich gelten Bakterien als Verursacher derartiger Infektionen. Pilze und Hefen spielen diesbezüglich eine untergeordnete Rolle (GACESA 1998). Ein Vertreter dieser Spezies, *Staphylococcus epidermidis*, zählt heute zu den fünf häufigsten nosokomialen Infektionserregern und verursacht eine erhebliche Morbidität und Mortalität (MARTIN et al. 1989, RUPP et al. 1994). Obwohl er einen wesentlichen Bestandteil der kommensalen Flora der Haut und der Schleimhäute des immunkompetenten Menschen darstellt, weist er hier nur geringes pathogenes Potential auf (CHRISTENSEN et al. 1989, KLOOS 1997, NOBLE 1997).

Ein wesentliches Charakteristikum der Fremdkörper-assoziierten Infektion ist ihr chronischer Verlauf mit Erregerpersistenz (JACKSON und COCHARNE 1988). Eine häufig zu beobachtende klinische Resistenz der Erreger gegen Antibiotika, auch gegen solche, die in vitro als wirksam getestet wurden, machen regelmäßig die Entfernung des infizierten Implantats erforderlich (ARCHER 1994, COSTERTON et al.

1999, GILBERT et al. 1997, RAAD et al. 1998), was vielfach mit großen Leiden für den Patienten und hohen Kosten verbunden ist. Vermutlich steht die besondere Virulenz dieser sonst relativ harmlosen Erreger im Zusammenhang mit dem implantierten Fremdkörper (BUSSCHER et al. 1995). Besonders *Staphylococcus epidermidis* scheint eine ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonisation von Polymeroberflächen zu haben (BARTH et al. 1989). Der Zusammenhang zwischen der Produktion einer mukoiden Substanz durch Bakterien und ihrer Fähigkeit zur Kolonisation von Biomaterialien ist bekannt (BAYSTON et al. 1990 und 1996). Die Erreger stehen mit der Oberfläche des Biomaterials in engem Kontakt und bilden einen sogenannten Biofilm. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten Venenkathetern zeigen, dass Bakterien Polymeroberflächen in Form von adhärennten Biofilmen aus mehreren Zellschichten besiedeln können, die von Exopolysacchariden umhüllt sind. Diese werden als Schleim oder Glycocalyx bezeichnet (CHRISTENSEN et al. 1982, COSTERTON et al. 1999, FRANSON et al. 1984, LUDWICKA et al. 1984, MARRIE et al. 1984, PETERS et al. 1981).

Bei mikrobiologischen *in vitro* Versuchen mit unterschiedlichen *Staphylococcus epidermidis* Stämmen konnte festgestellt werden, dass nur ein Teil einen an Reagenzgläsern haftenden, makroskopisch sichtbaren Biofilm bildet, der morphologisch dem *in vivo* gebildeten sehr ähnlich ist (CHRISTENSEN et al. 1982 und 1985, HUSSIAN et al. 1992, SCHMIDT et al. 1986). Diesem bakteriellen Phänotyp wurde häufig der Begriff „Schleimbildner“ zugeordnet (CHRISTENSEN et al. 1982). Da jedoch der Begriff „Schleim“ bakterielle Exopolysaccharide bezeichnet, die nicht kovalent an die Zelloberfläche gebunden sind (HUSSIAN et al. 1993), und von verschiedenen Autoren der Begriff „Schleim“ für sehr unterschiedliche Erscheinungen verwendet wurde (BAYSTON und ROGERS 1990, CHRISTENSEN et al. 1982, HUSSIAN et al. 1993, PETERS et al. 1987), wird diese Eigenschaft heute meistens mit dem Begriff „Biofilmbildung“ bezeichnet. Es werden also „Biofilm-bildende“ Stämme von „Nicht-Biofilm-bildenden“ oder „Biofilm-negativen“ Stämmen unterschieden.

Um nun die Anzahl der Fremdkörper-assoziierten Infektionen zu minimieren, wäre eine denkbare Lösung, die Besiedlung der Biomaterialien mit Mikroorganismen

gar nicht erst entstehen zu lassen. Um das jedoch zu verwirklichen, ist ein genaues Wissen und Verständnis über Bakterien und deren Biofilmen erforderlich.

1.5 Bakterien und Biofilme

Am Beispiel von *Staphylococcus epidermidis* soll die Biofilmbildung kurz erläutert werden. Für die Pathogenität dieses Bakterienstamms ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung essentiell. Dies beweisen epidemiologische Untersuchungen, die zeigen, dass gemäß der Kriterien des sogenannten „Tube-Tests“ (CHRISTENSEN et al. 1982) Biofilm-bildende *Staphylococcus* Stämme wesentlich häufiger bei signifikanten Infektionen angetroffen werden als Biofilm-negative Stämme (CHRISTENSEN et al. 1982, DAVENPORT et al. 1987, DEIGHTON et al. 1990, DUNNE et al. 1987, ISHAK et al. 1985, YOUNGER et al. 1987, ZIEBUHR et al. 1997). Ein Biofilmbildender Phänotyp korrelierte mit einem häufigeren Therapieversagen, wenn Fremdkörper-assoziierte Infektionen ohne Entfernung des Implantats allein mit Antibiotika behandelt wurden (DAVENPORT et al. 1987, DIAZ-MITOMA et al. 1987, YOUNGER et al. 1987).

Die Entstehung eines Biofilms auf einer Polymeroberfläche ist in zwei wesentliche Abschnitte unterteilt: Zunächst erfolgt eine schnelle primäre Bindung einzelner Bakterienstämme an die Oberfläche eines Biomaterials. Als Pionierbakterien werden *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* Stämme identifiziert (CHRISTENSEN et al. 1989), gefolgt von gram-negativen Arten wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (BENGSTON et al. 1987, PRINTZEN 1996). Nach der Adhäsion dieser Bakterien an die Polymeroberfläche, proliferieren und akkumulieren sie sich in vielen Zellschichten (MACK 1999). Dazu bedarf es jedoch der Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion. In einer weiteren, späteren Phase kommt es zur Bildung der Glycocalyx, welche die Bakterien dann umschließt.

1.5.1 Zelluläre Adhäsion

Alle *Staphylococcus epidermidis* Stämme haben prinzipiell die Fähigkeit, an Polymeroberflächen zu adhären. In dieser ersten Phase besiedeln die Bakterien die Oberfläche einschichtig (vgl. Abbildung 2). Die primäre Bindung von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen ist ein komplexer Vorgang, an dem Oberflächenproteine wie das Staphylococcal surface protein 1 (Ssp 1) oder Fibrinogen binding protein (Fbe) beteiligt sind (ESPERSEN et al. 1990, HOGT et al. 1986, PASCUAL et al. 1986, TOJO et al. 1988). Ferner ist die Adhäsion nicht nur von Oberflächenproteinen abhängig, sondern auch von der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Bakterienoberfläche und Polymer (HOGT et al. 1985, LUDWICKA et al. 1984). Als zusätzliche allgemeine Faktoren sind physikalisch-chemischen Eigenschaften wie chemischer Aufbau und Ladung der Oberfläche des Polymers zu nennen (SPIJKER et al. 1999). Im individuellen Einzelfall ist auch eine Konditionierung mit Proteinen und dem infizierenden Organismus von Bedeutung. Daher ist es von entscheidender Wichtigkeit, an welchem Ort das Biomaterial implantiert, von welchen Geweben es umgeben und von welchen Körperflüssigkeiten es umspült wird (ESPERSEN et al. 1990, MÜLLER et al. 1991).

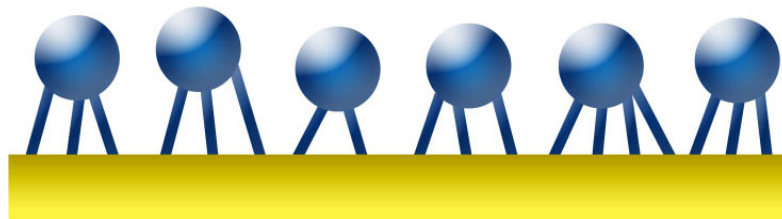


Abbildung 2: Erste Phase – zelluläre Adhäsion

Da sich die Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Polymeroberflächen durch Vorbehandlung der Bakterien mit Proteasen inhibieren lässt, ist bewiesen, dass hier Oberflächenproteine der Bakterien eine funktionelle Bedeutung haben (HERRMANN et al. 1988, PASCUAL et al. 1986). Befindet sich eine Polymeroberfläche in Kontakt mit Albumin, Plasma oder Serum, ist die bakterielle Adhäsion signifikant reduziert (ESPERSEN et al. 1990, HERRMANN et al. 1988, HOGT et al. 1985, PASCUAL et al. 1986, PETERS et al. 1987, SPIJKER et al. 1999, VAUDAUX et al. 1989).

Ein wichtiges Oberflächenprotein des *Staphylococcus epidermidis* Stamms RP62A ist ein Kapselpolysaccharid/Adhäsion (PS/A). Es dient als funktioneller Faktor für die primäre Adhäsion an Silastic-Kathetern (Tojo et al. 1988). Neben der Expression von PS/A, sind noch weitere Faktoren verantwortlich, die eine Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* RP62A an Polymeroberflächen begünstigen und stabilisieren, welche hier aber nicht näher besprochen werden sollen.

1.5.2 Interzelluläre Adhäsion

Eine weitere wesentliche Voraussetzung für die Akkumulation in einem vielschichtigen Biofilm ist die Fähigkeit der Bakterien, nicht nur an der Oberfläche zu haften, sondern auch untereinander adhäsive Kräfte auszuüben. In zahlreichen Versuchen wurden ein nach seiner Funktion beschriebenes interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion (PIA) (MACK et al. 1996) und einige weitere Proteine, wie das Accumulation associated protein (AAP), deren Existenz als Biofilm bildende Faktoren für die interzelluläre Adhäsion essentiell sind, entdeckt (MACK et al. 1994, 1996, 1996 und 1999, NEDELMANN et al. 1998).

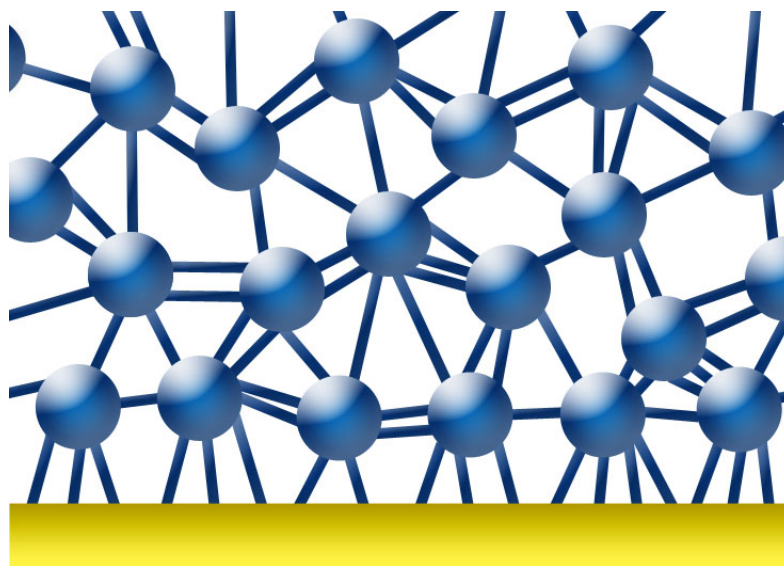


Abbildung 3: Zweite Phase – interzelluläre Adhäsion

Weitere Ausführungen zu diesen komplexen biochemischen Sachverhalten würden zu weit führen. Es ist jedoch festzuhalten, dass erfolgreich an eine

Oberfläche gebundene Bakterien, unabhängig von dem jeweils wirksamen Mechanismus, eine Basis für die spätere Manifestation eines Biofilms darstellen.

1.6 Immunreaktion und Entzündung

Nach der Implantation eines Biomaterials setzt sich der menschliche Körper natürlicherweise mit dem Fremdkörperimplantat auseinander. Es beginnt die Blutgerinnungskaskade, das Komplementsystem wird aktiviert, und es kommt zur Ausbildung eines Fibrinnetzes. Dabei findet eine Opsionierung der Antikörper des Biomaterials statt (REMES und WILLIAMS 1992, TANG und EATON 1995). Das hat wiederum zur Folge, dass das Immunsystem reagiert und eine Entzündung hervorruft (ANDERSON 1988, MOLLNES 1998). Erst nach Einkapselung des Implantats oder nach Heilung klingt diese Entzündung ab. Jedoch verbleibt in vielen Fällen die Grenzfläche zwischen Körper und Implantat in einem Zustand chronischer Entzündung. Nur wenige Metalle und Kunststoffe sind chemisch so inert, dass sie im warmen, feuchten und oxygenierten Milieu des lebenden Gewebes keine entzündungsauslösenden Substanzen wie beispielsweise Korrosionsprodukte, Weichmacher und Monomere freisetzen (DOUGHERTY und SIMMONS 1982, GRISTINA 1987, PLANCK 1993).

1.7 Nachweismethoden von Bakterien

Als zwischen den Jahren 1590 bis 1610 das Lichtmikroskop erfunden wurde, beschreibt der holländische Stadtbeamte Antoni van Leeuwenhoek 1676 als erster mit Hilfe seines Mikroskops Einzeller, Bakterien, Erythrozyten und Samenzellen von Insekten und Menschen. Durch die Mikroskopie gelingt es zu dieser Zeit große Fortschritte bei der Erforschung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten zu erzielen.

Im Laufe der Zeit entwickelte neue Labortechniken wie das Anfärben von Proben oder die Kultivierung von Keimen, verhalfen den Wissenschaftlern damals schon Mikroorganismen zu identifizieren und zu klassifizieren.

1.7.1 Kurzer Überblick der Nachweismethoden

Nach SCHEIBNER (1990) kann die Bestimmung der Bakterienzahl in direkter oder indirekter Form erfolgen. Direkte Methoden machen die Zellsubstanz der Bakterien und deren Kolonien sichtbar. Beim indirekten Verfahren werden Zellbestandteile oder Stoffwechselprodukte bestimmt oder metabolische Aktivitäten gemessen – daraus kann dann die Zellzahl ermittelt werden. Zu den Methoden der direkten Keimzahlbestimmung zählen unter anderem mikroskopische Direktzählmethoden wie das Ausstrichverfahren, Zählkammerverfahren, Gussplattenmethode nach Koch, Membranfiltermethode oder die direkte Fluoreszenz-Filtermethode, die hier Anwendung findet und unter 1.7.2 und 2.7 näher beschrieben wird.

Kolorimetrie, Säuremessung, CO₂-Wertbestimmung, Pyruvatbestimmung oder Radiometrie sind Verfahren, die zu den indirekten Methoden der Bakterienbestimmung zählen.

1.7.2 Sichtbarmachen von Bakterien

Der visuelle Nachweis durch Sichtbarmachen von Bakterien und deren mikroskopische Erkennung zählt zu den einfachsten und sichersten Methoden. In der vorliegenden Arbeit wird ein fluoreszierender Farbstoff angewendet, der sich an die DNA des Bakteriums anlagert und dieses direkt unter dem Mikroskop bei geeigneter Beleuchtung erkennbar macht.

Der dabei verwendete Farbstoff ist SYBR[®] Green I. Dieser bindet an doppelsträngiger DNA. Sein Fluoreszenz-Exzitations- und Fluoreszenz-Emissions-Maximum hat einen Wert von 497 nm und 520 nm (vgl. Abbildung 4) (MOLECULAR PROBES – Product Information 1999) und fluoresziert somit unter Lichteinstrahlung dieser Wellenlängen. Derartig sichtbar gemachte Bakterien können nun weiteren wissenschaftlichen Analysen unterzogen werden.

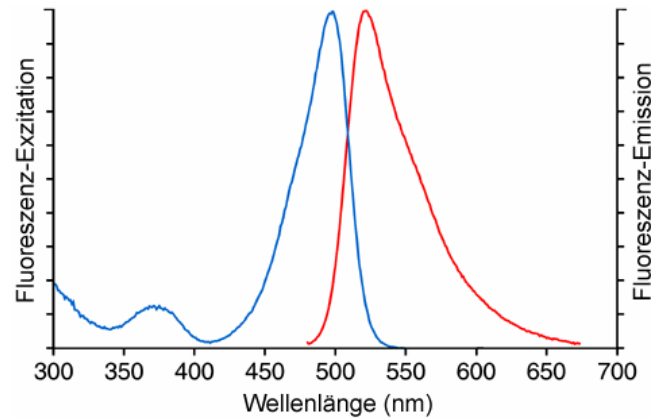


Abbildung 4: Fluoreszenz-Exzitations- und Emissionsspektrum von SYBR® Green I

1.8 Verhinderung der Ausbildung eines Biofilms

Die Ausbildung eines Biofilms auf der Oberfläche von Festkörpern zu verhindern, ist das Ziel vieler Forschungen. So ist es bereits der Degussa AG gelungen, ein so genanntes SAM (Sustainable Active Microbicidal) -Polymer® zu entwickeln. Dieses Polymer steht für eine neue Klasse von Bioziden auf der Basis speziell funktionalisierter Polymere. Diese Polymere lassen sich beispielsweise in Lacke, Farben und Kunststoffe einarbeiten, wodurch diese Produkte mikrobiozid wirken. Diese neuartigen Polymere sind in Wasser unlösliche Verbindungen und bleiben daher dauerhaft an ihrem Applikationsort. SAM-Polymere® besitzen eine Kontaktinhibition; das heißt, sie hemmen das Wachstum verschiedener Mikroorganismen, sobald diese mit ihnen in Berührung kommen. Selbst bei widerstandsfähigen Keimen wie etwa Pseudomonaden oder Legionellen, verhindern sie deren Vermehrung.

Anwendungsgebiete sind neben dem Bautenschutz und der Holzimprägnierung vor allem Antifouling-Farben, aber auch Kunststoffbeschichtungen oder die Kosmetik (Bericht ACHEMA 2003). Ob dieses Polymer auch in der Medizin Einsatz finden kann, ist noch offen.

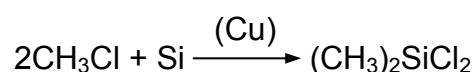
Um wirkungsvoll die Ausbildung eines Biofilms, insbesondere die Verkeimung von Silikonformteilen in der Defektprothetik zu verhindern, erscheinen regelmäßige Desinfektionsmaßnahmen als die momentan praktikabelste Lösung.

1.9 Werkstoff Silikon

Per definitionem ist der Begriff Silikon eine Sammelbezeichnung für eine umfangreiche Gruppe polymerer Verbindungen, in denen Siliziumatome über Sauerstoffatome ketten- bzw. netzartig miteinander verknüpft und die Siliziumatome zusätzlich mit Kohlenwasserstoffresten verbunden sind (z. B. Methyl-, Ethyl- oder Propylgruppen).

Die ursprüngliche Bezeichnung stammt aus dem englischen Sprachgebrauch „Silicone“ und ist ein Kunstwort aus „*Silicium*“ und „*Ketone*“, da die in den Silikonen enthaltenen Bausteine $R_2Si=O$ im Prinzip einem Keton mit der Formel $R_2C=O$ entsprechen. Die physikalischen Eigenschaften der Silikone ähneln denen von Ölen, Harzen oder Kautschuk. Der große Nutzen der Silikone beruht vor allem darauf, dass sie gegen Wärme und Sauerstoff beständiger als gewöhnliche organische Substanzen sind.

Der Werkstoff Silikon wird im Mai 1940 von Eugene Rochow und seinen Mitarbeitern erstmalig reproduktiv synthetisiert. Hierbei werden durch Hydrolyse von Chlorsilanen, je nach geforderter Art des Silikons, jeweils entsprechende organische Reste angehängt. So können beispielsweise Methylchlorsilane aus den Ausgangsstoffen Methylchlorid und fein gemahlenem Silizium unter Zuhilfenahme eines Kupferkatalysators in der sogenannten Rochow-Müller-Synthese produziert werden. Stark vereinfacht läuft dabei folgendes ab:



Die Reaktion wird in einem Fließbettreaktor bei 300°C durchgeführt. Das gebildete Hauptprodukt Dimethyldichlorsilan wird zunächst durch fraktionierte Destillation von den Nebenprodukten wie Methylchlorsilanen getrennt und anschließend mit Wasser oder Wasserdampf behandelt. Dabei entstehen zunächst Silanole, aus denen bei höheren Temperaturen oder durch Verwendung von Katalysatoren das gewünschte Endprodukt Methylsilikon synthetisiert werden kann. In ähnlicher Weise lassen sich auch Silikone mit anderen organischen Resten erzeugen (beispielsweise Ethyl-, Propyl- oder Phenylchlorsilane).

In seiner einfachsten Form handelt es sich bei Silikon chemisch um ein Polydimethylsiloxan (PDMS) mit der Summenformel $((\text{CH}_3)_2\text{SiO})_n$.

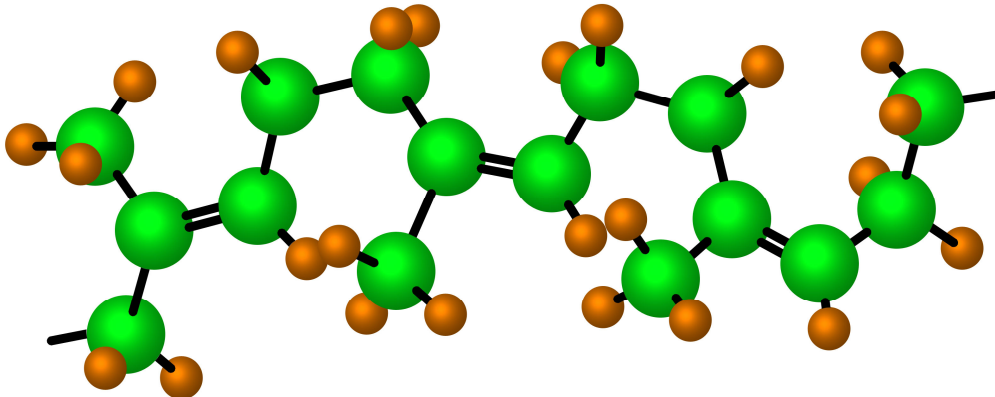


Abbildung 5: Dreidimensionaler Ausschnitt aus dem Strukturaufbau eines Silikons

Unterschieden werden lineare, verzweigte, zyklische und vernetzte Silikone. Silikonöle weisen kurze Molekülketten mit wenigen Siliziumatomen auf, während Silikongele und -festkörper längere Ketten, also Makromoleküle darstellen. Da die Kettenlänge der gewünschten Moleküle und die Polymerisation der zugefügten Molekülreste steuerbar ist, lassen sich Öle, Gele oder Festkörper erzeugen, die stark in ihrer Härte, die üblicherweise durch die Härteskala nach Shore definiert wird, variieren.

Silikonöle zersetzen sich auch bei sehr hohen Temperaturen nicht und sind gegenüber Metallen und den meisten Reagenzien chemisch inert. Zudem bleiben sie auch bei tiefen Temperaturen ausreichend dünnflüssig, bei denen gewöhnliche Kohlenwasserstofföle in den festen Aggregatzustand übergehen. Andererseits erhalten sie, im Gegensatz zu herkömmlichen Ölen, bei hohen Temperaturen ihre Zähflüssigkeit. Diese genannten Eigenschaften eröffnen dem Werkstoff Silikon ein fast grenzenloses Einsatzgebiet (ROCHOW 1991).

Bis zum heutigen Tag werden Silikone nach der oben genannten Reaktion synthetisiert. Dabei stellt seit etwa 20 Jahren die Silikonproduktion für medizinische und zahnmedizinische Anwendungen nur einen verschwindend geringen Teil dar. In der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik und Epithetik etabliert sich dieser Werkstoff vor allem durch seine Biokompatibilität, extreme Elastizität, Zeichnungsschärfe und Ästhetik.

1.10 Oberflächenmodifikationen

1.10.1 Oberflächenmodifikation des Silikons mit einer Titan-Iridium-Schicht

Neben dem Silikon kommen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik noch weitere Werkstoffe wie beispielsweise Titan zum Einsatz. Manche Autoren verwenden zur Defektversorgung anstelle des Silikons aus Reintitan gegossene und auf Hochglanz polierte Hohlkörper. Neben dem großen Vorteil, dass diese Resektionskörper geringen Keimbewuchs aufweisen (KAWAHARA et al. 1998), werden jedoch durch die Starrheit des Materials Nachteile in der Verankerung dieser Resektionskörper und ein geringerer Komfort für den Patienten erkauft.

Die Idee der Titan-Iridium-Beschichtung eines Silikonkörpers besteht darin, einen elastischen Titankörper zu gewinnen, der die positiven Eigenschaften von Titan, in diesem Fall einer Titanlegierung, mit denen von Silikonen paart.

Daher hat die Firma GfE Metalle und Materialien GmbH (Gesellschaft für Elektrochemie) aus Nürnberg ein Verfahren entwickelt, das als plasmaaktivierte Gasphasenabscheidung beschrieben wird und Kunststoffe mit einer Titan- oder Titanlegierungsschicht zu überziehen erlaubt (BREME 1999). Die derart modifizierten Kunststoffe finden in der Gefäßchirurgie und Inneren Medizin ihre Einsatzgebiete. Untersuchungen in vitro versprechen im Vergleich zum unbehandelten Pendant eine stabilere Einheilung des beschichteten Implantats.

Auf Grund von hydrolytischen und enzymatischen Abbauprozessen haben eine Vielzahl von implantierten Kunststoffen keine ausreichende Biostabilität, das heißt sie verfügen nicht über eine ausreichende Langzeitstabilität (RIEPE et al. 1997, SCHUMPELIK et al. 1997, SANTERRE et al. 1993) wie es von Langzeit- oder Dauerimplantaten wie beispielsweise Leistenhernienimplantaten, künstlichen Herzklappen oder Gefäßprothesen, gewünscht wird. Ferner ist auch beim Einsatz von Kunststoffen das Problem der postoperativen Implantat-assoziierten Infektion bekannt (SCHIERHOLZ und RUMP 1998). Durch die Modifikation mit einer derartigen Beschichtung soll eine ausreichende Langzeitstabilität erreicht werden, ohne auf

die Werkstoffeigenschaften der bereits in Verwendung befindlichen Materialien zu verzichten.

Die Titan-Iridium-Beschichtung befindet sich noch in der Testphase und hat noch keine Zulassung für medizinische Einsatzzwecke.

1.10.2 Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht

In seiner Patentschrift „Verfahren zur kovalenten Modifizierung von chemisch definierten, in flüssiger Phase vorliegenden, funktionelle Gruppen enthaltenden Verbindungen“, beschreibt SIEGEL 1999 die Modifikation von Feststoffen mit einer amphoteren Schicht. Dieses Verfahren dient der Bindung von in flüssiger Phase vorliegenden funktionellen Gruppen an Festkörper, die zwei siliziumgebundene Vinyl- oder Butenylgruppen pro Molekül aufweisen.

Die Oberflächenmodifikation erfolgt durch ein Tauchbadverfahren (vgl. Abbildung 6). In diesem Bad sind funktionelle Gruppen wie beispielsweise $-OH$, $-NH_2$, $-COH$, $-SH$, in flüssiger Form vorhanden, die sich dann an C–C Doppelbindungen addieren und somit kovalent binden. Die so entstandene Modifikation beschreibt der Autor als äußerst hydrolysestabil mit folgenden zu beobachtenden Effekten im Vergleich mit unbehandelten Oberflächen:

- verringerte Haftreibung
- verringerter Friktion an der Oberfläche
- hydrophilere Oberfläche bildet bei Benetzung mit Wasser einen konkaven Meniskus (Kontaktwinkel: $105^\circ - 30^\circ$)
- erhöhte freie Oberflächenspannung von 22 mN/m^2 auf ca. 56 mN/m^2
- verringerte elektrostatische Aufladung
- erhöhte Permeabilität zu polaren Mitteln (z.B. Wasser)
- verringerte Permeabilität zu lipophilen (hydrophoben) Stoffen

Auf Grund dieser Eigenschaften soll eine elektrochemische Verringerung der Bakterienadhäsion erreicht werden.

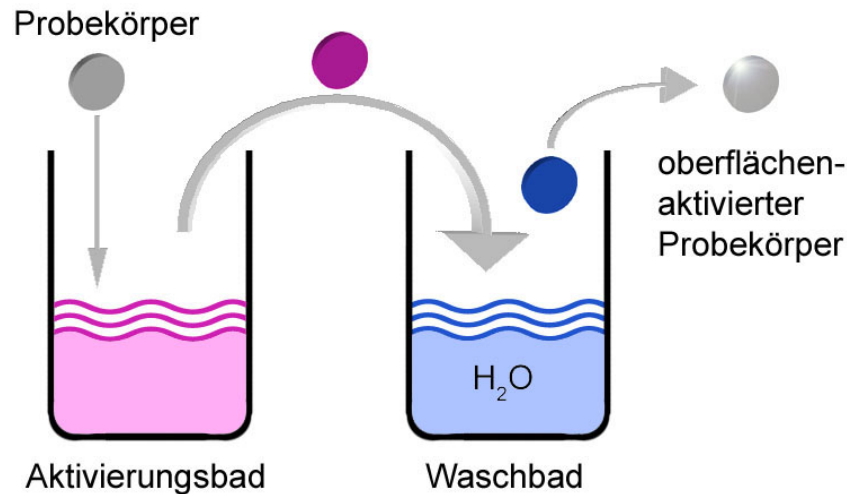


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Beschichtungsprozesses

Silikonoberflächen können mit diesem naß-chemisch Verfahren derart modifiziert werden, dass die so entstandene amphotere oder auch „zero-charge“ Oberfläche im gleichen Maße anionische wie auch kationische Ladungsträger aufweist. Ein Bakterium, egal welcher Oberflächenladung, wird somit von der gleichnamigen Ladung der amphoteren Silikonoberfläche abgestoßen.

1.11 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Lösungsansätze für eine langfristige Inkorporation von Silikonformteilen zu finden, indem die Auswirkungen von Beschichtungen auf die Oberflächenstruktur und Keimbesiedlung von Silikon untersucht wird. Durch eine geeignete dauerhafte Modifizierung der Silikonoberfläche ist auf eine geringere Bakterienanhaftung zu hoffen. Dabei soll die Gewichtung vor allem auf die vergleichende Untersuchung der bakteriellen Adhäsion gelegt und dabei folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Mikrostruktur haben Silikone und deren Oberflächenmodifikationen?
- Wie hoch ist die bakterielle Adhäsion auf oberflächenmodifizierten Silikonkörpern im Vergleich zu unbeschichteten Silikon?

2 Material und Methode

2.1 Herstellung der Probekörper

Das Ziel bei der Herstellung der Probekörper war eine möglichst praxisnahe Methode, sehr ähnlich der wie heutzutage Resektionskörper, Obturatoren und Epithesen für Patienten angefertigt werden.

Um für die Untersuchung geeignete Probekörper zu erhalten, wurden Silikonplatten der Abmessungen 73 mm x 73 mm x 3 mm benötigt. Aus diesen Platten wurden mittels eines Locheisens die geeigneten runden Probekörper des Durchmessers 14 mm ausgestanzt. Alle zu untersuchenden Silikonarten wurden nach Herstellerangaben polymerisiert.

2.1.1 Herstellung der Gipsform

Zunächst wurde eine sogenannte Mastergipsform benötigt, von der immer wieder neue Formteile hergestellt werden konnten, da für jedes auszutestende Silikon eine separate Gipsform, in der die Silikonplatten polymerisiert werden, verwendet wurde. Damit sollte gewährleistet sein, dass herstellungsbedingte Fehler, die das Ergebnis der Untersuchung beeinflussen könnten, nahezu ausgeschlossen sind.

Eine den Maßen der Silikonplatte entsprechende quadratisch zugeschnittene Tiefziehfolie Erkodur der Firma Erkodent GmbH der Stärke 3 mm diente als Vorlage für die Herstellung des Gipsformteils. Ein seitlich aufgetrenntes, handelsübliches, rundes Kunststoffabflussrohr auf einer Glasplatte, auf der die Tiefziehfolie befestigt wurde, stellte die mit Hartgips zu füllende Form dar. Die so gewonnene Gipsform wurde mit Supersep[®] isoliert, um eine Positivgipsform zu erhalten, von der immer wieder mittels des Kunststoffabflussrohres als Rahmen neue Negativformen erstellt werden konnten. Damit waren die Bodenplatten mit der Negativform für die jeweilig herzustellenden Silikonplatten fertig. Die Anfertigung eines passenden, rotationsstabilen und reponierbaren Deckels

erfolgte so, dass in die quadratische Negativform wieder die Tiefziehfolie eingebracht wurde, am Gipsrand die Bodenplatte mit Retentionen mittels Gipsfräse versehen und mit Supersep[®] isoliert wurde. Das Kunststoffabflussrohr diente erneut als Rahmen. Die Form konnte nochmals mit dem gleichartigen Gips befüllt werden. Nach der Abbinde- und Aushärtezeit war die Form fertig für die Polymerisation der Silikonplatten.

2.1.2 Silikon und Polymerisation

Zur Analyse standen die von der Firma Dreve-Dentamid GmbH bereitgestellten Silikone Episil-E, Obturasil 40, Odontosil 40 und ein eigens für diese Untersuchung hergestelltes Versuchssilikon VS-D-151/1, welches nach Herstellerangaben silikonölfrei ist. Ferner wurde das Silikon Elastosil RT625A der Firma Wacker-Chemie GmbH untersucht.

Die chemischen Inhaltsstoffe der additionsvernetzten 1:1 Zweikomponentensilikone der Firma Dreve-Dentamid GmbH sind vinylhaltige Polydimethylsiloxane, Kieselsäure und im Fall des Episil-E Pigmente zur Einfärbung. Die Silikone unterschiedlicher Shore-Härte wurden aus Kartuschenspritzen mit den Herstellerangaben entsprechenden Verwirbelungsaufsätzen extrudiert. Bei diesem Volumen reichte eine halbe Kartusche für eine Silikonplatte aus. Das zu untersuchende Silikon der Firma Wacker, Elastosil RT625A, ist ein additionsvernetztes 1:9 Silikon der Shore-Härte 25 und muss nach Herstellerangaben mit der Hand angemischt werden.

Zunächst wurden sowohl die Bodenplatte, als auch der Deckel mit der Isolierung Iso K nach Herstellerangaben behandelt. Nach der Eintrocknungszeit von fünf Minuten waren die Formen zur Aufnahme des Silikons vorbereitet.

Das zähflüssige Silikon wurde in die Mitte der Negativform platziert und der Deckel unter leichtem Druck passend aufgesetzt, so dass der Überstand am Rand herausquoll. In diesem Zustand wurde das so eingebrachte Silikon nach Herstellerangaben im Polymerisationsgerät bei 3,0 bar unter Wasserausschluss

oder im Fall des Episil-E im Polymerisationsofen (handelsüblicher Backofen) bei 75 °C polymerisiert.

Aus den so gewonnenen Silikonplatten konnten mit einer Lochstanze, Durchmesser 14 mm, genau 25 runde Probekörper der Stärke 3 mm je Platte herausgestanzt werden.

2.2 Oberflächenmodifikationen

Zunächst erfolgte eine Aufteilung der zu untersuchenden Silikone in drei Gruppen, von denen zwei eine Oberflächenmodifikation erfahren haben:

1. Beschichtung mit Titan-Iridium-Schicht durch plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung durch die Firma GfE Metalle und Materialien GmbH, Nürnberg (vgl. 1.10.1)
2. Beschichtung mit einer amphoteren Oberfläche mittels nass-chemischem Verfahren durch die Firma bionic surfaces, Würzburg (vgl. 1.10.2)
3. unbeschichtete Kontrollgruppe

2.2.1 Oberflächenmodifikation mit einer Titan-Iridium-Schicht

Der Firma GfE Metalle und Materialien GmbH war es nicht möglich, eine für die Untersuchungen nutzbare Titan-Iridium-Schicht auf die Silikonprobekörper aufzubringen (vgl. 3.1.3). Daher schied diese Prüfgruppe für die mikrobiologischen Untersuchungen aus.

2.2.2 Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht

Die Beschichtung der Probekörper übernahm die Firma bionic surfaces. Die Beschichtung war innerhalb von einem Tag abgeschlossen, und die Probekörper konnten sofort der mikrobiologischen Analyse zugeführt werden.

2.3. Oberflächencharakterisierung

Die Oberflächencharakterisierung der beschichteten und unbeschichteten Silikone erfolgt unter dem Rasterelektronenmikroskop und dient der Visualisierung der Oberflächen. Ferner können hiermit die Ergebnisse der Messungen optisch überprüft werden. Diese Visualisierung der Bakterienbesiedlung auf der Silikonoberfläche hat jedoch weder eine qualitative noch eine quantitative Aussagekraft.

2.4 Vorbereitungen der Probekörper für die Rasterelektronenmikroskopie

Damit die Untersuchung eines Objekts unter dem Rasterelektronenmikroskop möglich wird, muss es verschiedene Bedingungen erfüllen. Das staubfreie und unbeschädigte Objekt muss wasserfrei sein und darf im Hochvakuum unter Elektronenbeschuss weder ausgasen noch die Form verändern. Seine Oberfläche muss elektrisch leitend sein und darf keine störenden Aufladungen aufweisen. Ist keine elektrische Leitfähigkeit vorhanden, kann diese durch das Aufbringen einer dünnen metallischen Schicht, dem sogenannten Bedampfen oder Sputtern (vgl. 2.4.3) hergestellt werden. Viele anorganische Stoffe erfüllen diese Voraussetzungen. Für biologische Objekte hingegen sind weitere präparative Maßnahmen unerlässlich. Im folgenden wird die Ablaufroutine kurz beschrieben.

2.4.1 Fixierung und Entwässerung

Die Probekörper werden einzeln in mit 5 ml Glutaraldehyd/PBS-Lösung (6,25%) gefüllte 20 ml Glasfläschchen gelegt und über Nacht (12 Stunden) dort belassen. Am folgenden Tag werden diese Probekörper jeweils fünf Mal für fünf Minuten in PBS-Pufferlösung gewaschen. Die Entwässerung der Probekörper erfolgt durch eine aufsteigende Acetonreihe. Für jeweils zehn Minuten entwässern die Silikonplättchen in 30%, 50%, 70%, 90% und schließlich sechs Mal in 100% Aceton. Diese Prozedur dient der Säuberung und Entwässerung – die Proben können danach mehrere Tage aufbewahrt werden.

2.4.2 Kritisch-Punkt-Trocknung (Critical Point Drying – CPD)

Ein Gas wird bei Raumtemperatur bei genügend hohem Druck zur Flüssigkeit. Diese Änderung des Aggregatzustandes bezeichnet man als Phasenumwandlung. Während andere Trocknungsmethoden (z.B. Lufttrocknung) die Phasengrenze überschreiten (flüssig – gasförmig oder flüssig – fest) und so durch die Oberflächenspannung Artefakte entstehen können, umgeht man bei der CPD die Phasengrenze flüssig – gasförmig. Die in dem Objekt enthaltene Flüssigkeit wird gegen ein Lösungsmittel getauscht, dessen „kritischer Punkt“ – Wert im Bereich technisch realisierbarer Anlagen liegt. Beispielsweise hat Wasser eine kritische Temperatur von $T_c = 647,4 \text{ K}$ und einen kritischen Druck von $p_c = 215,5 \text{ bar}$. Diese Werte sind ohne Zerstörung des Objekts und ohne einem immensen apparativen Aufwand nicht zu erreichen. Daher bedient man sich im Austausch mit flüssigem Kohlendioxid (CO_2), dessen kritische Temperatur bei $T_c = 304,2 \text{ K}$ und dessen kritischer Druck bei $p_c = 72,9 \text{ bar}$ liegen.

In Abbildung 7 veranschaulicht das Phasendiagramm den Wechsel des Aggregatzustandes von CO_2 um den kritischen Punkt.

Nach Herstellerangabe erfolgt die Kritisch-Punkt-Trocknung der Probekörper im Kritisch-Punkt-Trocknungsgerät (CPD 030, Bal-Tec AG, Liechtenstein).

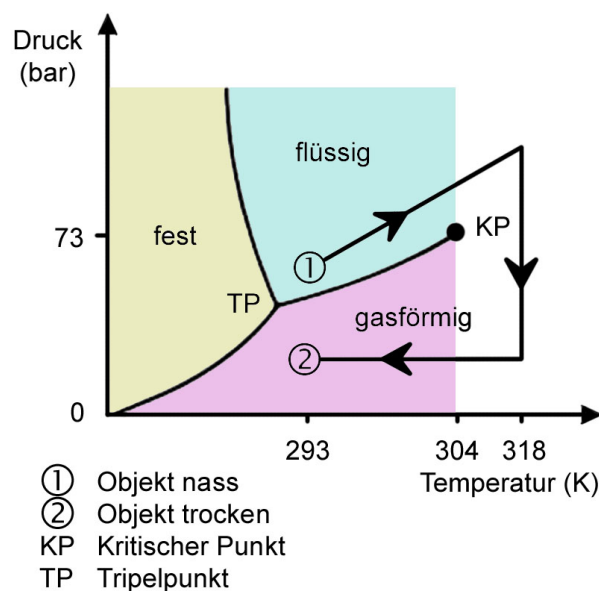


Abbildung 7: Phasendiagramm von CO_2 für die CPD

2.4.3 Goldbedampfung/Sputtern

In einem evakuierten und mit Argongas durchfluteten Zylinder wird zwischen zwei Metallplatten durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 1500 Volt) eine selbständige Glimmentladung gezündet. Die dabei entstehenden positiven Argon-Ionen werden zur Kathode hin beschleunigt und schlagen beim Auftreffen auf die dort befindliche Metallplatte (Goldfolie) Goldpartikelchen aus der Oberfläche heraus. Diese kollidieren bei ihrer Ausbreitung mit den Gasmolekülen, werden dadurch mehrmals gestreut und treffen diffus auf das positiv geladene Objekt. Somit entsteht auf dem Objekt ein leitfähiger Goldüberzug.

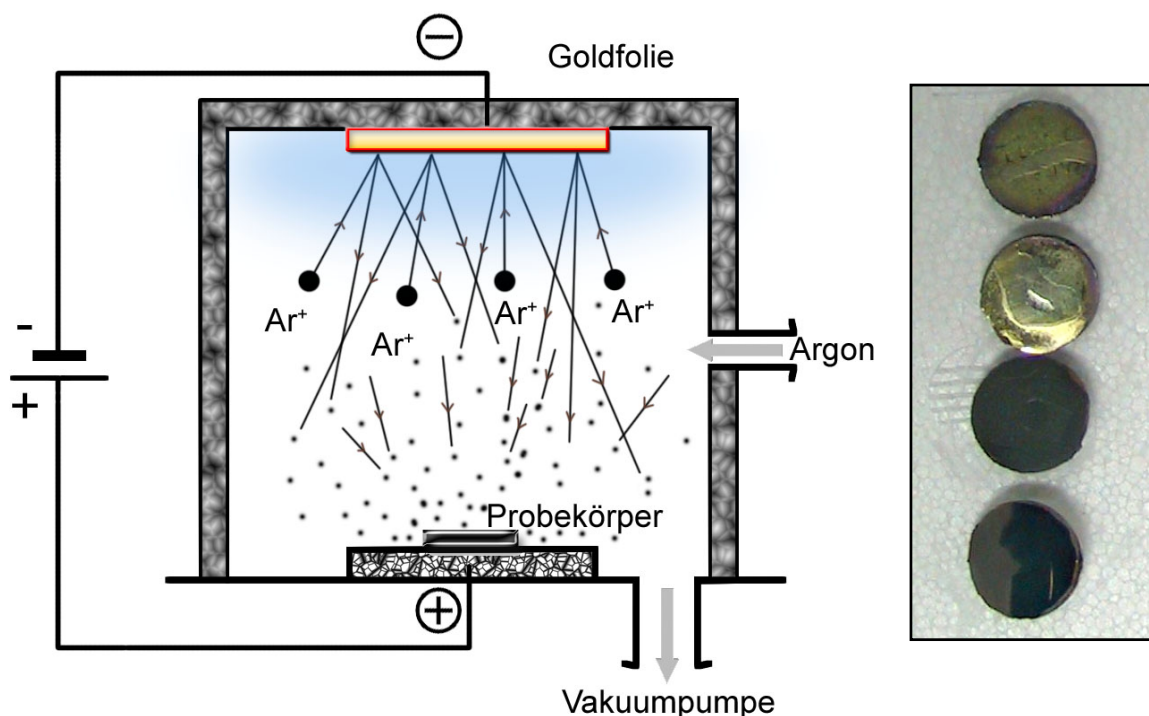


Abbildung 8 und 9: Schema der Goldbedampfung eines Objekts und vier Silikonprobekörper nach der Goldbedampfung

Die Probekörper werden mit Hilfe von doppelseitigen Klebplättchen auf Mikroskopiertischchen geklebt und mit Leitlack zwei Verbindungspunkte zwischen Probe und Tischchen hergestellt, um die elektrische Leitfähigkeit sicherzustellen. Danach erfahren die Probekörper eine Goldbedampfung nach Herstellerangabe und sind anschließend für die Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop vorbereitet (vgl. Abbildung 8 und 9).

2.5 Vorbereitende Maßnahmen für die mikrobiologischen Analysen

2.5.1 Bakterienstämme

Repräsentativ dienen auf Grund einer mikrobiologischen Voruntersuchung an Patienten (LEEMING et al. 1998) folgende Bakterien für die Analyse:

- Staphylococcus epidermidis [Stamm RP62A – gram+]
- Klebsiella pneumonia [Stamm 3091 – gram-]
- Unpathogene Neisserien [Patientenstamm – gram-]
- Escherichia coli [Stamm HB 101– gram-]
- Streptococcus salivarius [Stamm 259 – gram+]

2.5.2 Ansetzen des Nährmediums

Für die zu testenden Bakterienstämme, bis auf Streptococcus salivarius, diente jeweils LB-Medium als Flüssignährmedium. Das Bakterium Streptococcus salivarius erhielt TSB-Medium als Nahrungsgrundlage.

Die für das jeweilige Nährmedium geforderten Chemikalien wurden auf einer Laborwaage einzeln abgewogen und in ca. 900 ml destilliertem Wasser mit Hilfe eines Rührfisches und eines Magnetrührers gelöst. Anschließend erfuhr die Lösung die geforderte Einstellung des pH-Werts durch Zugabe von verdünnter Salzsäure oder Natronlauge unter Zuhilfenahme des pH-Meters. Die Lösungen wurden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und schließlich in gut verschlossenen 1000 ml – Schottflaschen für 20 min. bei 121 °C sterilisiert.

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen der Lösungen bis auf ca. 40 °C erfolgte unter der Steril-Cleanbench das Ausgießen in sterile Petrischalen. Die ca. 3 mm hoch befüllten, gut abgekühlten Schalen wurden mit passenden Deckeln verschlossen, beschriftet und in Plastiktüten gestapelt. Die Haltbarkeit der Nährmedien ist im Kühlschrank bei 4 °C auf ca. vier Wochen begrenzt. Die exakte Zusammensetzung der Nährmedien ist im Anhang (vgl. 7.1) beschrieben.

2.5.3 Züchten der Bakterienkulturen

Um Bakterien in ausreichender Anzahl zu züchten, wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Unter der Cleanbench wurden 2 ml LB-Medium, im Fall von *Streptococcus salivarius* TSB-Medium, in ein autoklaviertes 20 ml Glasröhrchen mit einer sterilen Pipette vorgelegt und 10 µl des auszutestenden Bakterienstamms, der in einer Glycerinlösung und im Gefrierschrank aufbewahrt werden muss, dem Inhalt des Glasröhrchens beigemischt, in den Schüttler gestellt und bei konstant 37 °C über Nacht (24 Stunden) im Brutschrank bebrütet. Danach signalisierte ein getrübler Inhalt des Glasröhrchens das erfolgreiche Bakterienwachstum.

2.5.4 Vorbereitung der Probekörper

Sowohl die beschichteten als auch die unbeschichteten Probekörper wurden zunächst in doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Dazu diente ein 100 ml Becherglas, in dem die Silikonplättchen für ca. eine Minute per Hand geschwenkt wurden. Die mit einer Pinzette aus dem Becherglas entnommenen Probekörper erfuhren eine weitere, gleichartige Waschung in Isopropanol (80%). Die Trocknung erfolgte anschließend unter der Cleanbench. Die getrockneten Silikonprobekörper konnten dann in Autoklaventüten á acht Stück verpackt, verschweißt und später im Sterilisator autoklaviert werden.

2.6 Mikrobiologische Untersuchungen

Es wurden zwei Analysemethoden unabhängig voneinander durchgeführt. Zum einen erfolgte die Auswertung nach der klassischen Bakterienkoloniauszählung, zum anderen nach der computergestützten Auszählung mittels eines Fluoreszenzmessgeräts. Beide Methoden hatten die gleiche Vorbereitungsprozedur. Dabei diente die Auszählung der Bakterienkolonien lediglich als Kontrolle der Ergebnisse aus den computergestützten Versuchen.

2.6.1 Gemeinsame Vorbereitungsprozedur – Anzüchten der Bakterien auf den Probekörpern

Unter der Cleanbench wurden für die klassische Analyse in zwei zuvor markierte, autoklavierte 100 ml Weithals-Erlmeyerkolben je 50 ml Nährmedium vorgelegt und je 100 μ l aus der Bakterien-Übernachtskultur (vgl. 2.5.3) dazugegeben. In den einen Kolben wurden vier sterile, beschichtete Probekörper und in den anderen vier sterile, unbeschichtete Probekörper eingebracht. Die Kolben wurden mit sterilen Papierpfropfen verschlossen und 24 Stunden lang bei 37 °C im Schüttler bebrütet.



Abbildung 10: Inkubation der Probekörper im Schüttler

Für die spätere Analyse im Fluoreszenzmessgerät wurden zur Vorbereitung vier 100 ml Weithals-Erlmeyerkolben verwendet. Zwei davon erfuhren die gleiche Behandlung wie bereits oben beschrieben. Die Probekörper für die Kontrollgruppe, ebenfalls vier beschichtete und vier unbeschichtete, erfuhren die gleiche Behandlung, wurden jedoch nicht mit der bakterienhaltigen Übernachtskultur versetzt. Sie dienten der Analyse der Nullprobe und somit als Referenz im Fluoreszenzmessgerät.

2.6.2 Die klassische Analyse

Die klassische Lebendzellzahlbestimmung geht davon aus, dass jedes lebende Bakterium zu einer Bakterienkolonie auswachsen kann. Dies stimmt jedoch nicht ganz, da beispielsweise Diplokokken, Staphylokokken und Streptokokken in Aggregaten aus mehreren lebenden Zellen vorliegen, die jeweils nur eine Kolonie bilden. Deshalb wurde der Begriff „colony forming units – cfu“ (koloniebildende Einheiten) eingeführt. In der Praxis wird folgendermaßen vorgegangen: Die Bakterien werden durch dekadische Verdünnungsreihen erst vereinzelt und danach äquivalente Mengen auf einem geeigneten Nährboden ausplattiert, bebrütet und dann die Kolonien gezählt. Es existieren dazu eine Reihe von Methoden, die sich nur darin unterscheiden, wie die Bakterien auf bzw. in einem festen Nährboden verteilt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Bakterien durch Glasperlen in dem noch flüssigen Agar verteilt und darauf hin bebrütet (vgl. 2.5.3). Der ermittelte Wert wurde bei vier Untersuchungen aus je vier Probekörpern, die einzeln auf Agarplatten plattiert wurden, bestimmt.

2.6.2.1 Waschen der Probekörper im Nährmedium

Nach dem Anzüchten (24 Stunden) der Bakterien auf den Probekörpern erfolgte eine Reinigung, die dazu diente, nicht auf der Oberfläche der Probekörper anhaftende Bakterien zu entfernen. Dazu wurden unter der Cleanbench je 3 ml Nährmedium in 20 ml Glasfläschchen vorgelegt und dem später dazugegebenen Inhalt nach beschriftet. Die bewachsenen Probekörper wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette vorsichtig einzeln in die entsprechenden Fläschchen überführt, auf Eis gestellt und anschließend fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Dieser Prozedur wurden die Probekörper insgesamt zwei Mal unterzogen. Das Entfernen des Nährmediums erfolgte mit einer Wasserstrahlpumpe.

Die so gereinigten Probekörper waren nach diesem Schritt zur Betrachtung unter dem Rasterelektronenmikroskop vorbereitet. Zur Fixierung des Zustands erfolgte

die Zugabe von ausreichend Glutaraldehyd/PBS-Lösung in die Glasröhrchen, so dass die Probekörper völlig bedeckt waren.

2.6.2.2 Ablösen der Bakterien von den Probekörpern

Nach dem Waschen der Probekörper waren nur noch die auf der Oberfläche anhaftenden Bakterien vorhanden. Um nun diese Bakterien von der Oberfläche abzulösen und in eine Nähragarlösung zu überführen, wurde in neue, sterile 20 ml Glasröhrchen je 10 ml Nährmedium vorgelegt, noch einmal beschriftet und auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurde je ein Probekörper vorsichtig in das entsprechende Glasröhrchen eingebracht und die acht Glasröhrchen dann in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad gestellt. Die folgende Ultraschallbehandlung fand in einem einminütigen Intervall mit einer Minute Pause statt. Insgesamt erfuhren die Proben eine zehnminütige Ultraschallbehandlung, die den Großteil der an der Oberfläche der Probekörper anhaftenden Bakterien in die Nährlösung überführte.

2.6.2.3 Verdünnungsreihe

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, musste die Nährlösung, in der nun die von der Oberfläche der Probekörper abgelösten Bakterien waren, verdünnt werden. In Eppendorf-Caps (kurz: Epi-Caps) wurde unter der Cleanbench je 900 µl Nährmedium vorgelegt. Die Glasfläschchen mit den Probekörpern wurden gevortext, daraufhin 100 µl ihrer Lösung entnommen und in je ein neues Eppendorf-Cap pipettiert.

Aus dem gevortexten Eppendorf-Cap wurden abermals 100 µl Lösung entnommen und in ein weiteres vorbereitetes Eppendorf-Cap gegeben. Insgesamt wurde fünf Mal nach folgend aufgeführter Verdünnungsreihe verdünnt.

1. Epi-Cap 1: 900 µl Nährmedium + 100 µl aus Nährlösung von Ultraschall
2. Epi-Cap 2: 900 µl Nährmedium + 100 µl aus Epi-Cap 1
3. Epi-Cap 3: 900 µl Nährmedium + 100 µl aus Epi-Cap 2

4. Epi-Cap 4: 900 µl Nährmedium + 100 µl aus Epi-Cap 3
5. Epi-Cap 5: 900 µl Nährmedium + 100 µl aus Epi-Cap 4 nach dem vortexen 100 µl verwerfen.

2.6.2.4 Ausplattieren der verdünnten Bakterienlösungen

Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf eine zuvor beschriftete und mit noch flüssigem Nähragar befüllte Agarplatte getropft und mit Hilfe von Glasperlen vermischt und ausplattiert. Die Agarplatten wurden dann 24 bis 48 Stunden, je nach auszutestendem Bakterienstamm bei 37 °C bebrütet, so dass eine auffällige Koloniebildung zu sehen war.

Agarplatten, die auf Grund von entweder zu geringer oder zu hoher Verdünnung – das bedeutet entweder ein geschlossener Bakterienrasen oder zu wenig, bzw. gar kein Bakterienwachstum aufwiesen, wurden verworfen. In die Auswertung wurden nur Agarplatten einer Verdünnung aufgenommen und anschließend die einzelnen Kolonien auf den Platten ausgezählt.

Um ein reproduzierbares und aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, sollte die Anzahl der Kolonien sich zwischen 30 und 200 befinden. Der zu errechnende Wert wird aus folgender Formel ermittelt:

$$c = \frac{n}{sd}$$

wobei „c“ die zu ermittelnde Konzentration, also die „cfu“ in ml, „n“ die ermittelte Kolonienanzahl, „s“ das Verdünnungsvolumen und „d“ der Verdünnungsfaktor ist.

Da immer die Kolonien von vier Agarplatten ausgezählt wurden, ist durch die Ermittlung des Mittelwerts der statistische Fehler verringert worden. Die Werte der jeweiligen Probekörper eines Silikons mit Oberflächenbeschichtung wurden mit den Werten des gleichartigen Probekörpers mit natürlicher Silikonoberfläche verglichen und ins Verhältnis gesetzt.

2.6.3 Ermittlung der Keimbesiedelung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs

Auf die Ermittlung der Keimbesiedelung der Probekörper unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzfarbstoffs mit computergestützter Auswertung soll der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit gelegt werden.

2.6.3.1 Waschen der Probekörper und fixieren der Bakterien

Nach der unter Punkt 2.6.1 beschriebenen Vorbereitung der Probekörper – insgesamt 16 Probekörper, von denen acht mit Bakterien besiedelt waren, sowohl vier beschichtete, als auch vier unbeschichtete und acht ebenso beschichtete und unbeschichtete, jedoch ohne Bakterienbewuchs, also unbesiedelt – wurden diese sinnvoll in eine 24-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt (vgl. Abbildung 11). In jedem Well der Zellkulturplatte waren bereits ca. 1,5 ml PBS-Pufferlösung für den Waschvorgang vorpipettiert.

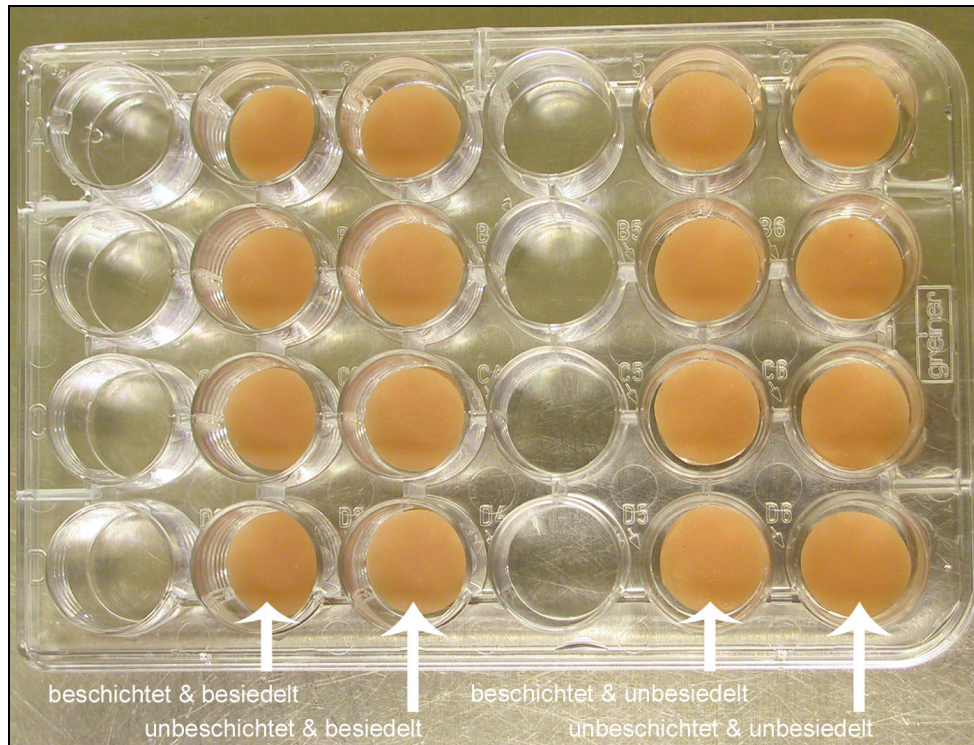


Abbildung 11: Mit Episil-E Probekörpern bestückte 24-Well Zellkulturplatte

Von nun an verblieben die Probekörper bis zur Auswertung im Fluoreszenzmessgerät in der 24-Well-Zellkulturplatte.

Unter dem Abzug wurden nach ca. zehn Minuten die PBS-Pufferlösung mittels einer Pasteurpipette entfernt und anschließend die Probekörper sofort mit Formaldehydlösung (3,7%) fixiert. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde die Formaldehydlösung unter dem Abzug mittels einer Wasserstrahlabsaugung entfernt und die Probekörper anschließend zwei Mal unter erneutem Einsatz der Wasserstrahlabsaugung und einer Pipette in PBS-Pufferlösung gewaschen.

Um die Aufnahme des Bakterien-DNA-Farbstoffs SYBR[®] Green I zu gewährleisten, erfolgte nach dem Waschen und Fixieren eine Entwässerungsreihe mit Ethanol. In aufsteigender Konzentration wurden die Probekörper in den Wells fünf Minuten mit 50%, 80%, 100% und nochmals mit 100% Ethanol entwässert. Hierbei fand eine 50 ml Pipette mit Peleusball und die Wasserstrahlabsaugung Anwendung. Das Ethanol wurde bis zur vollständigen Benetzung der Probekörper in die Wells eingebracht, um dann nach einer Einwirkzeit von ca. drei Minuten und unter leichtem Schütteln der Zellkulturplatte abgesaugt zu werden. Nach dem Absaugen des Ethanols (100%) der letzten Entwässerungsprozedur wurden die Probekörper unter der Cleanbench 30 Minuten getrocknet.

2.6.3.2 Färben der Probekörper mit SYBR[®] Green I

Während der Trocknungsphase wurde das SYBR[®] Green I zur Färbung der Bakterien auf den Probekörpern vorbereitet. Nach Herstellerangaben wurde der Farbstoff mittels geeigneter Pipettierung in Tris-Puffer 1:100.000 verdünnt und war somit gebrauchsfertig verdünnt.

Die Färbeprozedur musste auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs in einem abgedunkelten Raum erfolgen. Die getrockneten Probekörper wurden mittels Pipettierung mit der SYBR[®] Green I – Farbstofflösung versetzt, so dass alle Probekörper in den Wells vollständig benetzt waren. Nach 15 Minuten erfolgte die Entfernung der Farbstofflösung mit einer Pasteurpipette.

Um die noch vorhandenen Farbstoffreste des SYBR[®] Green I vollständig von den Probekörpern zu entfernen, schloss sich ein erneuter Waschvorgang an. Hierzu dienten wieder die Wasserstrahlabsaugung und eine Pipette. Fünf mal wurden alle Wells mit den Probekörpern vollständig mit Tris-Pufferlösung beschickt und die Lösung wieder abgesaugt. Nach einer Trocknungsphase von 30 Minuten unter der Cleanbench, konnten die Probekörper der Auswertung im Fluoreszenzmessgerät zugeführt werden.

2.6.4 Analyse im Fluoreszenzmessgerät SPECTRAFluor Plus

Das SPECTRAFluor Plus der Firma Tecan ist ein Fluoreszenzmessgerät, das auf Grund seiner Ausstattung sowohl von der Hard- als auch von der Software bestens für die Untersuchungen geeignet ist. Das Gerät ist mit zwei Filterschächten ausgestattet, in die unterschiedliche Farbfilter eingebracht werden können und somit unterschiedliche Wellenlängenbereiche des Lichts zur Analyse Verwendung finden. Zudem erlaubt das Messgerät damit die gleichzeitige Messung von Exzitation und Emission. Für die vorliegende Untersuchung wurden dem Fluoreszenz-Exzitations- und Emmisionsspektrum von SYBR[®] Green I entsprechende Farbfilter gewählt (vgl. 1.7.2).

In den Aufnahmeschacht für die Proben passen alle genormten Zellkulturplatten. Somit war auch die verwendete 24-Well-Zellkulturplatte, in der die Versuche durchgeführt wurden, passend.

Die dazugehörige Windows98[®]-unterstützte Software Magellan v.2.0 diente sowohl der Hardwarekonfiguration als auch der Softwareeinstellung, bzw. der Definition der auszuwertenden Messbereiche.



Abbildung 12: Arbeitsplatz mit Fluoreszenzmessgerät SPECTRAFluor Plus

2.6.4.1 Einstellungen des Fluoreszenzmessgeräts

Zunächst erfolgte die Definition der Zellkulturplatte. In einem reichhaltigen Auswahlmenü wurden die entsprechende Zellkulturplatte gewählt und die angegebenen Abmessungen mit der zuvor in den Schacht des Messgeräts eingeführten Zellkulturplatte überprüft. Das war deshalb von entscheidender Wichtigkeit, da die zur Analyse ausgesendeten Lichtblitze direkt auf die Oberfläche des im Well befindlichen Probekörpers treffen mussten und keinesfalls den Rand der Zellkulturplatte, um keine falschen Werte zu erhalten.

Nach dieser Einstellung wurden die Parameter für die Durchführung der Analyse definiert. Diese sollten der Materialprobe und dem Fluoreszenzfarbstoff angepasst sein. Die für den Farbstoff SYBR[®] Green I entsprechenden Filter für die Exzitation (Wellenlänge von 485 nm) und Emission (Wellenlänge von 535 nm) wurden installiert, das entspricht fast den Wellenlängenmaxima des Farbstoffs SYBR[®] Green I. Die Messungen erfolgten mit maximaler Auflösung von fünf mal fünf Lichtblitzen pro Well – das sind 25 Messungen je Probekörper.

Für jeden Probekörper stellte sich nach dem Beenden der Messungen ein Zahlenwert, der aus 25 Einzelwerten, den sogenannten Rohwerte – entsprechend der Lichtblitze – gemittelt wurde, dar. Dieser gemessene Wert entsprach der Fluoreszenz des Farbstoffs und zeigte somit die Exzitation und Emission an.

Ein hoher Zahlenwert stimmte mit einem hohen Anteil an angefärbter Bakterien-DNA überein. Diese Rohwerte wurden dann mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel graphisch aufbereitet und weiter statistisch verarbeitet (vgl. 7.2).

2.7 Visualisierung der gemessenen Werte mit einem Fluoreszenzmikroskop

Im Anschluss an die Messungen wurde sofort die optisch-subjektive Verifizierung der gemessenen Werte im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Dazu wurden die Probekörper einzeln auf gekennzeichnete Objektträger gebracht und im Auflicht, das durch den Einsatz eines geeigneten Farbfilters (BP450-490/BP515-565), der auf das Fluoreszenzspektrum des SYBR® Green I - Farbstoffs abgestimmt war, betrachtet.

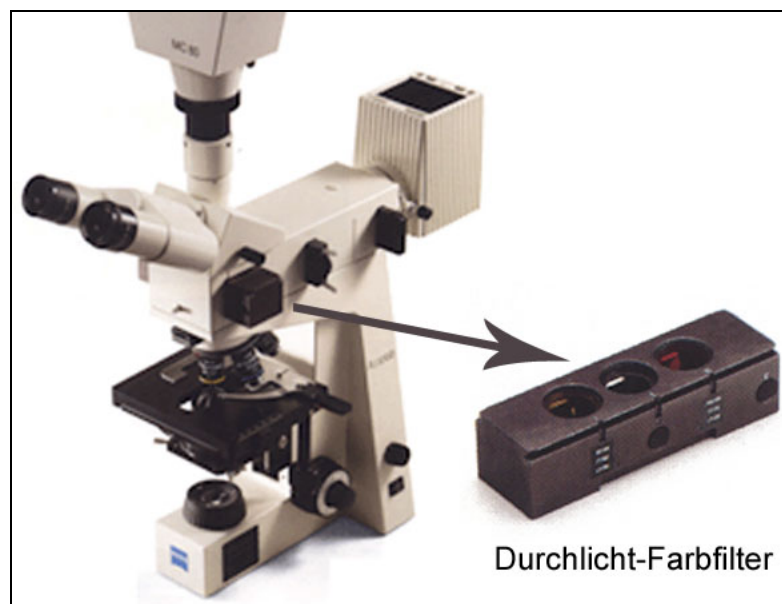


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskop mit digitaler Kameraeinheit

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächencharakterisierung der Silikone und ihrer Beschichtungen

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte unter dem Rasterelektronenmikroskop und wurde mittels Thermosublimationsausdruck visualisiert und anschließend mit einem Scanner digitalisiert. Dabei wurde je Silikon und je Beschichtung eine Vielzahl von Bildern angefertigt. Die dargestellten Aufnahmen entsprechen einem repräsentativen Querschnitt der Oberflächen.

3.1.1 Natürliche Silikonoberfläche

Alle natürlichen, unbehandelten Oberflächen der untersuchten Silikone stellten sich unter dem Rasterelektronenmikroskop weitestgehend glatt dar. Mitunter erkannte man oberflächliche Landmarken, die entweder durch den Herstellungsprozess der Probekörper entstanden oder Artefakte des Vorbereitungsprozesses (CPD oder Sputten) waren.

Die Abbildung 14 zeigt eine um den Faktor 2000 vergrößerte native Silikonoberfläche mit feinen, 1 – 3 μm großen Einbuchtungen. Die helleren Punkte sind artifizielle Verunreinigungen.

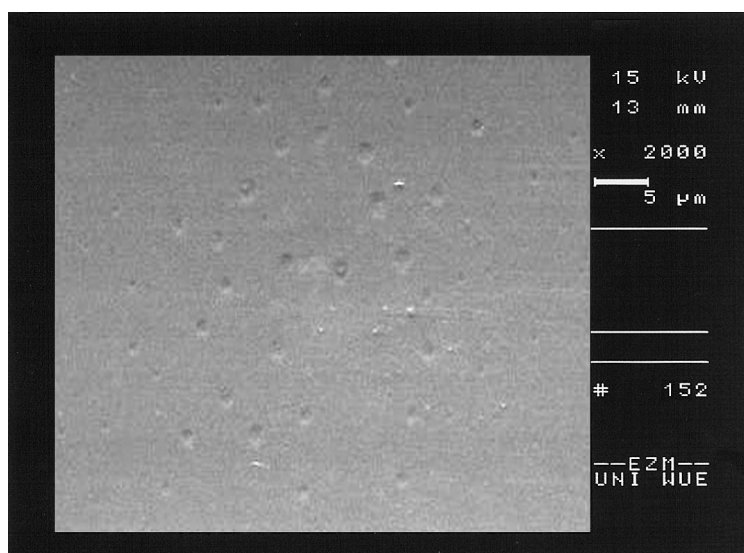


Abbildung 14: Natürliche Silikonoberfläche

3.1.2 Natürliche Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der natürlichen Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs wiesen alle eine, die Oberfläche flächig ausfüllende, massive bakterielle Besiedlung auf. Dabei konnte kein Bakterienstamm beobachtet werden, der von seiner Oberflächenbesiedlung besonders auffällig war.

In Abbildung 15 ist vordergründig ein dichter Bewuchs des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* zu erkennen. Teilweise lassen sich auch Vermehrungsvorgänge durch Teilung erkennen. Der homogene Hintergrund zeigt die natürliche Silikonoberfläche. Die Aufnahme ist um den Faktor 3000 vergrößert.

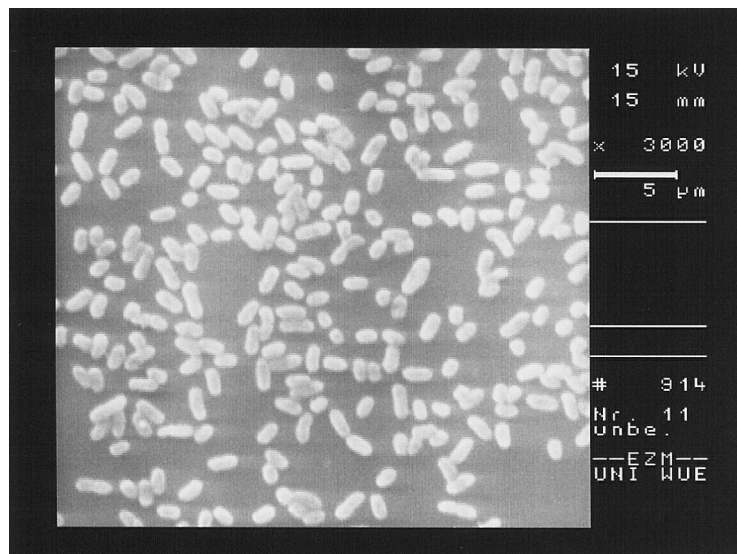


Abbildung 15: *Klebsiella pneumoniae* auf natürlicher Silikonoberfläche

In der Abbildung 16, die eine Vergrößerung um den Faktor 20000 aufweist, sind zwei Bakterien des Typs *Streptococcus salivarius* auf einer natürlichen Silikonoberfläche zu erkennen. Beide Bakterien haben von ihrer Oberfläche ausgehende Fortsätze, sogenannte Pili.

Der Hintergrund stellte sich bei einer derartigen Vergrößerung nicht mehr so homogen wie in Abbildung 14 dar. Man erkennt in der Abbildung 16 kleine Kügelchen, die der Oberfläche aufliegen. Da die Firma GfE Metalle und Materialien GmbH Probleme bei dem im Hochvakuum durchzuführenden

Beschichtungsprozess der Silikone hatte (vgl. 3.1.3), könnte es sich im Vakuum im Inneren des Rasterelektronenmikroskops ebenfalls um das gleiche Phänomen – Diffusion von ungebundenem Silikonöl an die Oberfläche – handeln.

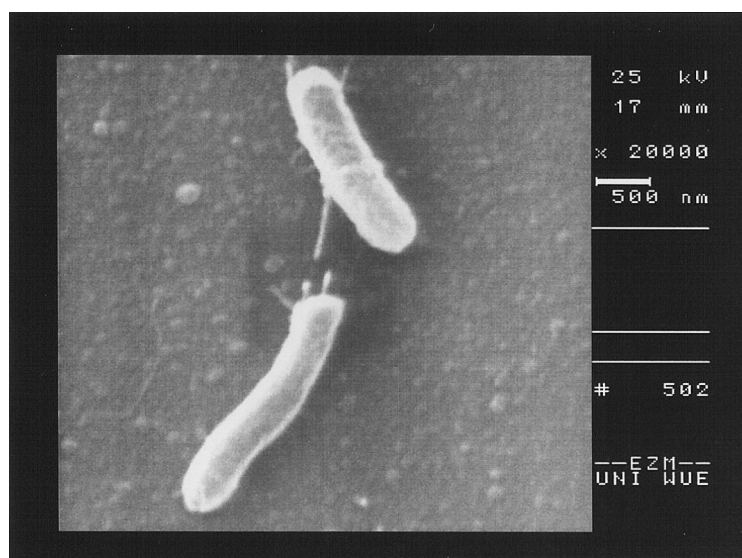


Abbildung 16: Streptococcus salivarius auf natürlicher Silikonoberfläche

3.1.3 Titan-Iridium beschichtete Silikonoberfläche

Auf den Probekörper, deren Oberflächen mit einer Titan-Iridium-Beschichtung modifiziert waren, konnten keine homogenen und damit auswertbaren metallischen Schichten gefunden werden. Die Aufsicht mit unbewaffnetem Auge war eben und einheitlich, selbst manuelle elastische Verformungen des Silikonprobekörpers schien die Beschichtung Stand zu halten. Unter dem Rasterelektronenmikroskop konnten jedoch immer wieder Rissbildungen und Abplatzungen der metallischen Schicht (vgl. Abbildung 17 – dunkle Bereiche) nachgewiesen werden.

Nach Diskussion mit den verantwortlichen Mitarbeitern der Firma GfE Metalle und Materialien GmbH bestärkte sich folgender Verdacht: Wegen des starken Vakuums während des Beschichtungs Vorgangs diffundierten permanent flüssige Inhaltsstoffe aus den Silikonprobekörpern an die Oberfläche. Diese Flüssigkeiten stören die Ausbildung einer homogenen Beschichtung. Mittels Photoelektronenspektroskopie hat die Firma GfE Metalle und Materialien GmbH die Flüssigkeit als

Silikonöl identifiziert. Aus diesem Grund wurde ein Versuchssilikon (VS-D-151/1) von der Firma Dreve Dentamid GmbH entwickelt, das nach Herstellerangabe kein Silikonöl enthält. Trotzdem konnte auch bei diesem Silikon keine nutzbare Titan-Iridium-Beschichtung aufgetragen werden.

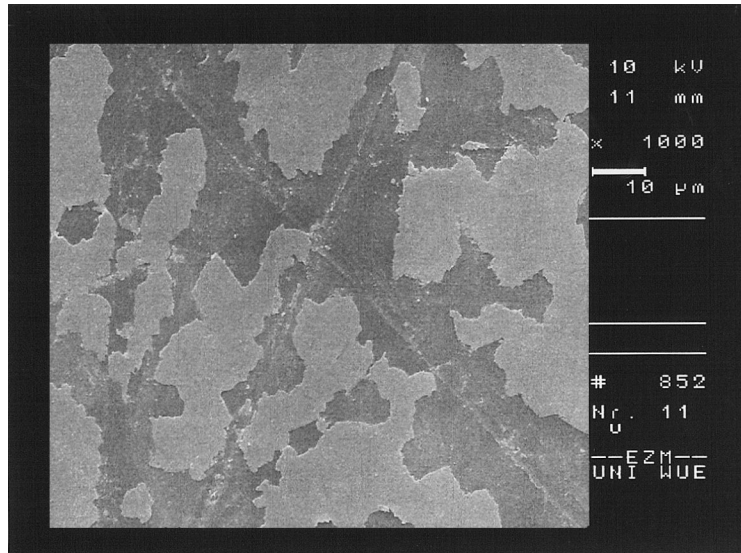


Abbildung 17: Abplatzungen der Titan-Iridium-Schicht

3.1.4 Titan-Iridium beschichtete Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs

Trotz der fehlgeschlagen Beschichtungsversuche, eine homogene Titan-Iridium-Schicht auf der Silikonoberfläche aufzubringen, wurden einige Probekörper dennoch auf ihre Besiedlung mit Bakterien unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Abbildung 18, die einen Vergrößerungsfaktor von 5000 aufweist, ist daher nur als Test zu werten. Zu erkennen ist eine, mit dem Bakterium *Staphylococcus epidermidis* nach Zufallsverteilung besiedelte durch Risse und Abplatzungen defekte Oberfläche.

Aus den rastermikroskopischen Aufnahmen der misslungenen Titan-Iridium-Beschichtung konnte im Gegensatz zu der amphoteren Beschichtung keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Bakterienreduktion zu erwarten gewesen wäre. Rein subjektiv machte diese Beschichtung eher den Eindruck, dass die Bakterienanzahl auf der Beschichtung leicht erhöht sei.

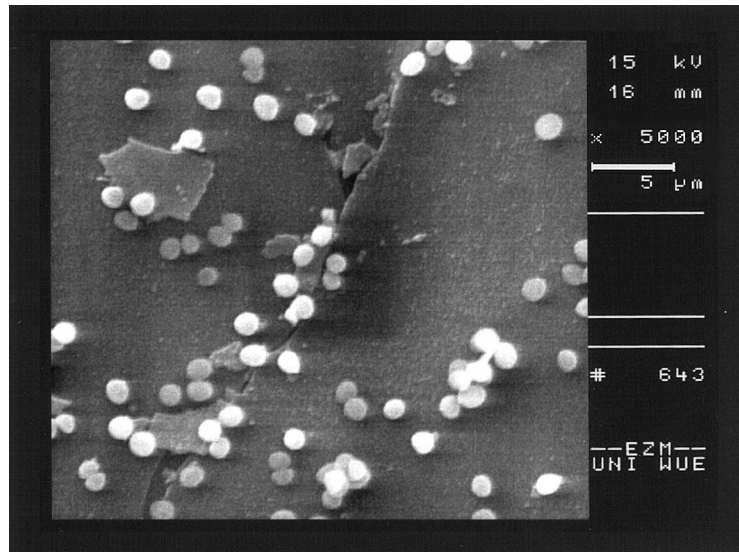


Abbildung 18: Staphylococcus epidermidis auf fehlgeschlagener Titan-Iridium-Beschichtung

3.1.5 Amphoter beschichtete Silikonoberfläche

Die durch die Firma bionic surfaces von Dr. med. R. Siegel amphoter modifizierte Silikonoberfläche der Probekörper (vgl. Abbildung 19) zeigt eine homogene, jedoch teilweise stark wolkig bis rau strukturierte Oberfläche. Dadurch kommt es im Vergleich zur natürlichen Silikonoberfläche zu einer Vergrößerung der Oberfläche um einen unbekanntem Faktor.

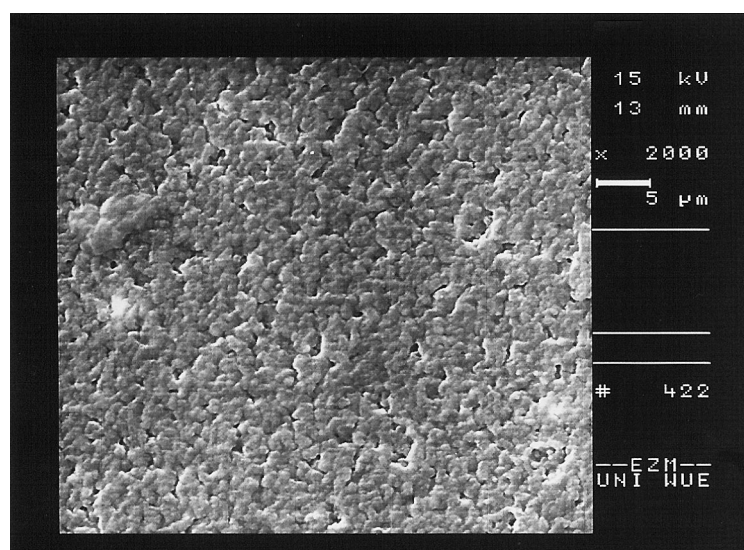


Abbildung 19: Modifizierte Silikonoberfläche durch amphotere Beschichtung

Man kann nicht erkennen, ob es sich um eine Beschichtung im Sinne einer Auflagerung einer Substanz oder um eine subtraktive Maßnahme handelt, die „Löcher“ in die Silikonoberfläche gefressen hat.

3.1.6 Amphoter beschichtete Silikonoberfläche mit Bakterienbewuchs

Abbildung 20 (Vergrößerungsfaktor 2000) ist repräsentativ für alle raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen der amphoteren Silikonoberfläche mit bakteriellem Bewuchs. Die Oberfläche erscheint, wie für diese Beschichtung charakteristisch, wolzig. Anhaftende Bakterien oder Bakterienkolonien, vor allem bei *Staphylococcus epidermidis* vorkommend, waren im Vergleich zur natürlichen Silikonoberfläche weitaus weniger zu finden.

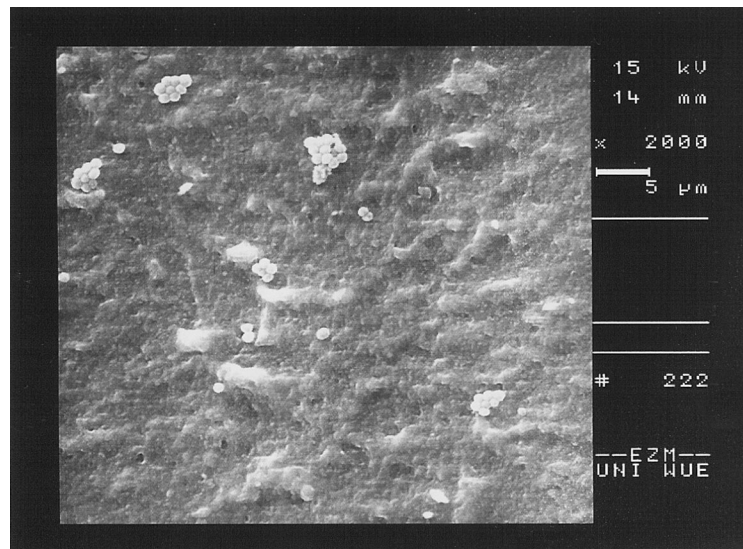


Abbildung 20: *Staphylococcus epidermidis* auf amphoter beschichteter Oberfläche

3.2 Ergebnisse der klassischen Analyse

Die Ergebnisse der Auszählung der koloniebildenden Einheiten (cfu) stimmte mit den Messergebnissen der Fluoreszenzmessung weitgehend überein. Diese quantitative Auswertung diente nur zur zweckmäßigeren Kontrolle der computergestützten Auswertung (vgl. 3.3), als der im Rasterelektronenmikroskop beim Betrachten der Silikonoberflächen gewonnene optische Eindruck.

Am Beispiel von *Staphylococcus epidermidis* auf dem Silikon Obturasil 40 soll folgende Tabelle die Auswertung veranschaulichen. Standardabweichung und Signifikanz wurden nicht ermittelt. Auf komplette Auflistung aller Zählwerte soll hier verzichtet werden.

Obturasil 40 Staph. Epi.	Zählung 1	Zählung 2	Zählung 3	Zählung 4	Mittelwert
beschichtet	105	133	122	114	118,5
unbeschichtet	171	185	177	201	183,5

Verringerte Bakterienanhaftung der beschichteten Probekörper: 35,42%

Anhand der Abbildung 21 aus den Versuchen, die unter 2.6.2 beschrieben wurden, soll nur am Beispiel des Bakterienstamms *Escherichia coli* gezeigt werden, wie sich die mit den Kolonien bewachsene Agarplatte darstellt. Aus je vier ausgezählten Agarplatten wurde der Mittelwert bestimmt. Aus dem Verhältnis der Mittelwerte von gleichartigen Probekörpern eines Silikons mit und ohne amphoterer Beschichtung erfolgte die Ermittlung der Bakterienreduktion. Dabei konnte eine verringerte Bakterienadhäsion von 20% bis 67% nachgewiesen werden.



Abbildung 21: *Escherichia coli* Kolonien auf einer Agarplatte

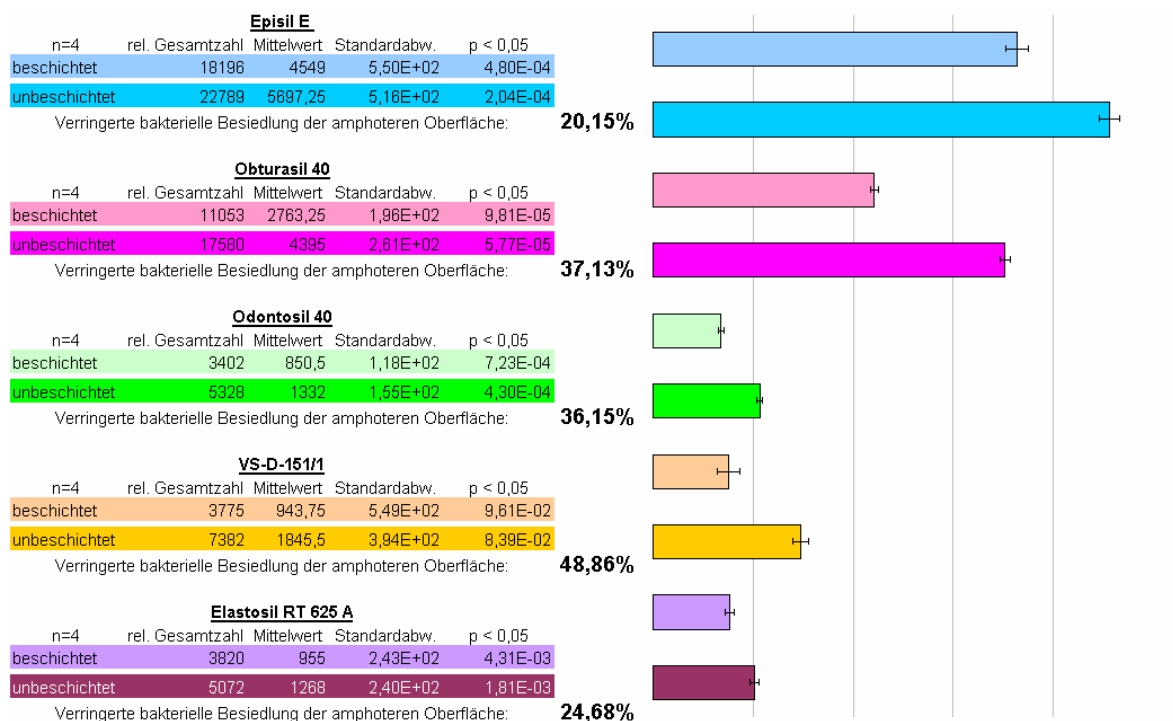
3.3 Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

Die Auswertungen durch das Fluoreszenzmessgerät wurden alle optisch unter dem Fluoreszenzmikroskop verifiziert und durch die Auszählung der unter 3.2 beschriebenen klassischen Methode bestätigt.

Die im folgenden abgebildeten Balkendiagramme dienen zur Veranschaulichung der relativen Bakterienzahlen. Je Balken ist der Mittelwert aus vier gemessenen Probekörpern mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Dabei wurde vergleichend die prozentuale Reduktion der adhärennten Bakterien mit deren Signifikanz ermittelt. Auf die Beschriftung der Ordinate wurde auf Grund der lediglich vergleichenden Darstellung bewusst verzichtet.

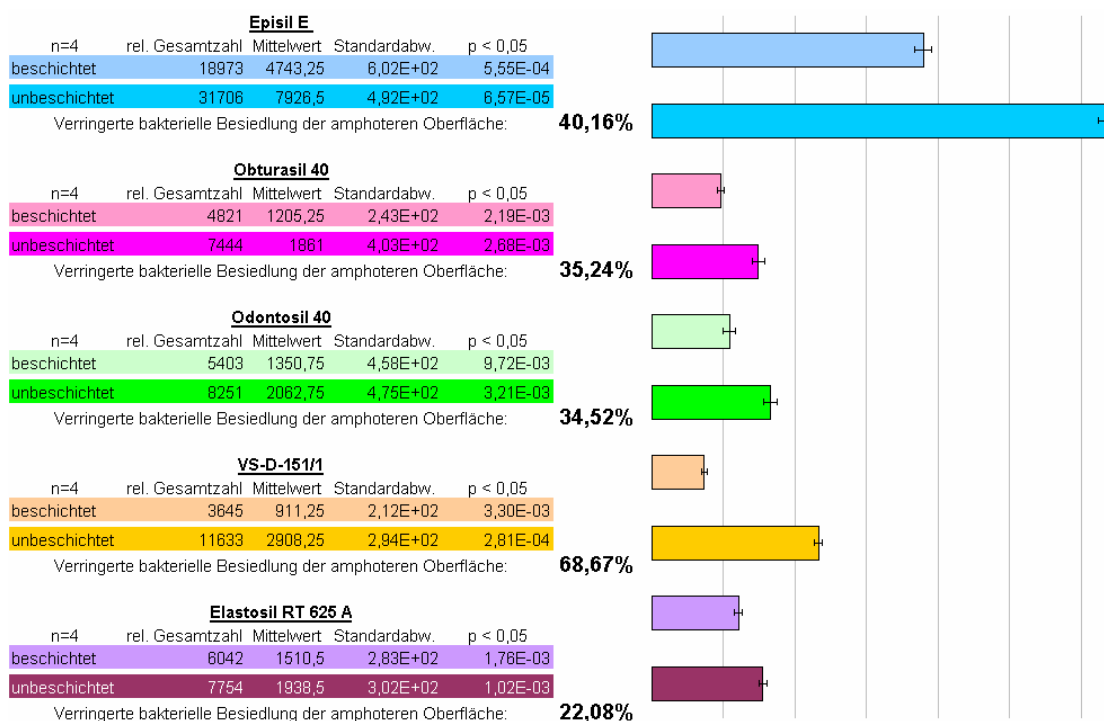
Allgemein konnte bei den untersuchten, mit einer amphoteren Schicht modifizierten Silikonen im Vergleich zu den unbeschichteten Probekörpern eine signifikante Reduktion der bakteriellen Adhäsion von 14% bis 69% festgestellt werden.

Streptococcus epidermidis



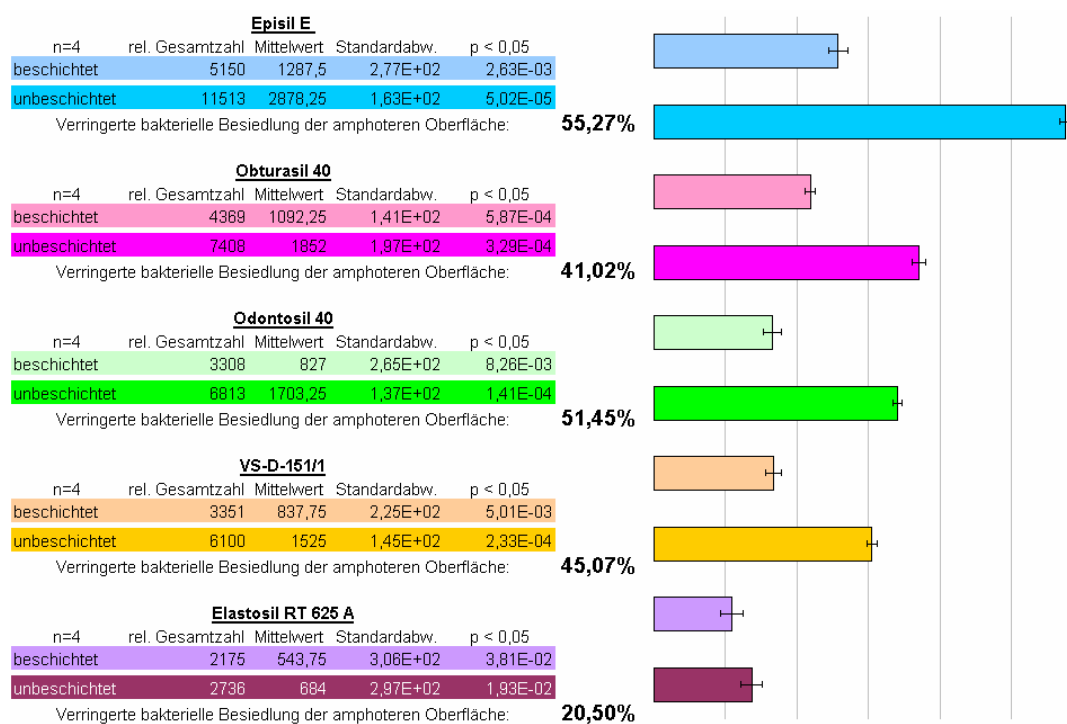
Das Bakterium Streptococcus epidermidis Stamm RP 62 A zeigte auf allen amphoter beschichteten Silikonen im Vergleich zu den unbeschichteten Silikonen eine Reduktion der bakteriellen Adhärenz. Hierbei waren Werte von 20% bei Episil-E bis zu 49% bei VS-D-151/1 festzustellen.

Klebsiella pneumonia



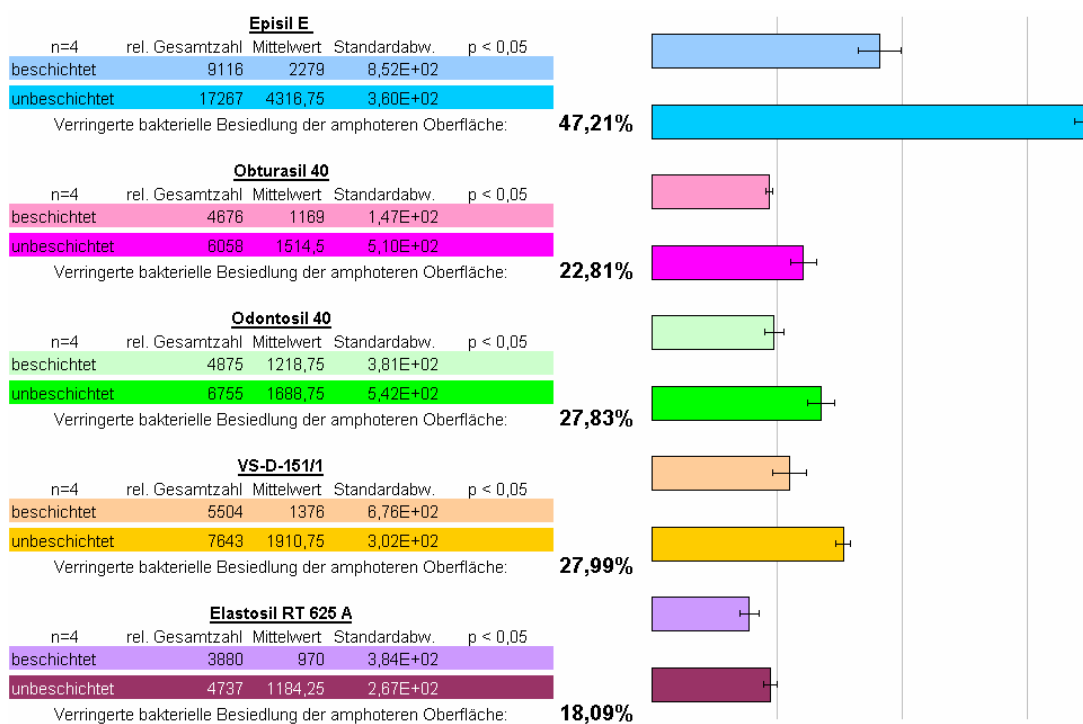
Die Versuchsreihe mit dem Bakterium Klebsiella pneumonia Stamm 3091 hatte mit dem Silikon VS-D-151/1 den prozentual höchsten Wert des gesamten Versuchs der bakteriellen Reduktion von fast 69%. Die übrigen beschichteten Silikone wiesen eine Keimverminderung von 22% bei Elastosil RT 625 A bis 40% bei Episil-E auf.

Unpathogene Neisserien



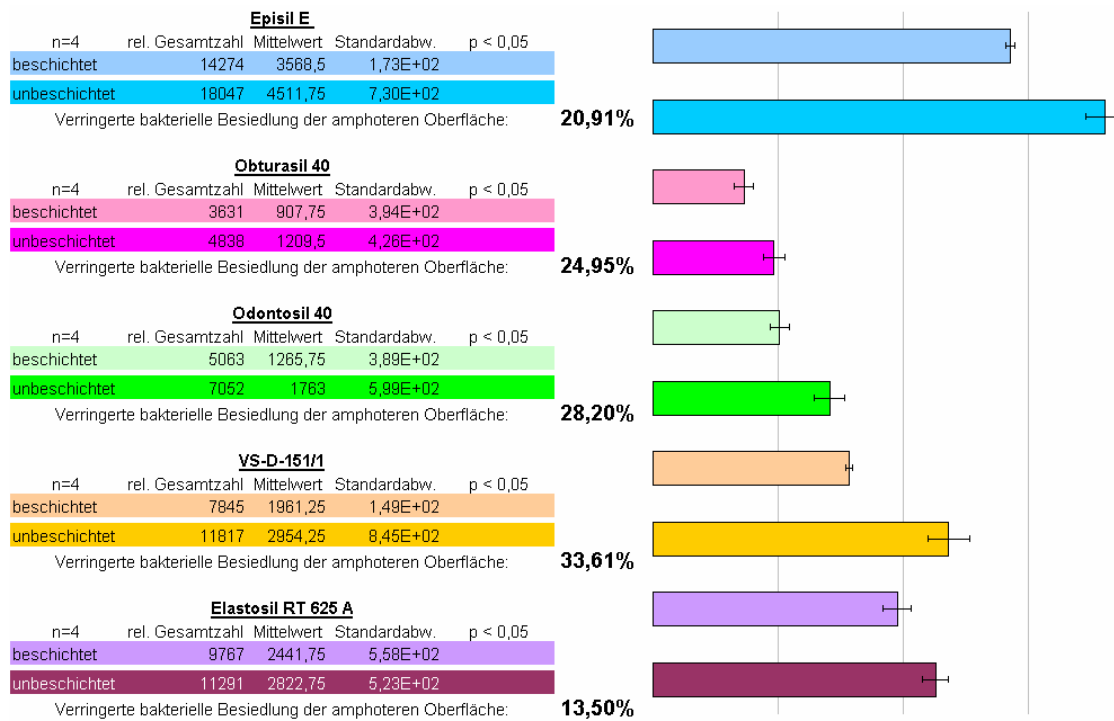
Der einzige vom Patienten gewonnene Stamm von unpathogenen Neisserien ergab bei jedem beschichtetem Silikon eine bakterielle Reduktion. Hier lagen die gemessenen Werte zwischen knapp 21% bei Elastosil RT 625 A und 55% bei Episil-E.

Escherichia coli



Bei den Versuchen mit Escherichia coli des Stamms HB 101 konnten Keimreduktionen von 18% bei Elastosil RT 625 A bis 47% Episil-E nachgewiesen werden.

Streptococcus salivarius



Bei der Austestung mit *Streptococcus salivarius* des Stamms 259 auf den beschichteten Silikonen, erwies sich Elastosil RT 625 A mit knapp 14% bakterieller Reduktion als das mit dem geringsten prozentualen Wert im Testfeld. Die anderen Silikone waren mit bakteriellen Reduktionen von bis zu 34% bei VS-D-151/1 vertreten.

Ein Vergleich der unterschiedlichen Silikone in den Diagrammen untereinander ist auf Grund ungleicher Ausgangssituationen, wie initialer Bakterienanzahl, Wachstumsbedingungen und anderer Einflüsse nur bedingt möglich. Lediglich das Verhältnis von beschichteter zu unbeschichteter Oberfläche wurde erfasst und dargestellt.

Auffällig ist allerdings das gehäufte Vorkommen von Elastosil RT 625 A als eines derjenigen Silikone, die die geringste bakterielle Adhäsionsreduzierung bei fast allen Bakterienstämmen aufweisen. Weitere Besonderheiten konnten nicht ermittelt werden.

3.4 Fluoreszenzmikroskopische Bilder

Sämtliche Probekörper wurden nach der Analyse im Fluoreszenzmessgerät sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop optisch nachuntersucht und digital fotografiert. Eine nachträgliche Bildbearbeitung durch ein Bildbearbeitungsprogramm fand nicht statt. Die so gewonnenen optischen Eindrücke bestätigen subjektiv die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen. Folgende Bilder dienen zur weiteren Veranschaulichung und sind repräsentativ für die unter 3.3 aufgeführten Ergebnisse.

Der Vergrößerungsfaktor der Bilder kann auf Grund fehlender Referenzmarkierung, der unbekanntem CCD-Sensorgröße und damit unbekanntem Brennweitenverlängerungsfaktor der Digitalkamera nicht angegeben werden.

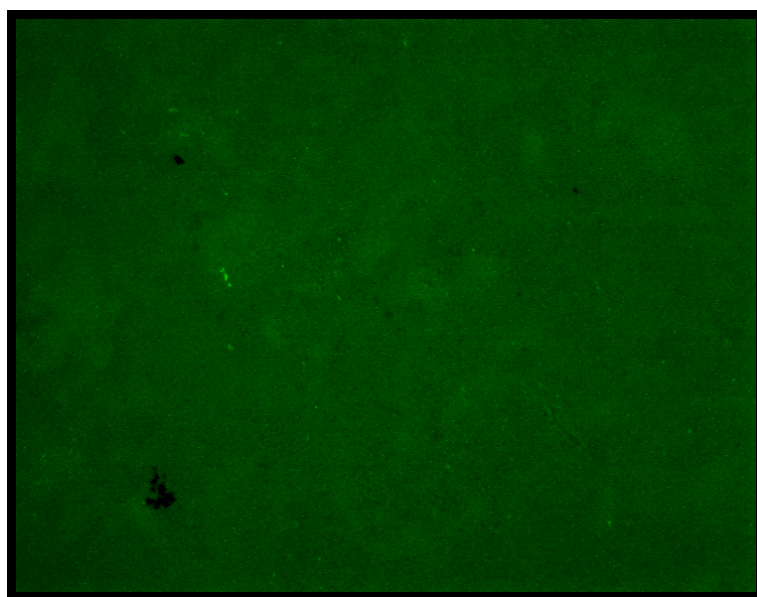


Abbildung 22: Unbesiedelte natürliche Silikonoberfläche

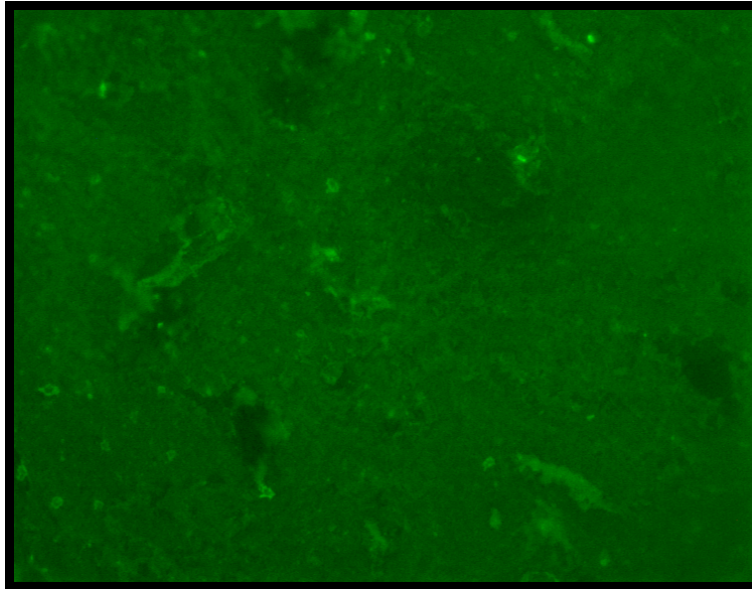


Abbildung 23: Unbesiedelte amphotere Beschichtung

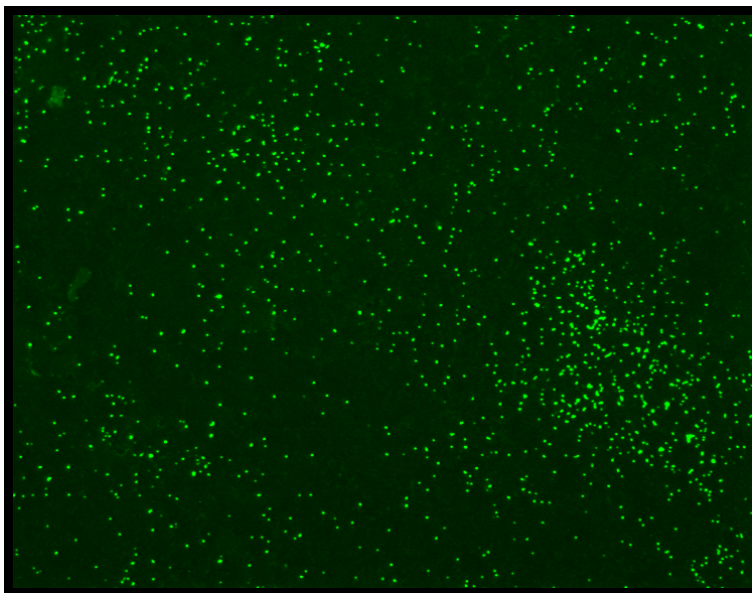


Abbildung 24: Mit *Staphylococcus epidermidis* besiedelte natürliche Silikonoberfläche

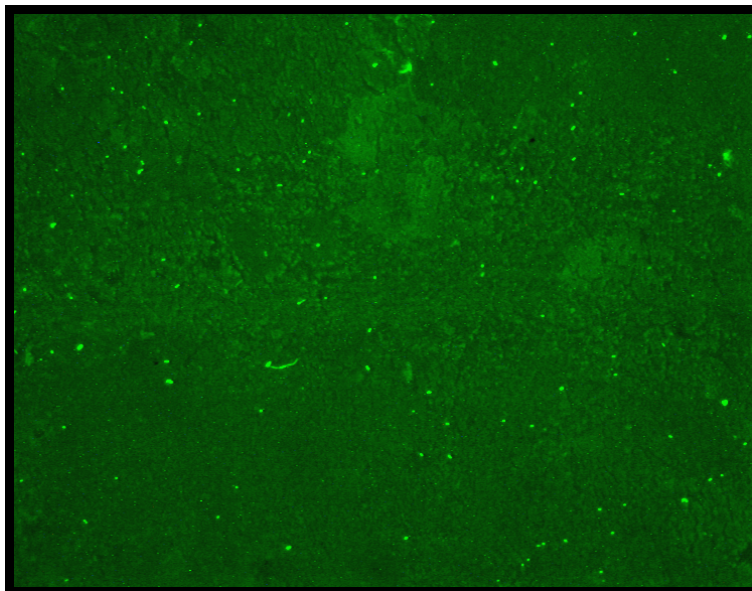


Abbildung 25: Mit *Staphylococcus epidermidis* besiedelte amphotere Beschichtung

Deutlich ist die vergleichsweise geringe bakterielle Besiedlung der amphoter beschichteten Silikone zu erkennen (vgl. Abbildung 25). Ferner ist auffällig, dass der verwendete Farbstoff SYBR[®] Green I eine höhere Affinität zur amphoteren Beschichtung hat und diese stärker anfärbt, als zur unbeschichteten Silikonoberfläche. Dadurch entstehende, eventuell verfälschende Einflüsse auf die Messergebnisse im Fluoreszenzmessgerät wurden immer durch eine Vergleichsmessung zu unbesiedelten, aber dennoch beschichteten Probekörpern ausgeschlossen. Zudem hat man durch die vorher durchgeführte Versuchsreihe mit der unter 3.2 beschriebenen klassischen Analyse eine gute Kontrollmöglichkeit des Ergebnisses.

4 Diskussion

4.1 Kritik an der Auswahl der Silikone

Das auf dem deutschen Dentalmarkt angebotene Spektrum an inkorporierbaren Silikonen, die im zahnmedizinischen Randgebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik und Epithetik Anwendung finden, ist sehr gering. Sowohl der sehr niedrige Bedarf, gemessen an der Jahresgesamtproduktion an Silikon, als auch die Zertifizierung „medical-grade“, treiben die Herstellungskosten dieser Produkte in die Höhe. Daher hat sich nur eine kleine Anzahl von silikonproduzierenden und -vertriebenden Firmen auf dem deutschen Dentalmarkt etabliert. Der Marktführer für Silikone in der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik und Epithetik, die Firma Dreve Dentamid GmbH, stellte kostenfrei Silikone zur Austestung zur Verfügung und entwickelte zudem ein silikonölfreies Versuchssilikon. Die Auswahl der Silikone erfolgte daher aus Gründen der Einsatzhäufigkeit und Wirtschaftlichkeit.

4.2 Kritik an der Auswahl der Bakterien

Die Entscheidung, welche Bakterienstämme für die Untersuchungen sinnvoll sind, erfolgte bereits im Vorfeld nach mikrobiologischer Auswertung inkorporierter Patienten-Silikonkörper (LEEMING et al. 1998). Eine repräsentative Auswahl immer wieder nachgewiesener Keime, sowohl grampositiv als auch gramnegativ diente als Grundlage. Die Vielzahl der tatsächlich nachweisbaren Keime ist weitaus höher und immer patientenspezifisch. Bisher konnten rund 500 unterschiedliche Bakterienarten im Mund nachgewiesen werden (CARLSSON et al. 1989). Die Anzahl und Verteilung der Keime hängt weitestgehend vom für die Bakterien zur Verwertung stehenden Substrat, dem Wirtsorganismus und dessen Immunsystem ab. Ferner ist zum Keimnachweis der Zeitpunkt des mikrobiologischen Abstrichs nicht zu vernachlässigen, da die Quantität und Qualität sogenannter Pionierbakterien und Spätbesiedler vom Entnahmezeitpunkt abhängig ist.

Die unter LEEMING (1998) durchgeführte mikrobiologische Auswertung der Patientenabstriche ergab, dass nicht nur bakterielle Plaques unterschiedlicher Spezies zu finden waren, sondern auch vermehrt Pilze und Hefen. Vor allem sei hier *Candida albicans* genannt, da dieser Pilz bei jedem Abstrich nachgewiesen wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich auf fünf Bakterienstämme, die einen Querschnitt des anzutreffenden Spektrums darstellen sollen. Es ist allerdings festzuhalten, dass umfangreiche weiterführende Analysen unter Beachtung und separater Betrachtung von Pilzen und Hefen auf monokultureller Basis und auch bakterielle Mischflora mit folgender Untersuchung an einer Patientenmischflora durchgeführt werden müssen, um weitere gesicherte Erkenntnisse zu gewinnen. Die Interaktion verschiedener Keime untereinander und das Zusammenspiel von Bakterien, Pilzen und Hefen spielen hierbei vermutlich eine gewichtige Rolle.

Zudem ist eine patientenrelevante Analyse notwendig, die die Ernährungsgewohnheiten, die Zusammensetzung des Speichels und der Sekrete berücksichtigt. In wie weit diese Körperflüssigkeiten Einfluss auf die Haltbarkeit von Silikonen haben, ist fraglich.

4.3 Kritik der Methoden

4.3.1 Diskussion der Analytik

Die Wahl des klassischen Zählverfahrens und damit der Bestimmung der colony forming units ist in der Mikrobiologie eine sehr sichere Standardmethode, die im Lauf der Zeit durch eine Vielzahl von unterschiedlichen, größtenteils computergestützten Zählmethoden ergänzt wurde. Die klassische Analyse hat auf Grund häufig durchzuführender Einzelschritte viele mögliche Fehlerquellen und ist in der Auszählung der absoluten Bakterienanzahl recht ungenau, da das Zählergebnis immer hochgerechnet werden muss.

Ferner darf bei dieser Anwendung der zeitliche Aspekt nicht vernachlässigt werden. Im Vergleich zu einer computergestützten Auszählung mittels Fluoreszenzfärbung, die etwa einen Zeitaufwand von zwei Stunden benötigt, bis ein gesichertes Zählergebnis vorliegt, liegt die klassische Auszählung bei 24 Stunden bis zwei Tagen. Dies ist hauptsächlich auf Verdünnungsreihen und dem koloniebildendem Wachstum der Bakterienkulturen zurückzuführen.

Zusammenfassend ist der Einsatz der computergestützten Fluoreszenzmessung, die eines hohen technischen Aufwands bedarf, eine exakte und effektive Methode Bakterien auszuzählen. Die größte mögliche Fehlerquelle hierbei ist die Verwendung des Farbstoffs SYBR[®] Green I, die unter 4.3.4 separat diskutiert wird.

4.3.2 Diskussion der Bakterienablösung von der Oberfläche

Ein Problem der klassischen Analyse stellte die Entfernung der adhärierenden Bakterien von der Oberfläche der Probekörper dar. Ziel war es, alle Bakterien von der Oberfläche abzulösen und in eine Nährlösung zu überführen. Das Ablösen der Bakterien sollte nach SIEGEL nicht mittels Ultraschall erfolgen, da auf Grund des viel zu hohen Energieeintrags die amphotere Oberfläche Schaden nehmen könnte. Er fordert als Mittel der Wahl das Vortexen. Dennoch wurde das Ultraschallbad eingesetzt, da sich damit eine im Vergleich gesicherte Ablösung der adhärierenden Bakterien erzielen lies. Zudem war eine intakte oder zerstörte Beschichtung für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung. Eventuell könnten durch den Ultraschall in Lösung gegangene Beschichtungsbruchstücke Einfluss auf die Vermehrung der Bakterien in der Nährlösung haben. Ein Nachweis darüber wurde nicht erbracht.

4.3.3 Silikone im Fluoreszenzmessgerät

Bei den durchgeführten Probemessungen von ungefärbten Probekörpern, also unbehandeltem Silikon, im Fluoreszenzmessgerät SpectraFluor Plus war zu beobachten, dass Silikone per se über eine geringe Eigenfluoreszenz verfügen.

Aus diesem Grund kann keine Aussage über eine absolute Bakterienanzahl auf der Oberfläche getroffen werden, da nicht auszuschließen ist, dass auch die Hintergrundfluoreszenz des Silikons als falsch positiver Wert mit gemessen wird. Die ermittelten Ergebnisse können demzufolge nur als vergleichende Messungen gewertet werden, die auf der Messung von den jeweiligen Referenz-Probekörpern basieren. Für die durchgeführten Untersuchungen sind ohnehin vergleichende Messungen sinnvoller. Durch die Auswertungen lässt sich lediglich eine Aussage über die prozentuale bakterielle Reduktion oder Erhöhung treffen.

4.3.4 Der Farbstoff SYBR[®] Green I

Der DNA-Farbstoff findet auf unterschiedlichen Gebieten der Mikrobiologie und Biochemie Anwendung. In den durchgeführten Untersuchungen diente er lediglich des „Sichtbarmachens“ und damit der computergestützten Auszählung der Bakterien. Prinzipiell hätte man auf andere Farbstoffe, die Bakterien oder deren Inhaltsstoffe selektiv anfärben, zurückgreifen können. Da aber der Farbstoff auf die Filter im Fluoreszenzmessgerät abgestimmt sein muss und SYBR[®] Green I ein Fluoreszenz-Exzitations- und Fluoreszenz-Emissions-Maximum bei dem Wert von 497 nm und 520 nm aufweist, was den vorhandenen Filtern von 485 nm und 535 nm sehr gut entspricht, ist die Wahl des SYBR[®] Green I ideal.

Die Auslieferungsform des Farbstoffs ist hoch konzentriert, so dass eine Verdünnung mit einem Verdünnungsmedium durchgeführt werden muss. Aus zahlreichen Vorversuchen, konnte das beste Medium und die passende Verdünnung des Farbstoffs ermittelt werden. Wichtig dabei war die Oberfläche des Probekörpers, ob beschichtet oder nicht, möglichst wenig anzufärben bei gleichzeitiger intensiver Anfärbung der Bakterien-DNA.

Als problematisch stellte sich die Affinität des Farbstoffs zur amphoteren Oberflächenbeschichtung dar; stärker als bei der unbehandelten Silikonoberfläche ließ sich eine Hintergrundfluoreszenz nachweisen (vgl. Abbildungen 23 und 25). Das heißt der Farbstoff lagert sich offenbar in oder an die amphotere

Beschichtung. Wie bereits unter 4.3.3 beschrieben, war die Messung nur im Vergleich mit unbesiedelten Referenz-Probekörpern möglich.

Da der Farbstoff sehr licht- und temperaturempfindlich ist, ist eine Lagerung der abgefärbten Probekörper über einige Tage hinweg nur unter Lichtausschluss und Kühlung möglich. Selbst bei längerer Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop schwindet durch das auftreffende, gefilterte Licht die Intensität des grünen Farbstoffs der Färbung rasch.

4.3.5 Diskussion der Fluoreszenzmessung

Das Fluoreszenzmessgerät SPECTRAFluor Plus der Firma Tecan ist ein modernes Analysegerät mit unterschiedlichen Anwendungsbereichen in der Zellbiologie. Mit der dazugehörigen Magellan-Software oder dem „XFLUOR“-Programm lassen sich gemessene Werte und Ergebnisse leicht in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel konvertieren und dort weiter statistisch bearbeiten.

Die Bedienung der Software und des Geräts ist einfach und verständlich. Bei den mehr als 600 Messungen gab es keine Störungen oder Ausfälle. Das Gerät liefert auch bei mehrmalig hintereinander durchgeführten Messungen einer Probekörperreihe im Rahmen der für das SPECTRAFluor Plus vom Hersteller angegebenen Messgenauigkeit identische Werte. Damit sind alle Messungen über einen gewissen Zeitraum hinweg (vgl. 4.3.4) reproduzierbar.

4.4 Kritik an der Auswahl der Beschichtungen

4.4.1 Oberflächenmodifikation mit einer Titan-Iridium-Schicht

Aus der Erkenntnis, dass auf einer glatten Titanoberfläche die bakterielle Adhäsion gering ausfällt (KAWAHARA et al. 1998) und daher das Problem der raschen bakteriellen Besiedlung in der Defektversorgung von Mund-, Kiefer- und Gesichtsdefekten mittels Titanresektionshohlkörpern nur eine untergeordnete

Rolle spielt, entstand der Gedanke, Silikone mit einer Titan-Iridium-Schicht zu überziehen. Das Verfahren der Firma GfE Metalle und Materialien GmbH, die plasmaaktivierte Gasphasenabscheidung und die damit verbundene metallische Oberflächenbeschichtung ist für Kunststoffe wie Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyurethan (PUR) im medizinischen Einsatz in der Endphase der Testung. Die Beschichtung dieser Kunststoffe bestand alle physikalischen Anforderungen zur Implantation.

Die Beschichtung von Silikonkörpern mit dem gleichen Verfahren stellte sich als äußerst schwierig dar. Wie bereits beschrieben, ist es nicht gelungen, eine belastbare Schicht auf eine Silikonoberfläche aufzubringen. Sollte es sich jedoch realisieren lassen, eine metallische Schicht auf die Oberfläche von Silikonen zu generieren, ist es dennoch fraglich, ob diese Schicht den extremen physikalischen Kräften standhalten kann.

4.4.2 Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht

Die Oberflächenmodifikation mit einer amphoteren Schicht kennt diese Problematik nicht, da hierbei funktionelle Gruppen kovalent an die Oberfläche des Silikons gebunden werden. Aus physikalischer Sicht sollte diese Art der Beschichtung unproblematisch sein. Hier gilt das Interesse vielmehr der chemischen Basis. Erfüllt der Werkstoff Silikon nach der Modifikation immer noch die Kriterien eines Biomaterials und darf dieser inkorporiert werden? Diese Frage lässt sich nur durch umfangreiche Untersuchungen klären, die bisher noch ausstehen.

Ferner zeigen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abbildung 19) dieser Beschichtung eine durch Lakunen und Löcher stark vergrößerte Oberfläche, die noch weiterer Untersuchungen bedarf. Eine derartige Oberfläche weist sicherlich eine erhöhte Rautiefe auf, die Retention für Ablagerungen von Nahrungsmittelbestandteilen und Speichel darstellen.

4.5 Ergebniskritik

Im Vergleich zeigten die Werte der Messungen der unterschiedlichen Silikone bei allen ausgetesteten Bakterien eine statistisch signifikante Reduktion ihrer Adhäsion an den amphoter beschichteten Silikonoberflächen von 14% bei Elastosil RT 625 A besiedelt mit *Streptococcus salivarius* bis zu 69% bei VS-D-151/1 besiedelt mit *Klebsiella pneumoniae*. Um dieser Tatsache auf den Grund zu gehen, bedarf es einer genaueren Betrachtung der Grenzschicht und des Wechselspiels „Silikonoberfläche – Bakterium“.

Zunächst ist die Adhäsion von Bakterien an eine Polymeroberfläche von den Oberflächenladungen abhängig (SPIJKER et al. 1999). Nach SIEGEL weist, die durch das nass-chemische Verfahren modifizierte Silikonoberfläche gleichermaßen anionische wie kationische Ladungsträger auf. Seine Behauptung, dass ein Bakterium egal welcher Ladung, von der gleichnamigen Ladung der amphoteren Oberfläche abgestoßen wird, kann nach den Grundgesetzen der Physik bestätigt werden. Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass sich entgegengesetzte Ladungen anziehen und somit ein unerwünschter Anziehungseffekt hervorgerufen werden kann.

Diese physikalische Gesetzmäßigkeit ist nicht der einzige Grund, der Bakterien zur Adhäsion an Oberflächen veranlasst. Wie bereits unter 1.5.1. beschrieben, ist die primäre Bindung eines Bakteriums, in diesem Fall *Staphylococcus epidermidis*, an eine Polymeroberfläche ein multifaktorielles Geschehen. Dabei spielen nach ESPERSEN et al. (1990), HOGT et al. (1985 & 1986), LUDWICKA et al. (1984), PASCUAL et al. (1986) und TOJO et al. (1988) hauptsächlich Oberflächenproteine, niedermolekulare Kräfte und hydrophobe Wechselwirkung der Oberflächen eine entscheidende Rolle.

Somit kann eine, nur auf Oberflächenladung basierende modifizierte Oberfläche nie eine komplett bakterienabstoßende Oberfläche darstellen, sondern nur eine veränderte bakterielle Adhäsion hervorrufen.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass vor allem mit Episil-E der Firma Derve Dentamid GmbH durch die Beschichtung eine deutliche Reduktion der

Keimanhaftung erreicht werden konnte. Die Werte lagen für diese modifizierte Silikonoberfläche bei 20% bis 55%. Über die Ursache diesbezüglich kann gesagt werden, dass dieses Silikon von der Herstellung her das einzige war, welches eine thermische Polymerisation im Ofen bei 75 °C erfahren hatte und somit entweder die Bakterienadhäsion bei unbehandelter Oberfläche begünstigt oder die amphotere Beschichtung hierbei am wirksamsten ist.

Konstant geringere Werte präsentierte das Elastosil RT 625 A der Firma Wacker Chemie GmbH. Hierbei lag die bakterielle Reduktion bei 13% bis 25%. Durch das Anmischen des 1:9 Silikons von Hand (Silikonteile Katalysator und Basis mussten durch Wiegen ermittelt werden) entstehen während der Polymerisation im Vergleich zu den anderen Silikonen, die durch die Kartuschenmischung exakter dosiert werden können, ein Ungleichgewicht mit Überschuss eines nicht in die Reaktion mit aufgenommenen Reaktionspartners. Dabei kommt es zur Qualitätsminderung. Das Silikon Episil-E, das durch eine Langzeitpolymerisation im Ofen bei 75 °C aushärtet, hat vergleichsweise weniger freie Reaktionspartner. Bei Elastosil R 625 A liegt im Silikon und an seiner Oberfläche ein Reaktionspartner im Überschuss vor, der wiederum mit den kovalenten Bindungen der amphoteren Oberfläche in Wechselwirkung treten könnte und damit die Wirkung der amphoteren Beschichtung schwächt. Dieser Effekt könnte zu einer Erhöhung der bakteriellen Adhäsion führen.

Da nur Bakterienmonokulturen und nicht vom Patienten entnommene Mischkulturen, die größtenteils zur Biofilmbildung befähigt sind, untersucht wurden, steht noch offen, ob sich die positiven Resultate in vivo übertragen lassen.

Schließlich ist bei gelungener Bakterienreduktion oder gar völliger Bakterienfreiheit auf der Silikonoberfläche und damit veränderten Selektionsdruck fraglich, was für ein neues biologisches Gleichgewicht sich einzustellen vermag.

4.6 Weitere mögliche Denkansätze

Die permanent hohe Keimbelastung auf den Silikonkörpern ist für die meist ohnehin schon immungeschwächten Patienten nach einer Tumoroperation belastend. Die Bakterien leisten einer Fremdkörper-assoziierten Infektion Vorschub und erschweren damit die Genesung der Patienten.

Um die Haltbarkeit der inkorporierten Silikonformteile zu verlängern, gibt es verschiedene Denkansätze. Die momentan einfachste und praktikabelste ist eine Desinfektion des Silikonkörpers in Dibromol[®]-Tinktur für eine Stunde alle drei Tage (KUTZ et al. 2001). Wie sich dabei das Silikon als Werkstoff verändert, ist bisher noch nicht ausführlich untersucht worden. Festzustellen in der Praxis ist je nach Größe des Silikonformteils eine Schrumpfung und damit verloren gegangene Passgenauigkeit, die nach einer gewissen Zeit eine Neuanfertigung unumgänglich macht. Eine Unterfütterung, wie diese aus der Zahnmedizin bei Prothesen bekannt ist, ist wegen der sehr reaktionsträgen Oberfläche des Silikons nicht durchführbar.

Eine weitere denkbare Lösung die Keimbelastung zu reduzieren, sind SAM (Sustainable Active Microbicidal) -Polymere[®] (vgl. 1.8) (Bericht AICHEMA 2003). In wie weit diese Form der Polymere sich auf Silikone übertragen lässt und ob diese sich dann noch für medizinische Zwecke eignen sei dahingestellt.

Eine permanente Abgabe eines antibiotischen Wirkstoffs, im Sinne einer permanenten Antibiose, aus den Silikonkörpern ist wegen der Ausbildung möglicher Resistenzen und der Verschiebung der Flora zugunsten der Hefen und Pilze eher ungeeignet.

4.7 Schlussfolgerungen und Prognose

Prinzipiell ist festzuhalten, dass alle Silikone durch das nass-chemische Beschichtungsverfahren mit seiner amphoteren Oberfläche eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion aufweisen.

Die vorliegenden in vitro Ergebnisse geben zu der Hoffnung Anlass, dass mit der amphoteren Beschichtung von Silikonoberflächen ein wirksames Mittel gegen die rasche Verkeimung von temporär inkorporierten Silikonkörpern zur Verfügung steht. Die in der Untersuchung gefundenen mikrobiologischen Daten sind uneingeschränkt positiv zu bewerten.

5 Zusammenfassung

Der bakterielle Bewuchs auf inkorporierten Silikonkörpern ist seit Einführung des Werkstoffs Silikon in die Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik ein erhebliches Problem, das nicht nur die Haltbarkeit der Silikonkörper herabsetzt, sondern auch die Lebensqualität und die Gesundheit der Patienten vermindert. Alternativen zum Werkstoff Silikon sind heutzutage das Methacrylat und Titan, die jedoch nicht die Vorteile des Silikons aufweisen. Um Silikone in der Mund-, Kiefer- und Gesichtsprothetik einsetzen zu können, bedarf es seitens des Patienten eines großen Pflegeaufwands, der eine zu schnelle Verkeimung des Silikonkörpers und eine damit verbundene Unbrauchbarkeit verhindern soll. Durch eine geeignete Oberflächenmodifikationen, einer amphoteren Oberflächenbeschichtung, kann dieser Verkeimung entgegengewirkt werden. Die Wirksamkeit der bakteriellen Reduktion dieser Modifikation wurde in einer vergleichenden in vitro Untersuchung mit fünf Bakterienstämmen (*Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, unpathogene *Neisserien*, *Escherichia coli* und *Streptococcus salivarius*) und fünf Silikonen (Episil-E, Obturasil 40, Odontosil 40, VS-D-151/1 und Elastosil RT625A) erforscht.

Insgesamt wurden über 800 Proben untersucht. Die Silikonprobekörper wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine davon wurde mittels eines nass-chemischen Verfahrens amphoter beschichtet. Die andere diente als Referenz.

Die Analyse erfolgte auf zwei Wegen: Nach Inkubation von je vier beschichteten und vier unbeschichteten Probekörpern mit einer Bakterien-Monokultur schloss sich die mikrobiologische Auswertung im klassischen Stil an. Die auf den Probekörpern adhärenen Bakterien wurden entfernt, nach einer Verdünnungsreihe auf Agarplatten erneut angezüchtet, anschließend bebrütet und die entstandenen Kolonien ausgezählt. Die so erhaltenen Werte, die „cfu“ (colony forming units), wurden als Kontrolle der computergestützten Fluoreszenzmessung erfasst.

Die zweite Methode entsprach bis zum Ablösen der Bakterien von den Probekörpern der ersten. Alle adhärenenten Bakterien verblieben auf den Silikonen, wurden mittels eines Bakterien-DNA-Farbstoffs angefärbt und computergestützt mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgeräts ausgezählt und statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse der klassischen mikrobiologischen Methode bestätigten die Messungen mit dem Fluoreszenzmessgerät. Die Untersuchungen ergaben, dass die amphotere Oberflächenmodifikation bei allen Silikonen eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion zur Folge hatte. Dabei konnten statistisch signifikante Werte von 14% bis zu 69% ermittelt werden.

Durch die amphoter modifizierte Oberfläche wird die Adhäsion von Bakterien reduziert. Ein möglicher Grund hierfür ist der elektrostatische Zustand an der Grenzschicht beschichteter Oberfläche zum Bakterium.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass durch die amphotere Beschichtung von Silikonen ein Potential zur Reduktion der Keimbesiedelung gegeben ist. In welchem Maß sich diese Veränderung des Werkstoffs auswirkt und welche weiteren Alternativen sich bieten, muss in kommenden in vitro Tests und anschließenden in vivo Untersuchungen verifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. ANDERSON J.M.: Inflammatory response to implants. *ASAIO Transactions* 34, 101-7 (1988)
2. ARCHER G.L., CLIMO M.W.: Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2231-7 (1994)
3. BARTH E., MYRVIK Q.M., WAGNER W., GRISTINA A.G.: In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomater.* 10, 325-8 (1989)
4. BAYSTON R., PENNY SR.: Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SIIA*: A possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child Neur.* 14 (Suppl 27), 258 (1989)
5. BAYSTON R., ROGERS J.: Production of extra-cellular slime by *Staphylococcus epidermidis* during stationary phase of growth: its association with adherence to implantable devices. *J. clin. Pathol.* 43, 866-70 (1990)
6. BENGTSON S., BLOMGREN G., KNUTSON K., WIGREN, A., LIDGREN L.: Hematogenous infection after knee arthroplasty. *Acta orthop. scand.* 58, 529-34 (1987)
7. BREME F.: Beschichtung von Kunststoffen mit titan- und tantalhaltigen Materialien durch plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung Diss. Tech. Fak. Universität Erlangen-Nürnberg (1999)
8. BUSSCHER H.J., BOS R., VAN DER MEI H.C.: Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 229-34 (1995)
9. CARLSSON J.: Microbiology of plaque-associated periodontal disease. In: LINDHE J., ed. *Textbook of clinical periodontology*. 2nd ed. Copenhagen (1998)
10. CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., BISNO A.L., BEACHEY E.H.: Adherence of slime producing *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immunity* 37, 318-26 (1982)
11. CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., YOUNGER J.J., BADDOUR L.M. et al.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. clin. Microbiol.* 22, 996-1006 (1985)

12. CHRISTENSEN G.D., BADDOUR L.M., HASTY D.L., LOWRANCE J.H., SIMPSON W.A.: Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections. In: BISNO A.L., WALDVOGEL F.A. (Hrsg.): Infections associated with indwelling medial devices. American Society of Microbiology, Washington DC, 27-59 (1989)
13. COSTERTON J.W., STEWART P.S., GREENBERG E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-22 (1999)
14. DANKERT J., HOGT A.H., FEIJEN J.: Biomedical polymers: Bacterial adhesion, colonization and infection. *CRC: Crit. Rev. Biocompat.* 2, 219-301 (1986)
15. DAVENPORT D.S., MASSANARI R.M., PFALLER M.A., BALE M.J. et al.: Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J. infect. Dis.* 153, 332-9 (1987)
16. DEIGHTON M.A., BALKAU B.: Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. clin. Microbiol.* 28, 2442-7 (1990)
17. DENSTEDT J.D., WOLLIN T.A., REID G.: Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *J. of Endourol.* 12, 493-500 (1998)
18. DIAZ-MITOMA F., HARDING G.K.M., HOBAN D.J., ROBERTS R.S. et al.: Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J. infect. Dis.* 156, 555-60 (1987)
19. DOUGHERTY S.H., SIMMONS R.L.: Infections in bionic man: the pathobiology of infections in prosthetic devices – Part I. *Curr. Prob. Surg.* 19, 217-64 (1982)
20. DUNNE W., NELSON M.D.B, CHUSID M.J.: Epidemiological markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6, 1031-5 (1987)
21. ESPERSEN F., WILKINSON B.J., GAHRN-HANSEN B., ROSDAHL V.T. et al.: Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *Acta pathol. microbiol. scand., B. Microbiol.* 98, 471-8 (1990)
22. FRANSON T.R., SHETH N.K., ROSE H.D., SOHNLE P.G.: Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J. clin. Microbiol.* 20, 500-5 (1984)

23. GACESA P.: Bacterial Alginate Biosynthesis – Recent Progress and Future Prospects. *Microbiology* 44, 1133-43 (1998)
24. GILBERT P., DAS J., FOLEY I.: Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-7 (1997)
25. GRISTINA A.G.: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237, 1588-95 (1987).
26. HERRMANN M., VAUDAUX P.E., PITTET D., AUCKENTHALER R. et al.: Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. infect. Dis.* 158, 693-701 (1988)
27. HOGT A.H., DANKERT J., FEIJEN J.: Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J. gen. Microbiol.* 131, 2485-91 (1985)
28. HOGT A.H., DANKERT J., FEIJEN J.: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers. *J. biomed. Mater. Res.* 20, 533-45 (1986)
29. HUSSAIN M., HASTINGS J.G.M., WHITE P.J.: Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J. med. Microbiol.* 37, 368-75 (1992)
30. HUSSAIN M., WILCOX M.H., WHITE P.J., FAULKNER M.K. et al.: Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. *J. hosp. Infect.* 20, 173-84 (1992)
31. HUSSAIN M., WILCOX M.H., WHITE P.J.: The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 191-208 (1993)
32. ISHAK M.A., GRÖSCHEL D.G.M., MANDELL G.L., WENZEL R.P.: Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J. clin. Microbiol.*; 22, 1025-9 (1985)
33. JACKSON J.H., COCHRANE C.G.: Leukocyte-induced tissue injury. *Hematology Oncology Clinics of North America* 2, 317-34 (1988)
34. KAWAHARA H., KAWAHARA D., MIMURA Y., TAKASHIMA Y., ONG J. L.: Morphologic studies on the biologic seal of titanium dental implants. Report II. In vivo study on the defending mechanism of epithelial adhesions/attachment against invasive factors. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.* 13/4, 465-73 (1998)

34. KLOOS W.E.: Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: CROSSLEY K.B., ARCHER G.L. (Hrsg.): The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, 113-37 (1997)
35. KUTZ A.F., RENK A., MENIG G.: Auswirkungen von Beschichtungen auf die Oberflächenstruktur und Keimbesiedelung von Silikonen – erste Ergebnisse von in vitro Untersuchungen. Kongressband zum XIII. int. Symposium für chirurgische Prothetik und Epithetik, Linz, 82-7 (2002)
36. KUTZ A.F., RENK A., MENIG G.: Auswirkungen von Beschichtungen auf die Oberflächenstruktur und Keimbesiedelung von Silikonen. Kongressband zum XIV. int. Symposium für chirurgische Prothetik und Epithetik, Linz, 000-0 (2003)
37. LEEMING B.: Untersuchung zur Keimbesiedelung von Silikonen in der Kiefer-Gesichts-Prothetik. Kongressband zum XI. int. Symposium für chirurgische Prothetik und Epithetik, Linz, 142-7 (1999)
38. LUDWICKA A., JANSEN B., WADSTRÖM T., PULVERER G.: Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A 256, 479-89 (1984)
39. LUDWICKA A., UHLENBRUCK G., PETERS G., SENG P.N. et al.: Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A 258, 256-67 (1984)
40. MACK D., FISCHER W., KROKOTSCH A., LEOPOLD K. et al.: The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear $\beta(1-6)$ -linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bact. 178, 175-83 (1996)
41. MACK D., HAEDER M., SIEMSEN N., LAUFS R.: Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. J. infect. Dis. 174, 881-4 (1996)
42. MACK D., NEDELMANN M., KROKOTSCH A., SCHWARZKOPF A. et al.: Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm-production: genetic identification of a hexosamine containing polysaccharide intercellular adhesin. Infect. Immunity 62, 3244-53 (1994)

43. MACK D., RIEDEWALD J., ROHDE H., MAGNUS T. et al.: Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immunity* 67, 1004-8 (1999)
44. MACK D., SIEMSEN N., LAUFS R.: Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. *Zbl. Bakt. Suppl.* 26, 411-3 (1994)
45. MACK D., SIEMSEN N., LAUFS R.: Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adherence. *Infect. Immunity* 60, 2048-57 (1992)
46. MACK D.: Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J. hosp. Infect.* 43, Suppl., 113-25 (1999)
47. MARRIE T.J., COSTERTON J.W.: Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J. clin. Microbiol.* 19, 687-93 (1984)
48. MOLLNES, T.E.: Complement and biocompatibility. *Vox Sang. Suppl.* 2 74, 303-7 (1998)
49. MULLER E., TAKEDA S., GOLDMANN D.A., PIER G.B.: Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immunity* 59, 3323-6 (1991)
50. NEDELMANN M., SABOTKE A., LAUFS R., MACK D.: Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zbl. Bakt.* 1, 287, 85-92 (1998)
51. NOBLE W.C.: Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In: CROSSLEY K.B., ARCHER G.L. (Hrsg.): *The staphylococci in human disease*: Churchill Livingstone, New York, 401-12 (1997)
52. PASCUAL A., FLEER A., WESTERDAAL N.A.C., VERHOEF J.: Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur. J. clin. Microbiol.* 5, 518-22 (1986)
53. PETERS G., LOCCI R., PULVERER G.: Microbial colonization of prosthetic devices: II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B* 173, 293-9 (1981)

54. PETERS G., SCHUMACHER-PERDREAU F., JANSEN B., BEY M. et al.: Biology of *S. epidermidis* extracellular slime. *Zbl. Bakt. Suppl.* 16, 15-31 (1987)
55. PLANCK H.: *Kunststoffe und Elastomere in der Medizin*. Kohlhammer, Stuttgart (1993)
56. PRINTZEN G.: Relevance, pathogenicity and virulence of microorganisms in implant related infections. *Injury* 27 Suppl. 3, SC 9-15 (1996).
57. RAAD I., ALRAHWAN A., ROLSTON K.: *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin. infect. Dis.* 26, 1182-7 (1998)
58. REMES A., WILLIAMS D.F.: Immune response in biocompatibility. *Biomat.* 13, 731-43 (1992)
59. RENK A.: 400 Jahre Gesichtsprothetik – Eine historische Übersicht zur Entwicklung der Epithesen. In: SCHWIPPER V., TILKORN H. (Hrsg.): *Fortschritte in der kraniofazialen chirurgischen Prothetik und Epithetik*. Einhorn-Press Verlag, 23-36 (1997)
60. RIEPE G., LOOS J., IMIG H., SCHRÖDER A.: Long-term in vivo alterations of Polyester vascular grafts in humans. *Eur. J. Vase. Endovase. Surg.* 13, 540-8 (1997)
61. ROCHOW E.G.: *Silicium und Silicone*. Springer Verlag Heidelberg (1991)
62. RUPP M.E., ARCHER G.L.: Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* 19, 231-45 (1994)
63. SANTERRE J.P., LABOW R.S., ADAMS G.: Enzyme-biomaterial interactions: effect of biosystems on degradation of polyurethanes. *J. biomed. Mater. Res.* 27, 97-109 (1993)
64. SCHEIBNER G et al.: The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative. *J. Biolumin Chemilumin.* Apr.-Jun., 5(2):71-7 (1990)
65. SCHIERHOLZ J., RUMP A.: *Katheter-Materialien: Schwierige Suche nach neuen Werkstoffen*. Dt. Ärztebl. Sonderdruck, Köln (1998)
66. SCHMIDT D.D., BANDYK D.F., PEQUET A.J., MALANGONI M.A. et al.: Mucin production by *Staphylococcus epidermidis*: a virulence factor promoting adherence to vascular grafts. *Archs Surg.* 121, 89-95 (1986)
67. SCHUMPELICK V., ARLT G., SCHLACHETZKI A., KOLSTERHALFEN B.: Chronischer Leistenschmerz nach transperitonealer Netzimplantation (TAPP). *Chirurg* 68, 1297-300 (1997)

-
68. SIEGEL R.: Verfahren zur kovalenten Modifizierung von chemisch definierten, in flüssiger Phase vorliegenden, funktionelle Gruppen enthaltenden Verbindungen, Patentschrift Aktenzeichen 19732774.5, Offenlegungsschrift DE 19732774A1 (1999)
69. SPIJKER H.T., BOS R., VAN OEVEREN W., DE VRIES J., BUSSCHER H.J.: Protein adsorption on gradient surfaces on polyethylene prepared in a shielded gas plasma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15, 89-97 (1999).
70. TANG L., EATON J.W.: Inflammatory responses to biomaterials. *Am. J. clin. Path.* 103, 466-71 (1995)
71. TOJO M., YAMASHITA N., GOLDMANN D.A., PIER G.B.: Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. infect. Dis.* 157, 713-22 (1988)
72. VAUDAUX P., PITTET D., HAEBERLI A., HUGGLER E. et al.: Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. infect. Dis.* 160, 865-75 (1989)
73. WILLIAMS D.F.: Consensus and definitions in biomaterials. In: DE PUTTER D., DE LANGE K., DE GROOT K. (Hrsg.): *Advances in biomaterials*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 11-6 (1988)
74. WILSON, M.: Susceptibility of Oral Bacterial Biofilms to Antimicrobiological Agents. *J. med. Microbiol.* 44, 79-87 (1996)
75. YOUNGER J.J., CHRISTENSEN G.D., BARTLEY D.L., SIMMONS J.C.H. et al.: Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J. infect. Dis.* 156, 548-54 (1987)
76. ZIEBUHR W., HEILMANN C., GÖTZ F., MEYER P. et al.: Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65, 890-6 (1997)

7 Anhang

7.1 Materialliste

Geräte

Abzug		Gebäudeinstallation	
Autoklav	Cliniklav 25	Melag	Berlin
Autoklaventüten- Einschweißgerät	Hygropac	Dürr AG	Bietigheim- Bissingen
Cleanbench	LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments	Hanau
Digitalkamera und Visualisierung für Axiolab	LC 100	Intas Imaging Instruments	Göttingen
Elektronische Waage	PT 600	Sartorius AG	Göttingen
Fluoreszenzmessgerät	SPECTRAFluor Plus	Tecan	CH- Maennedorf
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiolab	Carl Zeiss GmbH	Jena
Gläser	Bechergläser und Erlmeyerkolben	Schott Glas	Mainz
Goldbedampfungsgerät	K 550	Emitech	GB-Ashford
Kritisch Punkt Trocknungsgerät	CPD 030	Bal-Tec AG	Liechtenstein
Locheisen	Durchmesser 14mm	Karl Fischer GmbH	Pforzheim
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus BB 6060	Heraeus Holging GmbH	Hanau
Motor-Pipette	Accu-Jet	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW	Wielheim

Pipetten	Research 1000 & Research 200	Eppendorf AG	Hamburg
Polymerisationsgerät	Polymax-1	Dreve-Dentamid GmbH	Unna
Rasterelektronenmikroskop	DSM 940	Carl Zeiss GmbH	Jena
Schüttler	Novotron	Infors AG	CH- Bottmingen
Ultraschallgerät	Sonorex RK 102 H	Bandelin	Berlin
Vortex-Gerät	Vortex-Genie® 2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien

Autoklaventüten	Hygrofol 7,5 x 30cm	Dürr AG	Bietigheim- Bissingen
Eppendorf-Caps	Epi-Caps	Eppendorf AG	Hamburg
Hartgips	Hinrizit weiß EN ISO 6873 – Typ 3	Ernst Hinrichs GmbH	Gosslar
Isolierung Gips gegen Gips	Supersep	Kerr Italia SpA	I-Scafati
Isolierung Gips gegen Kunststoff	Iso K	Candulor	CH-Wangen
Kunststoff-Petrischalen		Greiner-Bio One GmbH	Fricken- hausen
Leitlack für die Rasterelektronenmikroskopie	Leit-C	Plano	Marburg
Pipettenspitzen	Research 1000 & Research 200	Eppendorf AG	Hamburg

Tiefziehfolie	Erkodur 3mm	Erkodent GmbH Pfalzgrafen- weiler
Zellkulturplatten	24-Well	Greiner-Bio One Fricken- GmbH hausen

Chemikalien

Ampicillin	Serva GmbH	Heidelberg
Aqua destillata	Eigenproduktion	
D(+)-Glucose	Merck KG	Darmstadt
Formaldehyd (3,7%)	Merck KG	Darmstadt
Hefeextrakt	Life Technologies	Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Merck KG	Darmstadt
NaCl	Merck KG	Darmstadt
NaOH	Merck KG	Darmstadt
Pepton aus Casein	Sigma-Aldrich GmbH	München
Pepton aus Sojamehl	Sigma-Aldrich GmbH	München
Pepton Nr. 140	Sigma-Aldrich GmbH	München
SYBR® Green I	MoBiTec GmbH	Göttingen

Zusammensetzung von Tryptone Soya Broth (TSB) Medium:

17,0% (w/v)	Pepton aus Casein
3,0% (w/v)	Pepton aus Sojamehl
2,5% (w/v)	D(+)-Glucose
5,0% (w/v)	NaCl
2,5% (w/v)	K ₂ HPO ₄
1000,0ml	Aqua destillata

Kalibrieren des pH-Werts auf 7,3 mit HCl

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zusammensetzung von LB-Medium:

0,5% (w/v)	Hefeextrakt
1,0% (w/v)	Pepton Nr. 140
1,0% (w/v)	NaCl
1000,0ml	Aqua destillata

Kalibrieren des pH-Werts auf 7,0 mit NaOH

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zusammensetzung von PBS-Puffer:

8,0g	NaCl
0,2g	KH ₂ PO ₄
1,44g	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
0,2g	KCl
1000,0ml	Aqua destillata

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zusammensetzung von Tris-Puffer [2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol]:

8,0g	NaCl
0,2g	KH ₂ PO ₄
2,8g	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
0,2g	KCl
1000,0ml	Aqua destillata

Kalibrieren des pH-Werts auf 7,9 mit HCl

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zusammensetzung von TS-Agar:

5,0g	Tryptone
3,0g	Rinderextrakt
1,0g	D(+)-Glucose
5,0g	Sucrose
15,0g	Agar
1000,0ml	Aqua destillata

Anpassen des pH-Werts auf 7,0

Herstellung von LB-Agarplatten (in sterile Petrischalen gegossen):

12,0 g/l Agar (w/v) in LB-Medium

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zugabe von Ampicillin bei 50°C

Silikone

Episil-E	(Firma Dreve-Dentamid GmbH, Chargen-Nr.: 910149)
Obturasil 40	(Firma Dreve-Dentamid GmbH, Chargen-Nr.: 100856)
Odontosil 40	(Firma Dreve-Dentamid GmbH, Chargen-Nr.: 904092)
VS-D-151/1*)	(Firma Dreve-Dentamid GmbH, Chargen-Nr.: 03146)
Elastosil RT625A	(Firma Wacker-Chemie GmbH, Chargen-Nr.: SR 53345)

*) Das Silikon VS-D-151/1 ist ein eigens für diese Untersuchung hergestelltes Versuchssilikon, welches nach Herstellerangaben silikonölfrei ist.

Bakterien

Staphylococcus epidermidis, Stamm RP 62 A, Biofilm bildend, grampositiv

Klebsiella pneumonia, Stamm 3091, gramnegativ

Unpathogene Neisserien, Patientenstamm, gramnegativ

Escherichia coli, Stamm HB 101, gramnegativ

Streptococcus salivarius, Stamm 259, grampositiv

Alle Bakterien wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – DSMZ (Braunschweig) erworben.

7.2 Tabellen

In jeder Tabelle sind die Messwerte beschichteter und unbeschichteter Probekörper gegenübergestellt. Im folgenden sind die vom Fluoreszenzmessgerät SpecraFluor Plus ermittelten Rohdaten dargestellt und graphisch mit Microsoft® Excel aufbereitet. Die Zahlenwerte der Rohdaten entsprechen nicht den absoluten Bakterienanzahlen, sondern sind einheitslose Werte. Aus den Rohdaten ist jeweils die Differenz der verglichenen Werte ermittelt worden. Aus diesen Daten wurden dann der Mittelwert, die Standardabweichung und die Signifikanz errechnet. Im Balkendiagramm sind Mittelwerte und Standardabweichung noch einmal veranschaulicht.

Staphylococcus epidermidis, Stamm RP 62 A

besiedelt & gefärbt	12695	14689	16422	14589				
gefärbt	8494	9324	12179	10202	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	4201	5365	4243	4387	=	18196	4549	549,80 4,80E-04

besiedelt & gefärbt	10505	11829	11097	11714				
gefärbt	5302	5645	5795	5614	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	5203	6184	5302	6100	=	22789	5697,25	516,28 2,04E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 20,15%

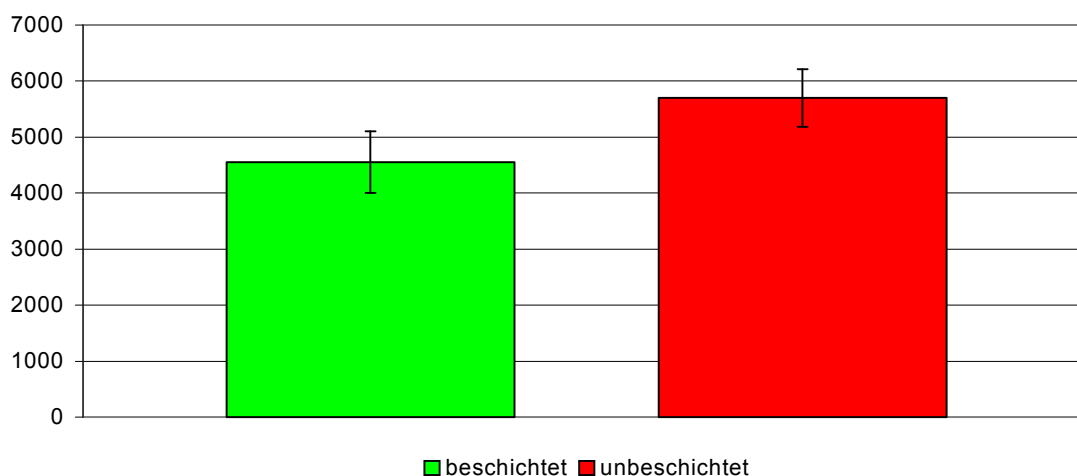


Tabelle 1: Episil-E

besiedelt & gefärbt	17722	18244	17881	19343				
gefärbt	14743	15499	15060	16835	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	2979	2745	2821	2508	=	11053	2763,25	196,10 9,81E-05

besiedelt & gefärbt	14388	16278	16154	15955				
gefärbt	9638	11896	11830	11831	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	4750	4382	4324	4124	=	17580	4395	261,20 5,77E-05

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 37,13%

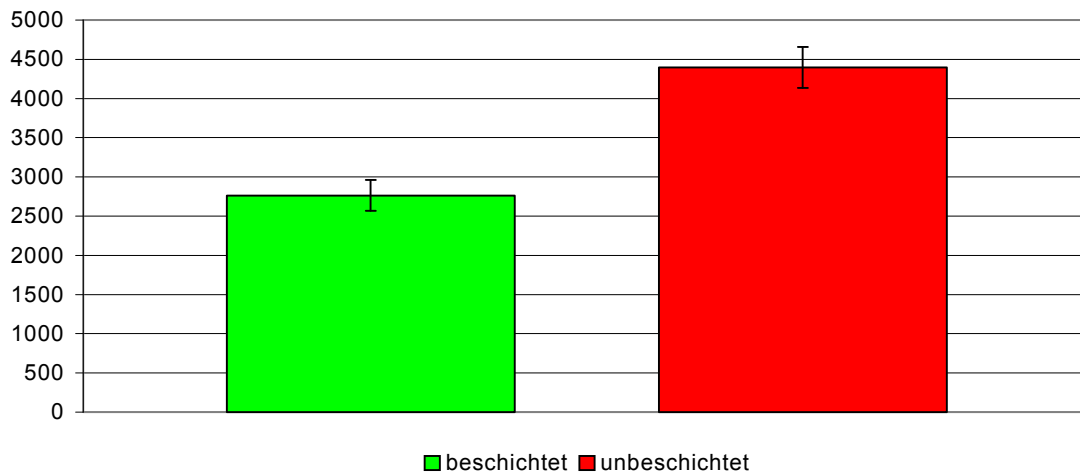


Tabelle 2: Obturasil 40

besiedelt & gefärbt	9610	10065	9022	10325				
gefärbt	8751	9119	8340	9410	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	859	946	682	915	=	3402	850,5	117,96 7,23E-04

besiedelt & gefärbt	8723	9804	8625	8515				
gefärbt	7598	8330	7201	7210	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1125	1474	1424	1305	=	5328	1332	155,14 4,30E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 36,15%

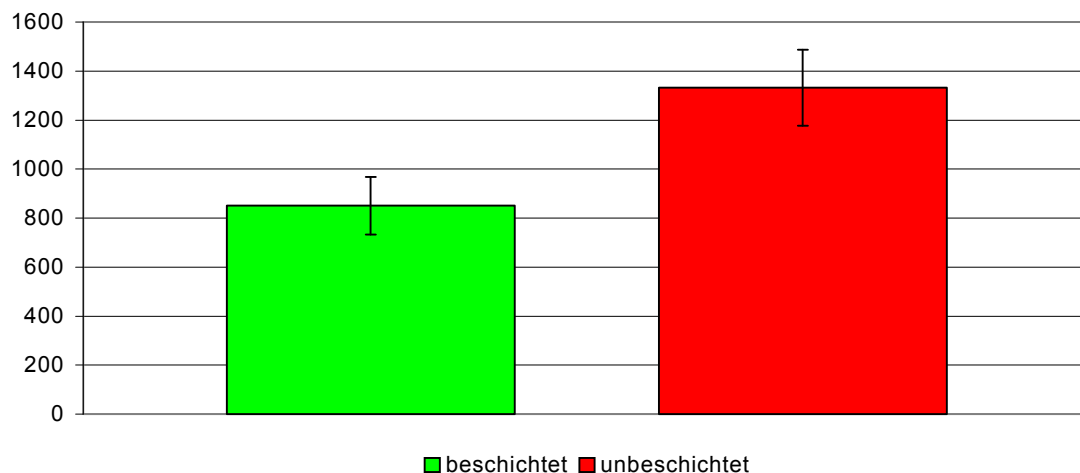


Tabelle 3: Odontosil 40

besiedelt & gefärbt	7030	7531	7395	7870				
gefärbt	6640	6832	6382	6197	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	390	699	1013	1673	=	3775	943,75	548,68 9,61E-02

besiedelt & gefärbt	6213	7112	6901	6845				
gefärbt	3968	5808	4952	4961	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	2245	1304	1949	1884	=	7382	1845,5	393,71 8,39E-02

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 48,86%

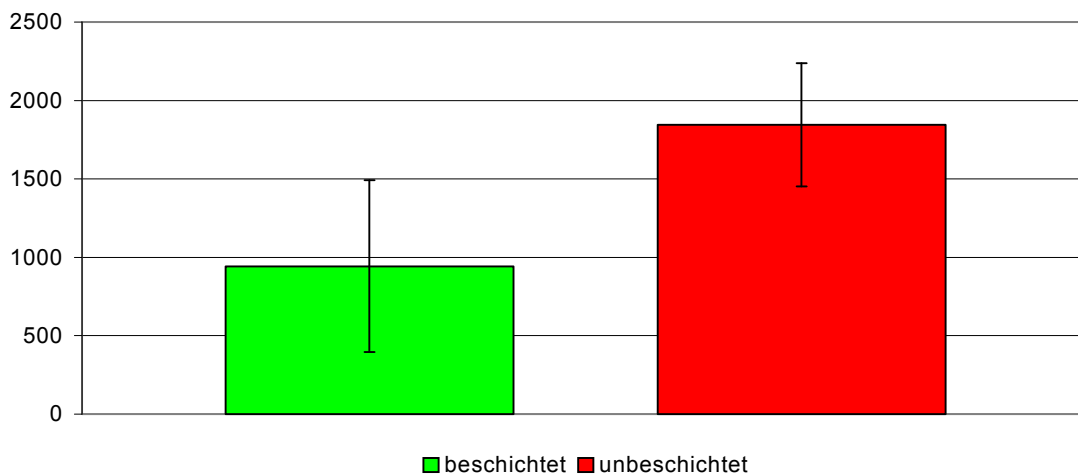


Tabelle 4: VS-D-151/1

besiedelt & gefärbt	11028	12551	10863	11965				
gefärbt	10254	11652	10028	10653	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	774	899	835	1312	=	3820	955	243,41 4,31E-03

besiedelt & gefärbt	7804	7413	8058	6845				
gefärbt	6458	6031	6626	5933	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1346	1382	1432	912	=	5072	1268	239,94 1,81E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 24,68%

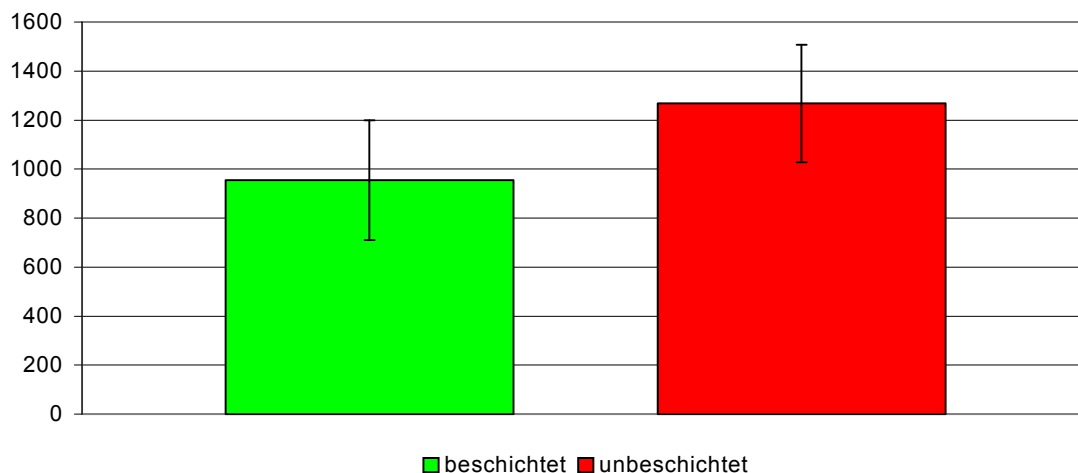


Tabelle 5: Elastosil RT 625 A

Klebsiella pneumoniae, Stamm 3091

besiedelt & gefärbt	10056	9389	10577	10084				
gefärbt	5148	5180	5055	5750	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	4908	4209	5522	4334	=	18973	4743,25	601,80 5,55E-04

besiedelt & gefärbt	13133	12270	12827	12197				
gefärbt	4643	4082	5325	4671	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	8490	8188	7502	7526	=	31706	7926,5	492,11 6,57E-05

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 40,16%

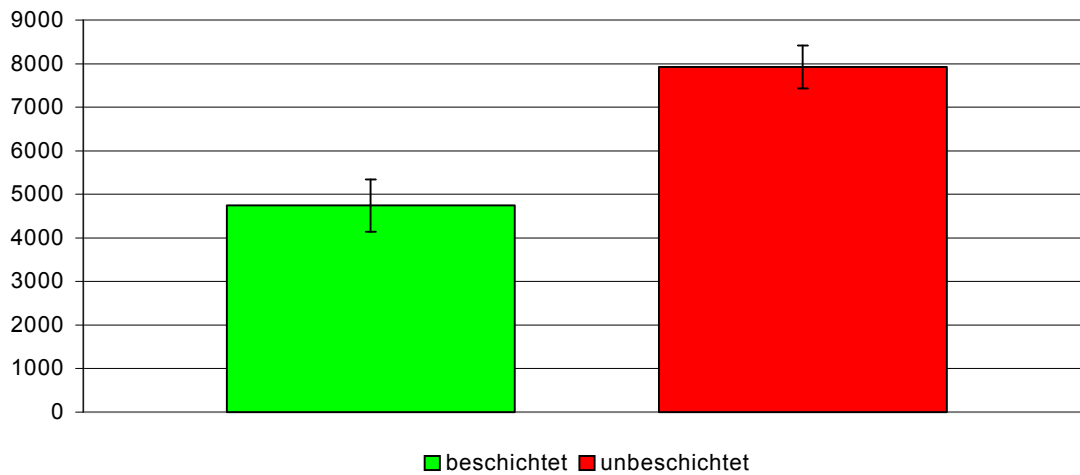


Tabelle 6: Episil-E

besiedelt & gefärbt	7116	6852	6828	6688				
gefärbt	5976	5948	5351	5388	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1140	904	1477	1300	=	4821	1205,25	243,47 2,19E-03

besiedelt & gefärbt	10859	10560	10525	11503				
gefärbt	9380	8892	8639	9092	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1479	1668	1886	2411	=	7444	1861	402,62 2,68E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 35,24%

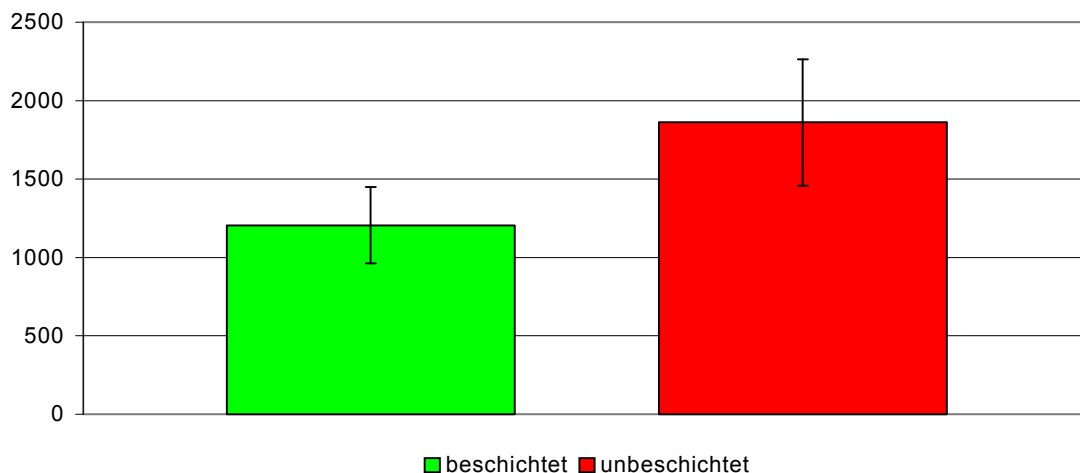


Tabelle 7: Obturasil 40

besiedelt & gefärbt	7026	7953	6954	7166				
gefärbt	6234	6128	5351	5983	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	792	1825	1603	1183	=	5403	1350,75	457,85 9,72E-03

besiedelt & gefärbt	8859	7351	8668	9563				
gefärbt	6684	5987	6357	7162	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	2175	1364	2311	2401	=	8251	2062,75	475,01 3,21E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 34,52%

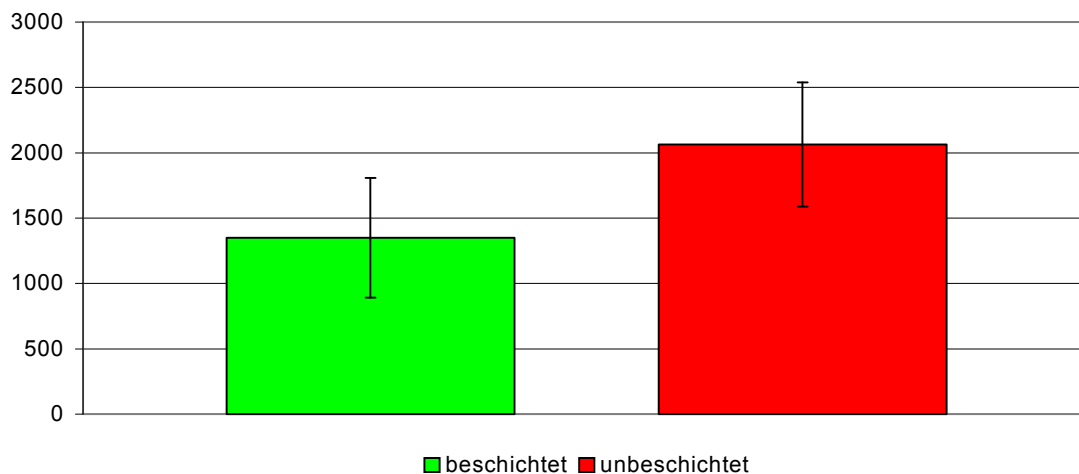


Tabelle 8: Odontosil 40

besiedelt & gefärbt	11698	11983	11898	12005				
gefärbt	10568	11324	10864	11183	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1130	659	1034	822	=	3645	911,25	211,75 3,30E-03

besiedelt & gefärbt	11330	11258	11001	10685				
gefärbt	7985	8544	8236	7876	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	3345	2714	2765	2809	=	11633	2908,25	293,74 2,81E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 68,67%

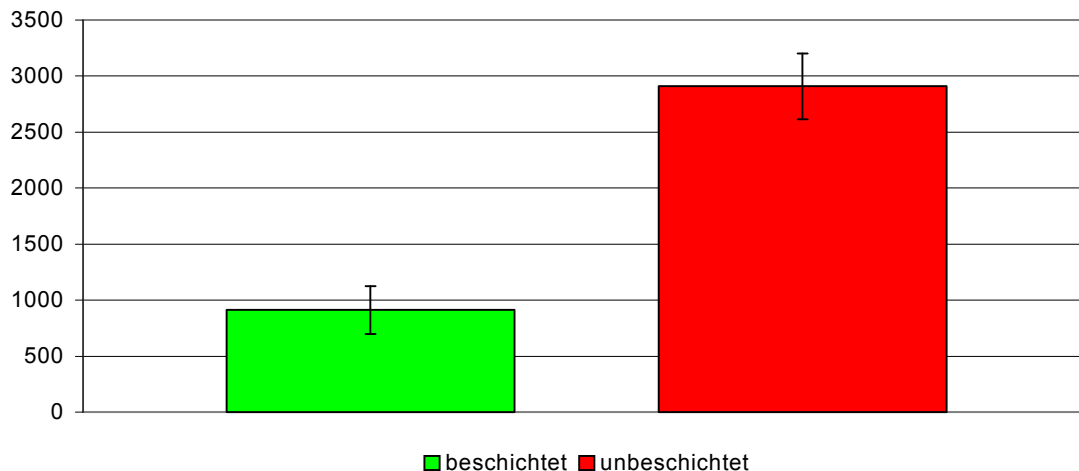


Tabelle 9: VS-D-151/1

besiedelt & gefärbt	10977	10566	11715	11292					
gefärbt	9855	9087	10002	9564	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1122	1479	1713	1728	=	6042	1510,5	282,98	1,76E-03
besiedelt & gefärbt	7885	8204	8821	8154					
gefärbt	5934	6681	6581	6114	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1951	1523	2240	2040	=	7754	1938,5	302,21	1,02E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 22,08%

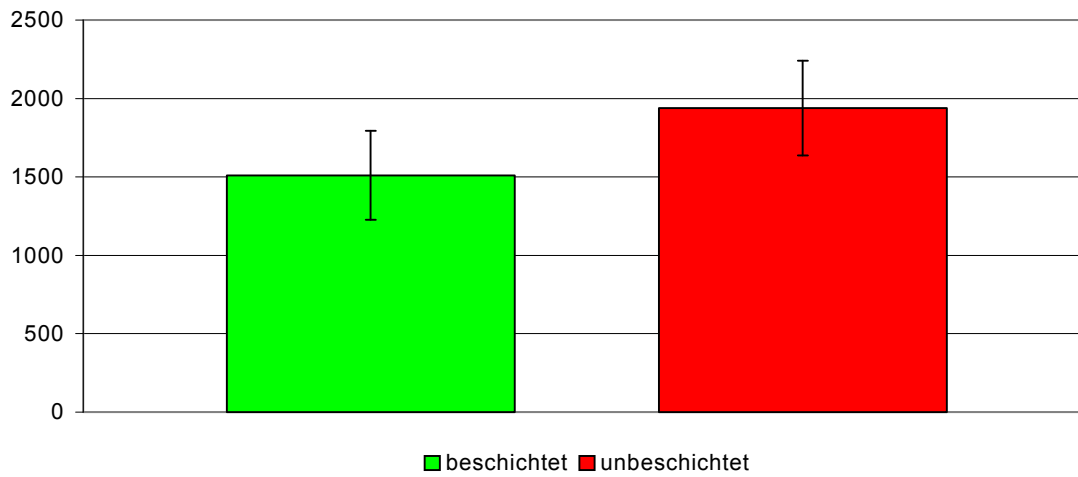


Tabelle 10: Elastosil RT 625 A

Unpathogene Neisserien, Patientenstamm

besiedelt & gefärbt	11456	11501	10984	12017				
gefärbt	10120	9853	9985	10850	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1336	1648	999	1167	=	5150	1287,5	276,93 2,63E-03

besiedelt & gefärbt	9240	10251	9645	9655				
gefärbt	6243	7231	6820	6984	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	2997	3020	2825	2671	=	11513	2878,25	163,28 5,02E-05

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 55,27%

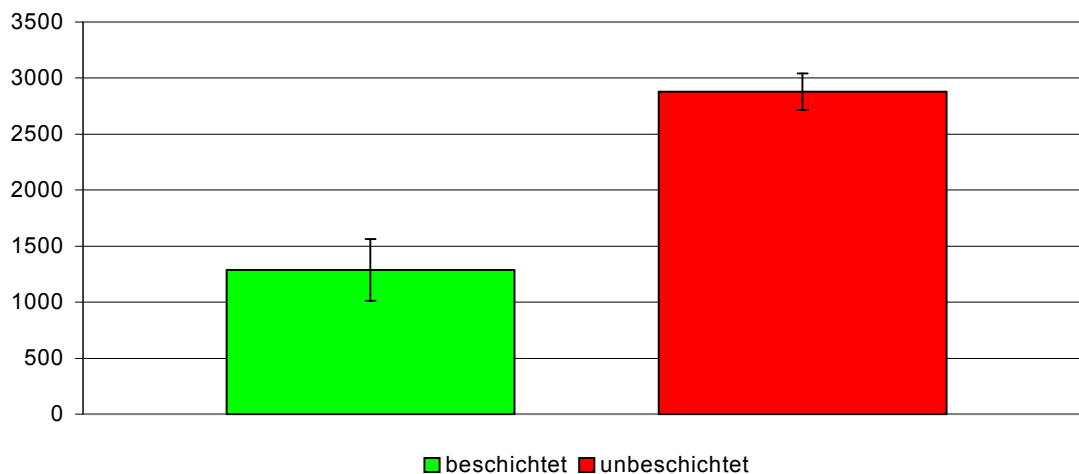


Tabelle 11: Episil-E

besiedelt & gefärbt	10682	12046	12107	10446				
gefärbt	9507	10807	11180	9418	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1175	1239	927	1028	=	4369	1092,25	141,21 5,87E-04

besiedelt & gefärbt	7038	7855	6134	7397				
gefärbt	5089	5783	4506	5638	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1949	2072	1628	1759	=	7408	1852	197,18 3,29E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 41,02%

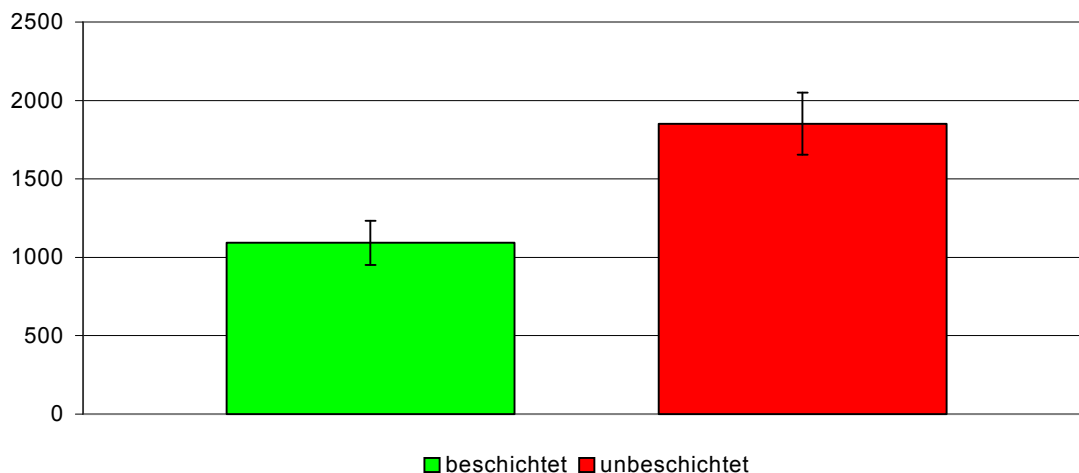


Tabelle 12: Obturasil 40

besiedelt & gefärbt	10865	11004	11953	10756				
gefärbt	10264	10360	10777	9869	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	601	644	1176	887	=	3308	827	264,55 8,26E-03

besiedelt & gefärbt	7708	6715	6947	7061				
gefärbt	5805	5040	5313	5460	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1903	1675	1634	1601	=	6813	1703,25	136,56 1,41E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 51,45%

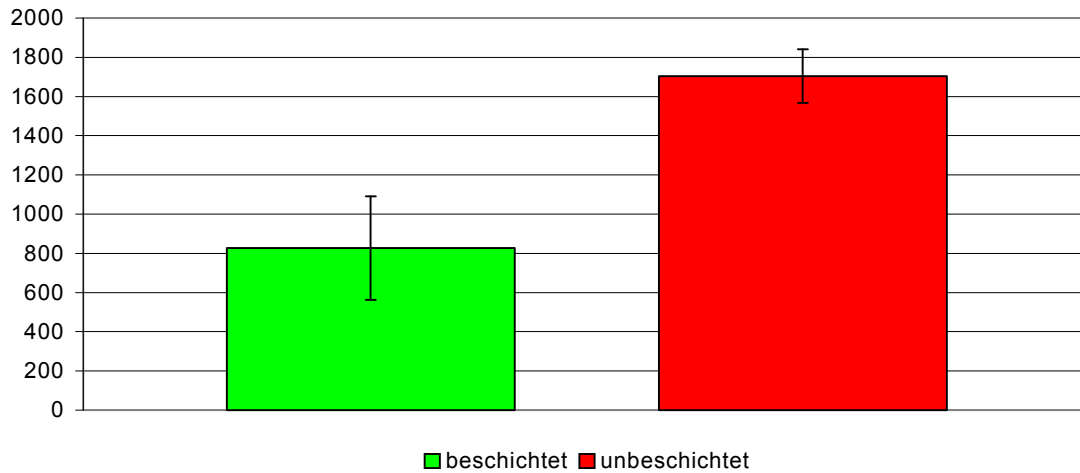


Tabelle 13: Odontosil 40

besiedelt & gefärbt	12098	11983	10398	12005				
gefärbt	11550	10995	9357	11231	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	548	988	1041	774	=	3351	837,75	225,02 5,01E-03

besiedelt & gefärbt	8530	7934	8842	8472				
gefärbt	6998	6217	7362	7101	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1532	1717	1480	1371	=	6100	1525	144,52 2,33E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 45,07%

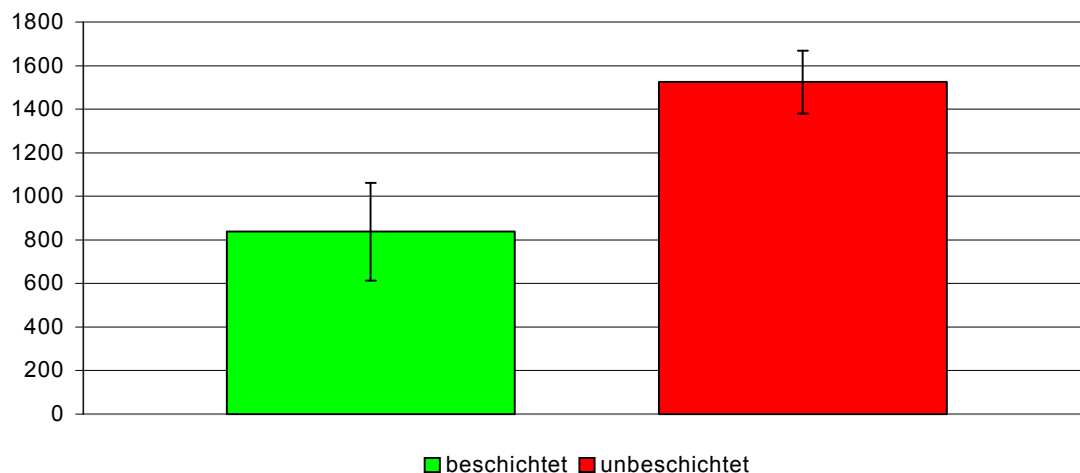


Tabelle 14: VS-D-151/1

besiedelt & gefärbt	13006	11987	12010	11338				
gefärbt	12034	11508	11766	10858	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	972	479	244	480	=	2175	543,75	306,32 3,81E-02
besiedelt & gefärbt	9670	10311	10283	10105				
gefärbt	8977	10034	9500	9122	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	693	277	783	983	=	2736	684	297,17 1,93E-02

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 20,50%

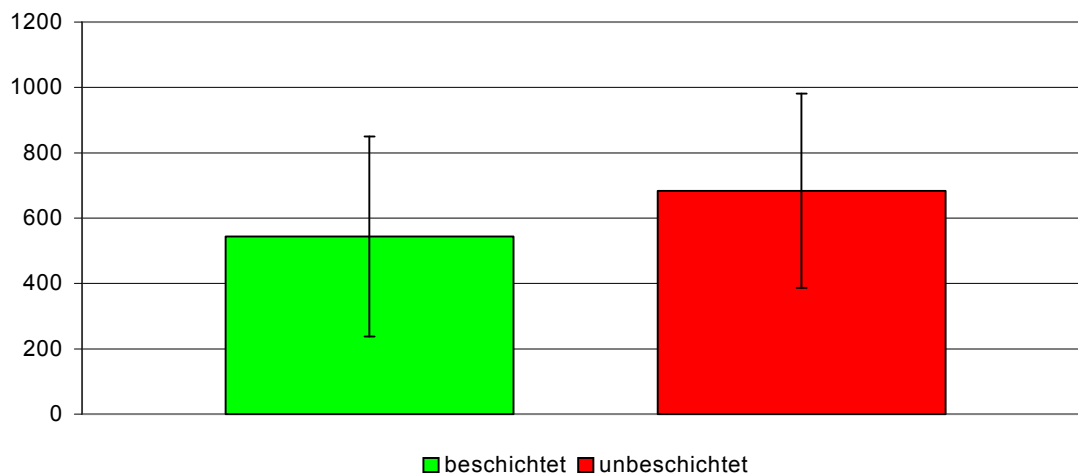


Tabelle 15: Elastosil RT 625 A

Escherichia coli, Stamm HB 101

besiedelt & gefärbt	8954	9687	9933	9578				
gefärbt	7856	6824	6994	7362	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1098	2863	2939	2216	=	9116	2279	851,54 1,28E-02

besiedelt & gefärbt	9365	9854	8977	9031				
gefärbt	5161	5002	4862	4935	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	4204	4852	4115	4096	=	17267	4316,75	359,93 1,59E-04

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 47,21%

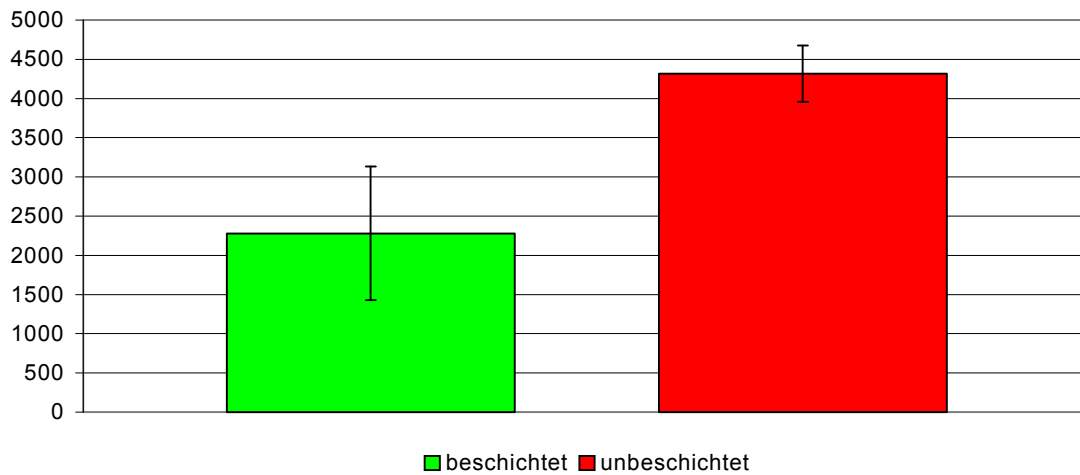


Tabelle 16: Episil-E

besiedelt & gefärbt	4955	4482	4972	4568				
gefärbt	3625	3248	3982	3446	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1330	1234	990	1122	=	4676	1169	146,51 5,35E-04

besiedelt & gefärbt	11254	10041	11039	10543				
gefärbt	9687	9014	8835	9283	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1567	1027	2204	1260	=	6058	1514,5	510,10 9,55E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 22,81%

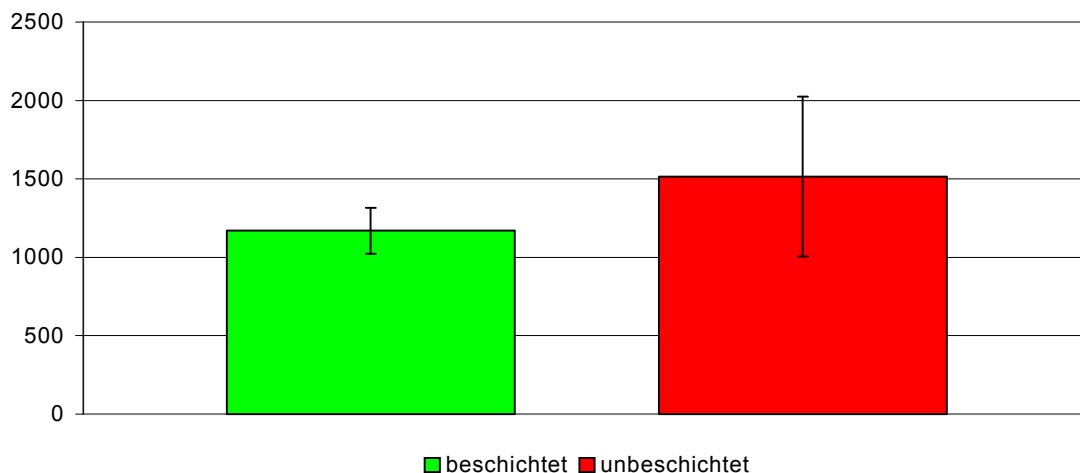


Tabelle 17: Obturasil 40

besiedelt & gefärbt	4862	4551	5084	4664				
gefärbt	3297	3846	3644	3499	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1565	705	1440	1165	=	4875	1218,75	381,08 7,74E-03

besiedelt & gefärbt	5719	5833	6157	5994				
gefärbt	4127	4863	3955	4003	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1592	970	2202	1991	=	6755	1688,75	541,83 8,33E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 27,83%

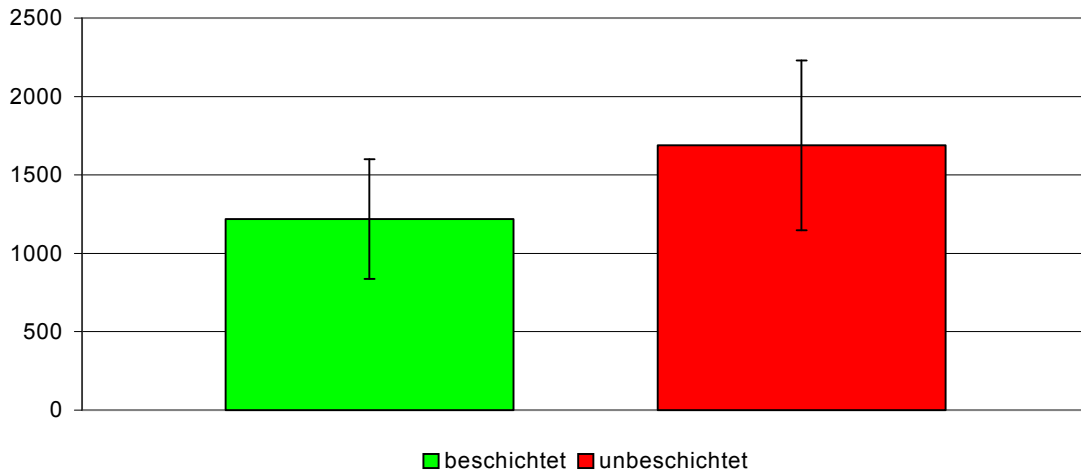


Tabelle 18: Odontosil 40

besiedelt & gefärbt	11600	11672	11551	12094				
gefärbt	10038	10694	9309	11372	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1562	978	2242	722	=	5504	1376	675,94 2,67E-02

besiedelt & gefärbt	12696	12269	11080	12348				
gefärbt	10841	10313	9530	10066	Summe	Mittelwert	Standard- abweichung	Signifikanz (p < 0,05)
Differenz	1855	1956	1550	2282	=	7643	1910,75	301,73 1,06E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 27,99%

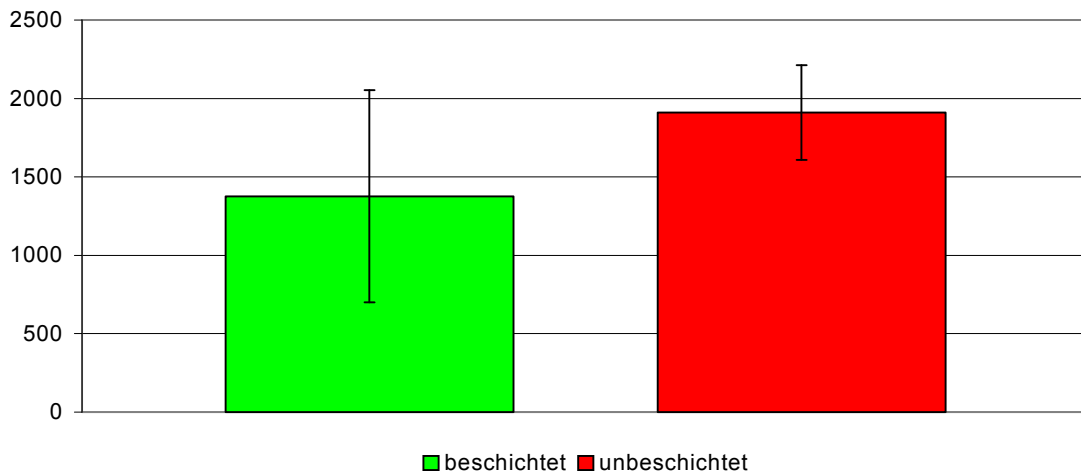


Tabelle 19: VS-D-151/1

besiedelt & gefärbt	6132	5847	5903	5571					
gefärbt	4600	5137	5001	4835	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1532	710	902	736	=	3880	970	384,20	1,50E-02
							abweichung	(p < 0,05)	
besiedelt & gefärbt	6297	6814	6750	6240					
gefärbt	5134	5270	5618	5342	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1163	1544	1132	898	=	4737	1184,25	267,42	3,03E-03
							abweichung	(p < 0,05)	

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 18,09%

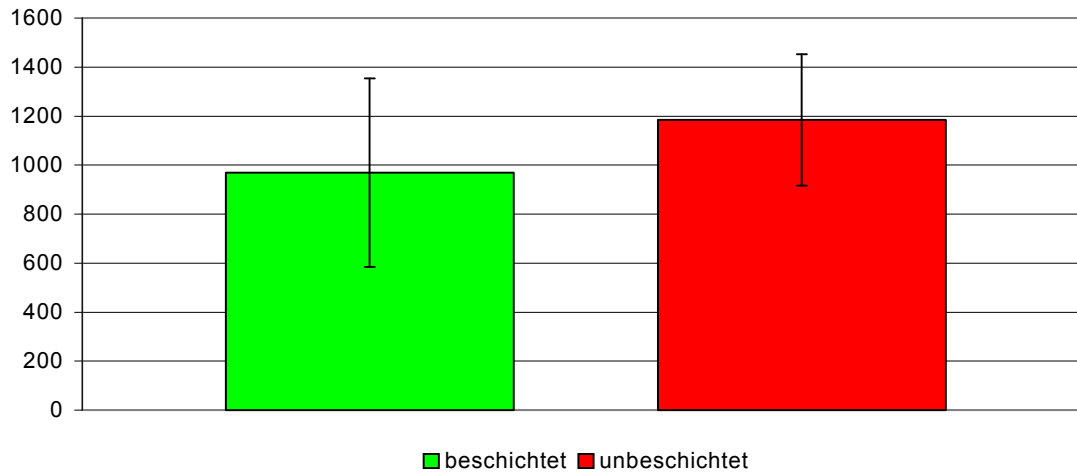


Tabelle 20: Elastosil RT 625 A

Streptococcus salivarius, Stamm 259

besiedelt & gefärbt	9831	9672	9584	9338					
gefärbt	6230	6074	5839	6008	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	3601	3598	3745	3330	=	14274	3568,5	173,17	3,14E-05

besiedelt & gefärbt	12364	13720	12837	12208					
gefärbt	8082	8146	8553	8301	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	4282	5574	4284	3907	=	18047	4511,75	730,01	1,14E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 20,91%

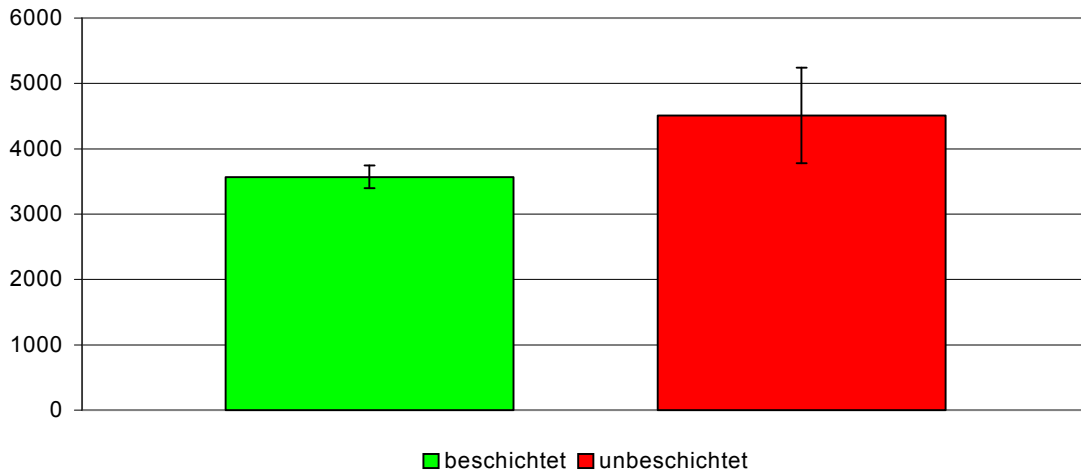


Tabelle 21: Episil-E

besiedelt & gefärbt	7112	7061	6828	7295					
gefärbt	6060	6409	6297	5899	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1052	652	531	1396	=	3631	907,75	394,35	1,93E-02

besiedelt & gefärbt	10308	9837	10094	10138					
gefärbt	8507	8673	9304	9055	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz	
Differenz	1801	1164	790	1083	=	4838	1209,5	425,80	1,08E-02

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 24,95%

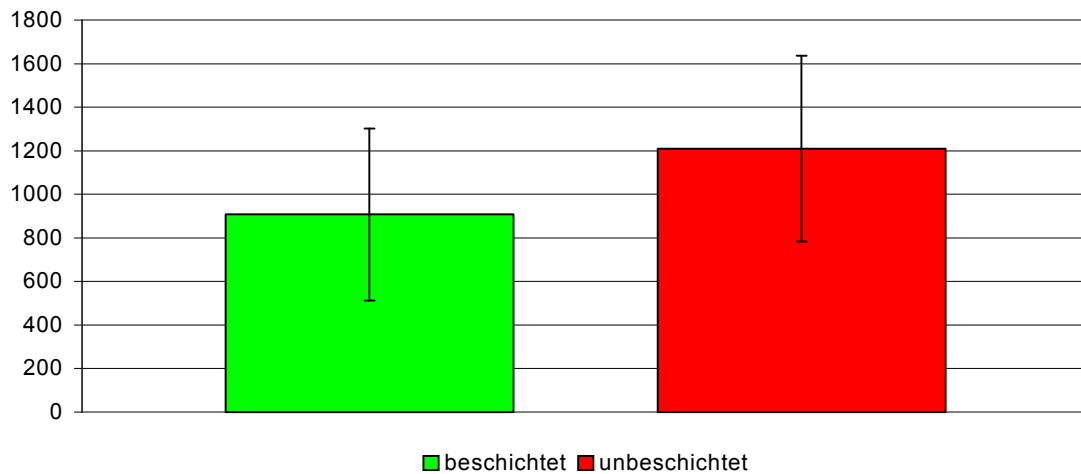


Tabelle 22: Obturasil 40

besiedelt & gefärbt	6952	7161	7380	6094				
gefärbt	5693	5900	5632	5299	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1259	1261	1748	795	=	5063	1265,75	389,12 7,38E-03
besiedelt & gefärbt	7234	8001	7558	7594				
gefärbt	5866	5349	6112	6008	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1368	2652	1446	1586	=	7052	1763	599,49 9,81E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 28,20%

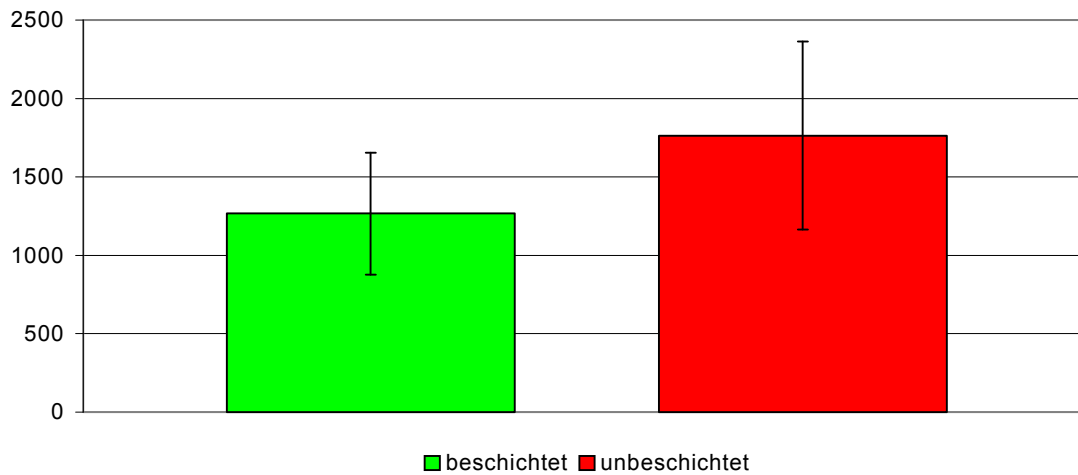


Tabelle 23: Odontosil 40

besiedelt & gefärbt	11325	12081	12006	11384				
gefärbt	9355	9920	10101	9575	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	1970	2161	1905	1809	=	7845	1961,25	148,68 1,19E-04
besiedelt & gefärbt	13035	12064	11437	12099				
gefärbt	8991	9047	9438	9342	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	4044	3017	1999	2757	=	11817	2954,25	845,16 6,01E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 33,61%

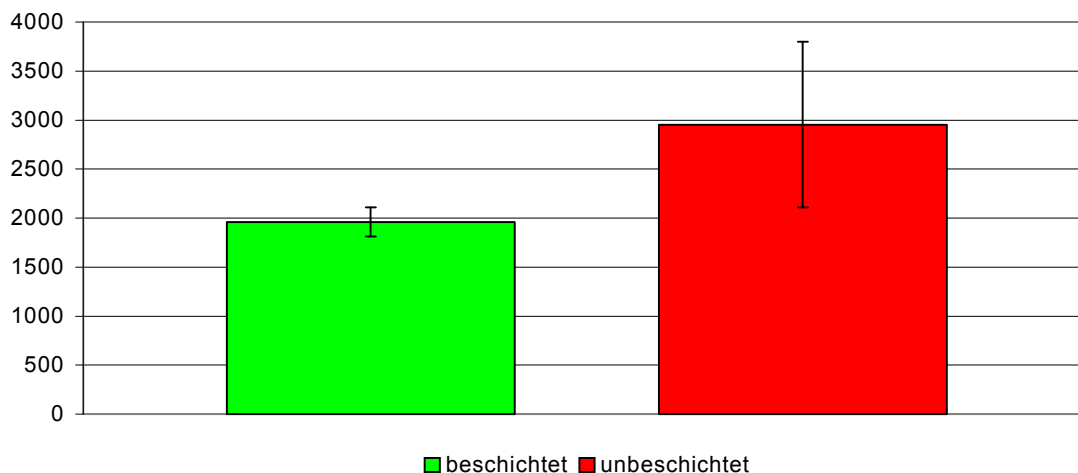


Tabelle 24: VS-D-151/1

besiedelt & gefärbt	6665	5847	6201	6344				
gefärbt	3482	4016	3870	3922	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	3183	1831	2331	2422	=	9767	2441,75	558,31 3,15E-03
besiedelt & gefärbt	7055	6204	6821	6893				
gefärbt	3535	3948	4106	4093	Summe	Mittelwert	Standard-	Signifikanz
Differenz	3520	2256	2715	2800	=	11291	2822,75	522,65 1,70E-03

Verringerte bakterielle Adhäsion der beschichteten Probekörper: 13,50%

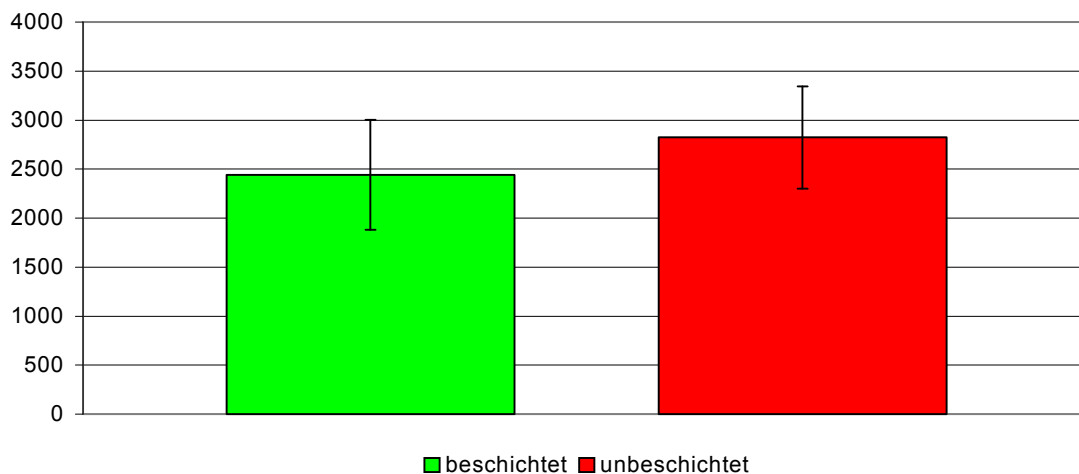


Tabelle 25: Elastosil RT 625 A

Curriculum Vitae

Name: Alexander Florian
Vorname: Kutz
Geburtsdatum: 06. Juli 1972
Geburtsort: Bad Pyrmont

Schulische Ausbildung

1979 – 1980 Volksschule Putzbrunn
1980 – 1982 Konrad-Adenauer-Schule Heppenheim
1982 – 1984 Starkenburg-Gymnasium Heppenheim
1984 – 1993 Martin-Behaim-Gymnasium Nürnberg
1993 Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

09/1993 – 02/1997 Ausbildung zum Zahntechniker
05/1997 – 02/2002 Studium der Zahnheilkunde an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
02/2002 – 06/2002 Studienabschluss: Staatsexamen
06/2002 Approbation zum Zahnarzt

Würzburg, November 2004



Danksagung

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Alfred Renk für die Überlassung der Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen und Herrn Prof. Dr.–Ing. R. Thull für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. G. Menig bedanken, ohne ihre Ideen, ihr Wissen und ihre tatkräftige Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ausdrücklich möchte ich mich beim Institut für Anaplastologie – Herrn N. Schilling und seinem Team für die Unterstützung bedanken.

Ferner gilt mein Dank der Firma Dreve-Dentamid GmbH für die umfangreichen Materialspenden, namentlich möchte ich mich bei Herrn M. Thaden bedanken.

Herzlichen Dank an die Firma bionic surfaces – Herrn Dr. R. Siegel für die Beschichtung der Probekörper.

Vielen Dank an FORBIOMAT II für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Zudem gilt mein Dank auch der Firma GfE Metalle und Materialien GmbH, die viel Mühe und Zeit investiert hat, eine metallische Beschichtung auf die Probekörper aufzubringen.