

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Meffert

**In vivo Untersuchungen zur Biokompatibilität von Silikonimplantaten nach
Beschichtung mit rekombinanter Spinnenseide**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Philipp Steffen van Gelder
aus Würzburg

Würzburg, März 2017



Referent: Prof. Dr. med. R. Jakubietz
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Blunk
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2018

Der Promovend ist Arzt

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs. Alk.	absoluter Alkohol
aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CTGF	connective tissue growth factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FBGC	foreign body giant cell (Fremdkörperriesenzelle)
FGF	fibroblastic growth factor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
KG	Kontrollgruppe
LT	Leukotrien
min.	Minute/n
MMP	Matrix-Metalloprotease
PC	Phosphorylcholin
PU	Polyurethan
P4HB	Prolyl-4-Hydroxylase- β (Marker für Fibroblasten)
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SG	Spinnenseidengruppe
smad-Proteine	<u>s</u> mall body size <u>m</u> others <u>a</u> gainst <u>d</u> ecapentaplegic- Protein (intrazelluläre, an der TGF- β -Signaltransduktion beteiligte Proteine)
SLM	Synovia like Metaplasie
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor - β
TNF- α	tumor necrosis factor - α
PDGF	platelet derived growth factor
PF	platelet factor
μ m	Mikrometer

Meinem Großvater Dr. med. Gerd van Gelder

* 18.10.1934

†24.11.2012

1. EINLEITUNG	1
1.1 SILIKON ALS BIOMATERIAL	1
1.2 KAPSELKONTRAKTUR.....	1
1.2.1 <i>Epidemiologie</i>	2
1.2.2 <i>Ätiologie</i>	3
1.2.3 <i>Pathogenese</i>	4
1.2.4 <i>Entzündungsreaktion</i>	5
1.2.5 <i>Die Rolle der Makrophagen</i>	6
1.2.6 <i>TGF-β</i>	7
1.3 KLASSEKATION DER KAPSELKONTRAKTUR.....	8
1.4 EINFLUSS DER IMPLANTATOBERFLÄCHE AUF DIE BIOKOMPATIBILITÄT	9
1.5 REKOMBINANTES SPINNENSEIDEPROTEIN ALS BESCHICHTUNGSMATERIAL.....	11
1.5.1 <i>Spinnen und Netzaufbau</i>	11
1.5.2 <i>Molekularer Aufbau und Assemblierung der Seidenfäden</i>	12
1.5.3 <i>Möglichkeiten zur Herstellung und Verarbeitung von Spinnenseide</i>	14
1.6 UNTERSUCHUNG EINER BESCHICHTUNG MIT REKOMBINANTEM SPINNENSEIDENPROTEIN.....	16
1.7 ZIELSETZUNG.....	16
2.MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 VERSUCHSTIERE UND GENEHMIGUNG.....	18
2.2 IMPLANTATE	18
2.3 BESCHICHTUNG DER IMPLANTATE.....	19
2.4 IMPLANTATION	19
2.5 EXPLANTATION	20
2.6 ANALYSE DER BESCHICHTUNG NACH EXPLANTATION.....	20
2.7 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	21
2.7.1. <i>Anfertigen von Paraffinschnitten</i>	21
2.7.2. <i>Anfertigen von Gefrierschnitten</i>	21
2.7.3. <i>Pufferherstellung</i>	21
2.7.4 <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)</i>	22
2.7.5. <i>Immunhistologie</i>	23
2.8 QUANTITATIVE-REAL-TIME-POLYMERASE-CHAIN-REACTION (qRT-PCR).....	25
2.9 STATISTISCHE METHODEN	27
2.10 VERSUCHSPANUNG	27
3.ERGEBNISSE	28
3.1 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG IN DER HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	29
3.2 FIBROBLASTEN	30

3.3 KOLLAGEN	31
3.4 MAKROPHAGEN	32
3.5 TGF-B-SIGNALWEG.....	34
3.6 LYMPHOZYTEN.....	35
3.7 INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE	38
4. DISKUSSION	39
4.1 DIE KAPSELKONTRAKTUR.....	39
4.2 KLASSIFIKATION UND BEURTEILUNG.....	39
4.3 KAPSELDICKE.....	40
4.4 FIBROSIERUNG	41
4.5 HISTIOZYTEN	42
4.6 LYMPHOZYTEN UND ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN.....	44
4.7 SCHLUSSFOLGERUNG	45
4.8 KRITISCHE BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE	46
4.9 AUSBLICK	47
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. LITERATURVERZEICHNIS:.....	49
DANKSAGUNG	1
LEBENS LAUF	2

1. Einleitung

1.1 Silikon als Biomaterial

In vielen Bereichen der Medizin werden alloplastische Implantate in unterschiedlichen Geweben des Körpers eingesetzt. Entscheidende Voraussetzung für die langfristige Verträglichkeit eines solchen Fremdkörpers ist seine Biokompatibilität. Diese Eigenschaft beschreibt das Ausmaß der Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe. Das körperfremde Material soll nach Möglichkeit über einen langen Zeitraum in seiner Funktion erhalten bleiben, gleichzeitig aber das umliegende Gewebe nicht beschädigen und das physiologische Gleichgewicht weder lokal, noch systemisch beeinflussen. Viele Materialien erfüllen diese Anforderungen nur bedingt. Eine Verbesserung ihrer biologischen Integration würde für die Medizin einen großen Zugewinn darstellen.

Silikone sind Polymere aus Siliziumderivaten mit einem sehr breiten Einsatz in unterschiedlichen medizinischen Disziplinen. Das am meisten verwendete Siloxanpolymer ist das aus $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}_2$ -Einheiten aufgebaute Polydimethylsiloxan (PDMS), welches auch in Brustimplantaten verwendet wird [1]. Silikone besitzen generell eine hohe Biokompatibilität und wurden lange Zeit auch als chemisch und systemisch inert angesehen [2]. Sie sollten demnach keinen Einfluss auf physiologische, chemische oder immunologische Prozesse im menschlichen Körper haben. Auch wenn Silikon sich nicht wie ein Antigen verhält [3, 4], zeigte sich in den vergangenen Jahren dennoch, dass die Implantation anfänglich inert erscheinender Substanzen zu Entzündungs- und Einheilungsprozessen führt [5]. Der Körper erkennt Silikon als Fremdstoff und reagiert mit einer Entzündung und Abkapselung [1]. Ist dieser Abkapselungsprozess gestört, kommt es zu einer überschießenden Fibrosierung. Dies gilt auch für die Kapselkontraktur nach Implantation von Silikonimplantaten.

1.2 Kapselkontraktur

Auf das Einbringen eines Fremdkörpers reagiert der Körper mit einer physiologischen Entzündungsreaktion, bei der das Implantat vom restlichen Körper abgekapselt wird. Diese Kapsel, bestehend aus Entzündungszellen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix (hauptsächlich Kollagen Typ1), ist normalerweise dünn und weich und hat keinen oder kaum Einfluss auf das Erscheinungsbild der Brust. Die pro- und antifibrotischen

Prozesse im periimplantären Gewebe halten sich im Gleichgewicht. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu einer überschießenden Bindegewebsakkumulation und Kontraktion von Myofibroblasten um das Implantat. Dieser, als Kapselkontraktur bezeichnete Prozess, kann zu Missempfindungen, Schmerzen oder Verhärtungen mit sichtbaren Formveränderungen von Implantat oder Mamma führen und ist unter den Langzeitkomplikationen bei Brustimplantaten einer der häufigsten Explantationsgründe [6]. Bei höhergradigen Kontrakturen (Baker III und IV – s. Kap. 1.3) ist eine chirurgische Intervention erforderlich [7]. Diese erfolgt durch Explantation und Kapsulotomie oder Kapsulektomie [7].

1.2.1 Epidemiologie

Aktuell (Daten von 2015) belegt die Brustaugmentation mit weltweit ca. 1,5 Millionen Operationen Platz 1 der am häufigsten durchgeführten plastischen Eingriffe [8]. 2015 wurden alleine in Deutschland 52.991 Brustaugmentationen (davon 46,242 mit Silikonimplantaten) von der International society of aesthetic plastic surgery (ISAPS) verzeichnet [8]. Die Inzidenz der Kapselkontraktur ist nicht eindeutig. Während Henriksen et al. eine Kontrakturnrate von 4,3% (Baker II bis IV) bzw. 1,3% (Baker III und IV) feststellen, kommen andere Autoren auf Kontrakturnraten von bis zu 27% der Implantationen [9-11]. Handel et al. beschreiben in ihrer Langzeitstudie an 1655 Implantaten das Risiko einer Kapselfibrose (Baker III und IV) mit 14% über 15 Jahre [12]. Zum Teil kommen diese Unterschiede auch dadurch zustande, dass die Differenzierung zwischen Baker II und III sehr von der subjektiven Einschätzung des Chirurgen abhängt [13].

Gleichzeitig scheint das Risiko einer Kapselkontraktur nicht linear über die Liegezeit verteilt zu sein, sondern ist in den ersten Monaten bis zu einem Jahr am größten [11, 14, 15]. McGrath und Burkhardt verzeichneten in ihrer 5-Jahres-Statistik 87% der Kontrakturen im ersten, 12% im zweiten und jeweils 4% im dritten und vierten Jahr [16], während Henriks et al. in einem 2-Jahre-Follow-up 93% der Kontrakturen (Baker III und IV) im ersten Jahr verzeichneten [14]. Im weiteren Verlauf steigt das kumulative Risiko der Kapselkontraktur mit der Liegezeit [12].

In ihrer Studie kommen Henriksen et al. zudem zu dem Schluss, dass die Kapselkontraktur (Baker III und IV) mit 16%, gemessen an der Zahl aller zur Reoperation führender Ereignisse, nach der Implantatfehlage den häufigsten Reoperationsgrund darstellt

[11]. Manche Autoren gehen davon aus, dass in etwa die Hälfte aller Reoperationen auf Kapselkontrakturen zurückzuführen sind [12, 17].

1.2.2 Ätiologie

Siggelkow et al. konnten zeigen, dass das Ausmaß der Kapselkontraktur mit der Dicke der Bindegewebskapsel, der Inflammation und der Verweildauer des Implantats zusammenzuhängen scheint [18]. Da Fibrin positiv auf die Fibroblastenaktivität und -proliferation wirkt, stellen postoperative Hämatome oder spätere Traumata ebenfalls Risikofaktoren für eine Kapselkontraktur dar [10]. Hierbei spielen auch das Ausmaß des Operationstraumas und der jeweilige Zugangsweg, sowie die Erfahrung des Chirurgen eine wichtige Rolle. Auch scheint die Implantatlage mit dem Kontrakturrisiko zu korrelieren, welches bei submuskulärer im Vergleich zu subglandulärer Implantation reduziert zu sein scheint [19, 20]. Eine anfangs ebenfalls geringere Kontrakturrate kann bei texturierten im Vergleich zu glatten Implantaten gezeigt werden [21-24]. Dieser Effekt scheint sich bei längerer Liegezeit jedoch zu relativieren. So konnten Handel et al. in ihrer 10-Jahre-follow-up-Studie ein Angleichen des Risikos nach 7 Jahren und insgesamt keinen signifikanten Unterschied beobachten [12]. Fagrell et al. konnten im 7,5-Jahresvergleich ebenfalls keinen Unterschied zwischen texturierten und glatten Implantaten zeigen [25], wogegen Liu et al. in ihrer Meta-Analyse (14 Studien ≤ 3 Jahre, 2 = 5 Jahre und 2 > 5 Jahre) eine geringere Kontrakturrate um texturierte Implantate feststellten [26]. Zudem scheint die Kapselkontraktur bei Rekonstruktionen und Revisionen häufiger aufzutreten als bei kosmetischen Operationen [13, 27]. Ein tendenziell ebenfalls geringeres Risiko scheint bei kochsalzgefüllten gegenüber silikongefüllten Implantaten vorzuliegen [28, 29], was jedoch nicht als gesichert gilt [19]. Hier ist die Studienlage nicht eindeutig. Größere Implantate (>350ml) haben zwar ein erhöhtes Risiko hinsichtlich der Notwendigkeit einer chirurgische Nachbehandlung, jedoch nicht bezüglich der Entwicklung einer Kapselkontraktur [11]. Eine Schwangerschaft oder ein hohes Patientenalter stellen keinen Risikofaktor für die Häufigkeit der Kapselkontraktur dar, verkürzen allerdings die Zeit bis zur Manifestation [30]. Dagegen zeigt sich zwischen der Kapselkontraktur und dem Östrogenstatus oder der Menopause kein Zusammenhang [10, 13].

1.2.3 Pathogenese

Obwohl die Ursachen der Kapselkontraktur noch nicht vollständig geklärt sind, gilt eine multifaktorielle Genese als gesichert. Entscheidend für die Entstehung einer Kapselkontraktur sind eine überschießende Entzündungsreaktion und Bindegewebsbildung [6, 9, 15]. So können als Ausdruck der Entzündung und Fibrose eine verstärkte Fibroblastenpopulation sowie eine vermehrte Anzahl an aktivierten T-Zell-Lymphozyten und Makrophagen bei Kapselkontrakturen nachgewiesen werden [31, 32].

Als Ursache der Entzündung werden eine mikrobielle und eine immunologische Hypothese postuliert. Die mikrobielle Hypothese geht davon aus, dass Antigene im Gewebe um das Implantat für eine subklinische, chronische Inflammation verantwortlich sind [7, 32]. Der Umstand, dass in explantierten Kapseln hoher Fibrosegrade (Baker III und IV) signifikant öfter eine Kolonisation festgestellt wurde als in Kapseln niedriger Fibrosegrade (Baker I und II), spricht für eine mikrobielle Beteiligung an der Entstehung der Kapselfibrose [33]. Auch eine bakterielle Streuung aus einem anderen Fokus wird hier diskutiert [15]. Allerdings konnte die Kontrakturnrate durch die perioperative Gabe von Antibiotika nicht eindeutig reduziert werden [34]. Dies spricht zumindest gegen eine rein mikrobielle Ursache.

Die immunologische Hypothese geht davon aus, dass lokale und systemische Faktoren eine chronische Inflammation verursachen [35]. 1994 wurde eine innere Zone der Kapsel, welche dem Implantat direkt anliegt, als synovia like metaplasia (SLM) beschrieben [36, 37]. Sie besteht aus einer Reihe breiter, pseudopapillärer Formationen, die an synoviales Gewebe erinnern und dieser Zone ihren Namen gegeben haben [36]. Die SLM ist diskontinuierlich und nicht immer vorhanden. Ihre Inzidenz wird, abhängig vom Implantattyp, zwischen 40% und 87% geschätzt [18, 36, 38, 39]. Einige Autoren gehen davon aus, dass die SLM der Ausgangspunkt für die Entstehung einer fibrotischen Kapsel ist [40, 41]. In den an die SLM angrenzenden Zelllagen finden sich vermehrt inflammatorische Zellen wie eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen, welche auf eine chronische Inflammation im Bereich der SLM hinweisen [39, 40]. So konnten Bergmann et al. einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer SLM und der inflammatorischen Reaktion feststellen [40]. Andererseits konnten Ko et al. in ihrer Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Kapselkontraktur und SLM feststellen [39]. Beide, Inflammation und SLM, schei-

nen in ihrem Ausmaß vom Implantattyp abhängig zu sein und beeinflussen die Architektur der entstehenden Bindegewebskapsel [40].

Als Folge der chronischen Inflammation kommt es zu einer gesteigerten Fibrose, welche zu einer fortschreitenden Bindegewebeakkumulation um das Implantat führt. Die Folge sind Verhärtungen und Schmerzen, die häufig eine chirurgische Intervention verlangen.

1.2.4 Entzündungsreaktion

CD4⁺- und CD8⁺- Lymphozyten sind wichtige Elemente der zellulären Immunabwehr und können als Zeichen einer unspezifischen Entzündungsreaktion im Kapselgewebe lokalisiert werden [32]. Persistieren sie über einen längeren Zeitraum, kann dies ein Hinweis auf eine chronisch-subakute Entzündungsreaktion sein [42]. Die Invasion und Proliferation der Lymphozyten (und Makrophagen) wird unter anderem über die Wachstumsfaktoren TGF-β und PDGF (aus Thrombozyten und Makrophagen) stimuliert [43, 44]. Gleichzeitig aktivieren sich Lymphozyten und Makrophagen gegenseitig, wobei die Lymphozyten einen positiven Einfluss auf die Adhäsion der Makrophagen haben [45]. Funktional können unter den T-Lymphozyten die CD4⁺- T-Helfer-Zellen und die CD8⁺-regulatorischen-T-Zellen (T-reg.-Zellen), zu welchen auch die zytotoxischen T-Zellen zählen, unterschieden werden [46]. Unter den CD4⁺-T-Helferzellen gibt es zwei wichtige Subtypen, die unterschiedliche Zytokine sezernieren. Die Th1 Zellen exprimieren IL-2, TNF-α und INF-γ und haben eine proinflammatorische Wirkung, während die Th2 Zellen die Interleukine 4,5,6,10 und 13 sezernieren und einen suppressiven Effekt auf die Inflammation haben [47, 48]. So genannte regulatorische T-Zellen (T-reg; früher: Suppressor-T-Zelle) sind an der Steuerung der Immunabwehr und Limitierung der Immunantwort beteiligt. Sie werden nach Funktion und Phänotyp in verschiedene Subtypen unterteilt. Boyce et al. konnten zeigen, dass durch einen Anstieg der CD8⁺-regulatorischen-T-Zellen und ein Abfallen der CD4⁺/CD8⁺-Ration ein Herabregulieren der Wundheilung beim Wundschluss gekennzeichnet ist, während ein Anstieg der CD4⁺- Zellen eine verstärkte Aktivität der Wundheilung anzeigt [49].

IL-6 und **TNF-α** sind wichtige Mediatoren der Akutphasereaktion, mit der der Körper systemisch auf Verletzungen oder Infektionen reagiert [50]. **IL-6** wird von Makropha-

gen, Mastzellen, Keratinozyten und Lymphozyten freigesetzt [48]. Es induziert Fieber, verstärkt die Synthese proinflammatorischer Zytokine und anderer Akutphaseproteinen, aktiviert Leukozyten und stabilisiert die Extrazellulärmatrix während der Proliferationsphase [48, 51]. **TNF- α** ist an der Ausbildung einer systemischen Entzündungsreaktion beteiligt und wird unter anderem von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten produziert [52]. Der Faktor ist zwar für seine Wachstumshemmung von Tumorzellen bekannt, wirkt aber wachstumsfördernd auf Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten [53]. TNF- α induziert die Freisetzung anderer Zytokine, wie die Interleukine 1,6 und 8 sowie die Synthese von MMPs [52]. Für beide Mediatoren stellen Makrophagen eine Hauptquelle dar [44].

1.2.5 Die Rolle der Makrophagen

Makrophagen (im Gewebe auch Gewebsmakrophagen oder Histiozyten) sind ein zentraler Mediator der Wundheilung [44]. Sie beeinflussen das Verhalten anderer an der Wundheilung beteiligter Zellen und nehmen dadurch Einfluss auf die Angiogenese, die Fibrose und die Bildung von Extrazellulärmatrix [48]. Die im Blut und Gewebe vorkommenden Monozyten differenzieren im Wundareal unter dem Einfluss von IL-2, TNF- α , PDGF und IFN- γ zu Makrophagen [54]. Ihr Einwandern wird durch Zytokine, welche von den Thrombozyten im periimplantären Gerinnsel sezerniert werden, gesteuert [42]. Hierzu zählen unter anderem growth factors (TGF- β und PDGF), platelet factors (PF4), Leukotriene (LTB₄) und Interleukine (IL-1) [48]. Die Makrophagen selbst sezernieren wiederum unter anderem TGF- β , PDGF, TNF- α , IL-6, G-CSF und GM-CSF, welche weitere Makrophagen und Fibroblasten einwandern lassen [44, 48]. Gleichzeitig stimulieren sie über TNF- α und PDGF die Bildung der provisorischen Matrix, wobei Fibroblasten unterstützend wirken [48].

Makrophagen können auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden. Klassisch aktivierte Makrophagen werden durch IFN- γ und mikrobakterielle Produkte aktiviert. Ihre Aufgabe besteht, neben der Phagozytose, in der Expression proinflammatorischer Zytokine, der Hemmung antiinflammatorischer Zytokine und der Produktion von NO [42]. Alternativ aktivierte Makrophagen werden durch IL-4, IL-3 und Glukokortikoide aktiviert und wirken antiinflammatorisch. Sie spielen eine Rolle bei der Elimination von Parasiten, Matrixumbau und allergischer Reaktion [42]. Durch das Ausschütten

von Wachstum- und Angiogenesefaktoren stimulieren alternativ aktivierte Makrophagen die Fibroblasteninvasion und -proliferation sowie die Kollagensynthese um das Implantat [42, 55, 56]. Typisch für die Makrophagenoberfläche ist das Antigen CD68, welches zu Ihrer Identifizierung genutzt werden kann, auch wenn es nicht ausschließlich auf Makrophagen vorkommt [57, 58].

1.2.6 TGF- β

Obwohl die hierbei involvierten Zusammenhänge noch nicht abschließend verstanden sind, scheint der transforming growth factor beta (**TGF- β**) eine zentrale Rollen im Pathomechanismus der fremdkörperinduzierten Kapselbildung darzustellen [59]. So konnten Kuhn et. al einen erhöhten TGF- β -Spiegel im Gewebe um fibrotische Kapseln feststellen [60]. Die Superfamilie TGF- β beinhaltet drei, sich in ihrer Wirkweise ähnelnde, Faktoren (TGF- β 1 bis 3), wobei TGF- β 1 in der kutanen Wundheilung dominiert [59, 61]. Er wird unter anderem von Makrophagen, Thrombozyten und Lymphozyten sezerniert [44] und stimuliert neben der Chemotaxis und Proliferation der Fibroblasten Monozyten zur Sekretion von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren (FGF, PDGF, TNF- α , IL-1) [48, 62, 63]. Außerdem wirkt er chemotaktisch und autokrin auf Makrophagen [44] und aktiviert die Angiogenese und die Sekretion von Fibronectin und Proteoglykanen [44, 64, 65]. Zudem ist TGF- β ein äußerst potenter Stimulator der Kollagensynthese [65] und kann, je nach Konzentration, die Zellproliferation aktivieren oder hemmen [48].

Daneben stimuliert TGF- β u.a. die Expression der beiden Faktoren CTGF und FGF [63, 66]. **CTGF** ist ebenfalls ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Bindegewebssynthese und hat viele gemeinsame Funktionen mit TGF- β [67]. Er kommt in Endothelzellen, Fibroblasten, Knorpel und smooth-muscle-cells (Myofibroblasten) vor und stimuliert die Mitogenese, Chemotaxis und Syntheseleistung der Fibroblasten [67]. Igarashi et al. kommen zu dem Schluss, dass es sich bei CTGF um einen wichtigen autokrinen Wachstumsfaktor der Fibroblasten handelt, dessen Expression durch TGF- β stimuliert wird [66]. Seine genaue Rolle ist zwar noch nicht vollständig geklärt; dennoch geht man von einer engen Korrelation zwischen CTGF und Fibrose aus [67, 68]. **FGF** kommt als basische (bFGF, FGF-2) und als saure (aFGF, FGF-1) Variante vor [48]. Während beide Varianten positiv auf die Endothelzelleproliferation wirken, stimuliert FGF-2 zusätzlich die

Epithelialisation, die Wundkontraktion und die Synthese von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen [44, 69].

1.3 Klassifikation der Kapselkontraktur

Als Einteilung des Schweregrades einer Kapselkontraktur hat sich im klinischen Alltag die Klassifikation nach Baker bewährt [70]. Hierbei werden 4 Ausprägungsgrade anhand des klinischen Erscheinungsbildes unterschieden (siehe Tabelle 1.1). Diese subjektive Einteilung ist sehr vom Untersucher und seiner Erfahrung abhängig, was sich auch in den zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnissen zur Inzidenz der Kapselkontraktur widerspiegelt. Um eine objektivere Klassifikation und somit eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, entwickelten Wilflingseder et al. den auf der Beurteilung histologischer Parameter bestehenden Wilflingseder-Score (siehe Tabelle 1.2) [71]. Dieser, histologisch erhobene, Score korreliert mit dem klinisch erhobenen Baker-Score [7, 72].

Tabelle 1.1 Klassifikation der Kapselkontraktur nach Baker [7]

Grad	Baker
1	Breast absolutely natural; no one could tell that the breast was augmented
2	Minimal contracture; the surgeon can tell that surgery was performed but the patient has no complaint
3	Moderate contracture; the patient feels some firmness
4	Severe contracture; obvious just from observation

Tabelle 1.2 Klassifikation nach Wilflingseder [73]

Kapselgrad	I	II	III	IV
Dicke (mm)	1	2-3	2-3	5-10
Zelllagen	Eine	Zwei – vier	Zwei – vier	nekrotisch
Kollagenbündel	parallel	parallel/ multidirektional	multidirektional	multidirektional
Histiozyten mit Granula	-	+	+	+
Riesenzellen mit Granula	-	-	+	+
Granulome	-	-	-	+

Seit Einführung des Wilflingseder-Score wurden neue, umfangreichere Erkenntnisse über die Kapselkontraktur gewonnen. Bergmann et al. kamen deshalb zu dem Schluss, dass der Wilflingseder-Score nicht mehr zeitgemäß ist und haben diesen nach weiteren, histologischen Gesichtspunkten modifiziert (siehe Tab. 1.3) [40].

Tabelle 1.3 Wilflingseder-Score modifiziert nach Bergman et al. [40]

Kapselgrad	I	II	III	IV
Dicke (mm)	1	2-3	2-3	5-10
Zelllagen	Eine	Zwei – vier	Zwei – vier	nekrotisch
Kollagenbündel	parallel	parallel/ multidirektional	multidirektional	multidirektional
Granulome	-	-	-	+
Histiozyten	-	+	++	+++
Lymphozyten	-	+	++	+++
Granulozyten	-	+	++	+++
Dicke der SLM	-	+	++	+++

1.4 Einfluss der Implantatoberfläche auf die Biokompatibilität

Da ein Zusammenhang zwischen bakterieller Besiedelung der Implantatoberfläche und Kapselfibrose angenommen wird [33], ist zu vermuten, dass sich eine Reduktion der Kontamination oder Infektion positiv auf die Kontraktur und die Fibrose auswirken [33, 74]. Durch Ausspülen der Implantattasche mit antibiotisch wirksamen Substanzen (z.B. Povidon-Iod, Cephalothin), konnte ein mindernder Effekt auf die Kapselkontraktur beobachtet werden [75]. Jedoch scheint die Kontrakturrate durch perioperative Gabe von Antibiotika nicht eindeutig reduziert werden zu können [34]. Dagegen hemmt die Gabe von **Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten** (p.o. oder als Injektion in die Implantattasche) die Entzündungsreaktion und reduziert somit das Ausmaß der Kapselbildung [76, 77]. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Entzündungsreaktion, der Fibroblastenproliferation, der Expression von TGF- β und Kollagen Typ I, sowie des totalen Kollagengehalts, stellt die orale Applikation von **Pirfenidon** dar [78]. Hierdurch konnte auch eine klinische Besserung bei bereits bestehender Kapselfibrose erreicht werden [79].

Die 1968 konzipierte Polyurethanbeschichtung (**PU**) macht die ursprünglich glatte Silikonoberfläche rau und stellt die älteste Oberflächenmodifikation dar. Es zeigte sich,

dass PU-beschichtete Implantate, unabhängig von der Texturierung, eine geringere Rate an Kapselkontrakturen als unbeschichtete Implantate aufweisen [80, 81]. Dieser Effekt kann auf die aufgeraute Oberfläche der Beschichtung, welche die Anordnung der Kollagenfasern beeinflusst, zurückgeführt werden [80]. Aufgrund der kanzerogenen Wirkung des im Rattenmodell beim Abbau von PU entstehenden 2,4-Toluylendiamin wurden die PU-Implantate 1991 freiwillig wieder vom US-Markt genommen [74, 82]. Außerhalb der USA werden sie weiterhin hergestellt. Bei einem geringeren Langzeitrisiko eine Kapselkontraktur zu entwickeln, scheinen sie ein ähnliches Sicherheitsprofil wie mechanisch texturierte Implantate zu haben [12, 80].

Durch eine **Texturierung** der Implantate wird ebenfalls eine Aufrauhung der Oberfläche erreicht [83]. Hierbei bleibt Silikon weiterhin die Kontaktfläche zum umliegenden Gewebe. Eine Reduktion des Kontrakturrisikos durch die Verwendung texturierter Implantate (s. Kap. 1.2.2) wird zwar in der Literatur diskutiert [23, 24], scheint sich in Langzeitstudien jedoch nicht zu bestätigen [12, 25].

Neben rein physikalischer Parameter, kann sich auch eine Veränderung der chemischen Eigenschaften der Oberfläche auf die Kapselbildung auswirken. **Phosphorylcholin** (PC) ist ein Bestandteil vieler Phospholipidmoleküle, welche die Zellmembran ausmachen. Aufgrund seiner Bipolarität hat PC eine hohe Wasseraffinität und bindet viele Wassermoleküle. Diese erschweren das Anhaften von Biofilmen auf mit PC beschichteten Oberflächen. In einer tierexperimentellen Studie konnten Zeplin et al. zeigen, dass eine Beschichtung der Implantate mit **Phosphorylcholin** zu einer geringeren Anhäufung von Makrophagen und somit zu einer signifikanten Reduktion der Kapseldicke und Entzündungsreaktion nach 3 Monaten führt [84].

Eine andere Oberflächenmodifikation stellt die kontrollierte Freisetzung von **Inhibitoren des TGF- β -Signalwegs** dar [85]. Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Bildung der Kapselfibrose (s.a. Kap. 1.2.6). In der Signaltransduktion werden drei verschiedene TGF- β -Rezeptoren unterschieden. TGF- β bindet zunächst eine transmembrane Serin/Threonin-Kinase (TGF- β -Rezeptor II), welche dann zusammen mit dem von ihr phosphorylierten TGF- β -Rezeptor I smad-Proteine als second messenger phosphoryliert. Der TGF- β -Rezeptor III (Betaglycan) hat hierbei unterstützende Funktion. Anschließend entsteht ein Heterodimer aus den zwei aktivierenden smad-Proteinen

smad2 und smad3 sowie dem co-smad smad4, welches über Nukleoporene in den Zellkern eindringt und dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription der Zielgene steuert [86]. Über das inhibitorische smad-7, welches ebenfalls von TGF- β aktiviert wird, entsteht eine negative Rückkopplung, die die Stärke und Dauer der Aktivierung limitiert [87]. Smad3 ist ein entscheidender second messenger in der Fibrose, welcher besonders die extrazellulären Prozesse steuert [88]. So wird durch den TGF- β -1/smad3-Signalweg die Synthese der Kollagene 1,3,5 und 6 induziert [89]. Durch eine Beschichtung mit **Halofuginon**, welches in die smad3-Phosphorylierung im TGF- β -Signalweg eingreift und die Expression von Kollagen 1 unterdrückt, kann eine Reduktion der Entzündung und Fibrosierung um die Silikonimplantate erreicht werden [90].

Eine weitere, mögliche Modifikation ist die Inhibition der Fibroblastenproliferation mittels **5-FU**-Beschichtung (5-Fluorouracil). Dies führt zwar zu einer Reduktion der Kollagensynthese [91], verursacht in höheren Dosierungen jedoch eine Verstärkung der Entzündungsreaktion [91].

1.5 Rekombinantes Spinnenseideprotein als Beschichtungsmaterial

Die oben beschriebenen, teilweise erfolgreichen Versuche, Einfluss auf die Kapselfibrose zu nehmen, geben Anlass zu der Vermutung, dass die Biokompatibilität von Silikon durch eine Beschichtung seiner Oberfläche weiter verbessert werden kann. Spinnenseide ist neben ihrer hohen Belastbarkeit auch für das Hervorrufen einer geringeren Entzündungsreaktion bekannt [92-94]. Aus diesem Grund verwendeten Römer und Griechen sie bereits in der Antike zur Herstellung besonders gut verträglicher Verbände [93, 95]. Die hohe Belastbarkeit und eine geringe Entzündungsreaktion machen Spinnenseide zu einem interessanten Biomaterial für die plastisch-chirurgisch orientierte Materialforschung [92-94, 96]. So konnten Spinnenseidenfäden bereits erfolgreich als Nahtmaterial oder als Leitstruktur bei Nervenrekonstruktionen eingesetzt werden [92, 96, 97].

1.5.1 Spinnen und Netzaufbau

Spinnen gehören zu den ältesten und zu den vielfältigsten Tieren auf unserem Planeten [93]. Ihre bekanntesten Vertreter bilden die Familie der echten Radnetzspinnen

(Araneidae), welche die charakteristischen, speichenförmigen Netze spannen [93]. Diese Netze dienen den Spinnen vor allem zum Beutefang und müssen enorme Belastungen aushalten. Im Laufe der Evolution haben Spinnen verschiedene Seidenfäden entwickelt, welche den natürlichen Anforderungen besonders gut angepasst sind. Radnetzspinnen können bis zu 7 unterschiedliche Fäden absondern, die sie neben einem seidenähnlichen Klebstoff in ebenso vielen einzelnen Drüsen produzieren [92-94].

Für den Netzbau sind die Proteine der großen Hauptdrüse (MAS, major ampullate silk) besonders wichtig. Sie dienen als stabile, zugfeste Fäden der Grundkonstruktion des Netzes, welche aus dem Rahmen und den nach innen laufenden Speichen besteht [93-95]. Gleichzeitig dient diese Fadenart der Spinne auch als Abseilfaden bei Gefahr, weswegen sie auch Dragline genannt wird [93-95]. Zur strukturellen Verstärkung des Netzes werden die Fäden der minor ampullate (MIS, minor ampullate silk) verwendet [94, 95]. Diese besitzen eine ähnliche Zugfestigkeit, aber eine deutlich niedrigere Dehnbarkeit als die major ampullate silk (MAS) [95]. Zwischen den stabilen Speichen des Netzes wird die Fangspirale aufgespannt. Deren Fäden sind weniger stabil, dafür aber deutlich dehnbarer, wodurch beim Eintreffen eines Insekts ein hohes Maß an kinetischer Energie absorbiert werden kann [93, 95]. Um ein Anhaften der Beute zu gewährleisten versieht die Spinne diese Fäden mit einem klebrigen Sekret [93, 94]. Je nach Spinnenart werden die Fäden des Netzes mehrmals am Tag oder erst nach mehreren Monaten erneuert [93].

1.5.2 Molekularer Aufbau und Assemblierung der Seidenfäden

Die Fäden der Spinnenseide bestehen aus einzelnen Proteinpolymeren, deren Zusammensetzung nicht immer vollständig untersucht ist [95]. Die zwei am besten untersuchten Fäden sind die Dragline der Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) und der Goldene Seidenspinne (*Nephila clavipes*) [95]. Die Dragline besteht hauptsächlich aus zwei Proteinen (Spidroin), wobei es unklar ist, inwieweit zusätzliche Proteine die Struktur beeinflussen [95, 98]. Die Proteine der Dragline der *Araneus diadematus* werden ADF-3 und ADF-4 (*Araneus Diadematus Fibroin*), die der *Nephila clavipes* MaSp1 und MaSp2 (*Major ampullate Spidroin*) genannt [95]. Beide bestehen aus hoch repetitiven Kernsequenzen und daran angrenzenden, kurzen, nicht-repetitiven Sequenzen

am Amino- und am Carboxylende [95, 99]. Die repetitiven Elemente der Seidenproteine können in vier Gruppen eingeteilt werden: $(A)_n$ bzw. $(GA)_n$, GPGXX, GGX und Spacer (A für Alanin, G für Glyzin, P für Prolin, X für Glutamin) [95, 99]. Diese Bausteine wurden über 125 Mio. Jahre in den MAS unterschiedlicher Netzspinnen beibehalten [99]. Man geht davon aus, dass der Aufbau der Primärstruktur der Spidroine besonders wichtig für die Assemblierung und die charakteristischen Eigenschaften der Seide ist [99].

Mit Hilfe der Röntgenbeugungsanalyse lassen sich elektronendichte von elektronenarmen Regionen innerhalb eines Seidenproteins unterscheiden [93]. Die elektronenreichen Regionen, welche vermutlich durch kristalline Strukturen mit hohem β -Faltblattanteil hervorgerufen werden, sind für die Stabilität der Proteine verantwortlich, während die elektronenarmen Regionen, welchen hydrogelartige Abschnitte mit amorphen Sekundärstrukturen zugeordnet werden, die Dehnbarkeit der Proteine ermöglichen [92, 93]. Je nach Seidenart findet sich eine unterschiedliche Verteilung der kristallinen und hydrogelartigen Formen [93].

Die Seidenproteine werden von den tall columnar endothelial cells im oberen Abschnitt der Seidendrüse produziert und als hochkonzentrierte wässrige Lösung (50% w/v) in die Drüsen sezerniert [99]. Dort werden sie als kristalline Flüssigkeit gespeichert und können bei Bedarf assembliert und als Faden extrudiert werden [93, 95]. Dabei wird die Proteinlösung durch den Spinnkanal geleitet, wo ihr Natrium- und Chlorid-Ionen sowie Wasser entzogen und Kalium-Ionen sowie Protonen zugeführt werden [93, 95]. Dies führt zu einem Absinken des pH-Wertes von 6.9 auf 6.3 und einer Phase-separation zwischen einer proteinreichen und einer wässrigen Lösung [93, 95]. Die Spinne kann nun mit ihren Hinterbeinen, bzw. durch den Zug der Schwerkraft beim Abseilen, den Seidenfaden aus der Spinnwarze ziehen. Hierbei ist der durch den Zug entstehende Laminarfluss für die Interaktion der einzelnen Proteine wichtig [93]. Um einen sofortigen Einsatz bei Bedarf zu ermöglichen, verbleibt ein Restfaden an der Spinnwarze [93].

1.5.3 Möglichkeiten zur Herstellung und Verarbeitung von Spinnenseide

Herkömmliche Textilseide wird vom Seidenspinner (*Bombyx mori*) auf speziellen Seidenfarmen gewonnen [93]. Da die Qualität der Spinnenseide stark von Umweltfaktoren wie Nahrung, Temperatur und Feuchtigkeit abhängt und in Gefangenschaft generell vermindert ist, eignet sich die Produktion in speziellen Seidenfarmen nur bedingt [93]. Zusätzlich machen der Kannibalismus und das territoriale Verhalten der Spinnen die Haltung besonders aufwendig [93, 94, 99]. Die Spinnen müssten in Einzelkäfigen gehalten und die Fäden unter Betäubung manuell geerntet werden [93]. Die hierbei gewonnenen Fäden können zwar zur Forschung verwendet werden, sind aber für einen groß angelegten medizinischen Einsatz zu teuer [93].

In der rekombinanten Gentechnologie stellt man Proteine in genetisch veränderten Organismen, denen sie nicht entstammen, her [93]. Üblicherweise werden hierfür einzellige, gut untersuchte Pro- oder Eukaryonten als Wirte verwendet und deren Genom um das Gen, welches das gewünschte Protein codiert, erweitert [93]. Häufig sind hierbei noch molekularbiologische Anpassungen des Wirtsgenoms oder des neuen Gens erforderlich [93]. Ein bekanntes Beispiel ist das, schon seit Jahrzehnten rekombinant aus *E.coli*-Zellen gewonnene, humane Insulin [93].

Da Bakterien nur eingeschränkt in der Lage sind Proteine, die mehr als 1.200 Aminosäuren lang sind, zu synthetisieren, eignen sie sich für die Gewinnung der oft mehr als 5.000 Aminosäuren langen Spinnenseideproteine nur bedingt [93-95, 100]. Neben der Proteinelänge ist auch die Codon-Verwendung von Bakterien und Spinnen unterschiedlich. So werden in Bakterien bestimmte Aminosäuren durch andere Triplet-Codons kodiert als in der Spinne [93-95]. Um eine rekombinante Produktion trotzdem zu ermöglichen, müssen geeignete, eukaryotische Wirte, deren Codon-Verwendung der Spinne ähnlich ist und welche Proteine in ausreichender Länge produzieren können, verwendet werden [94]. Spinnenseide wurde bisher mit mäßigem Erfolg in modifizierten Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten und Säugetierzellen produziert [99]. Durch Baculoviren konnten Gene für Spinnenseide in Insekten übertragen und dort erfolgreich produziert werden, wobei aber auch hier die Ausbeute für einen kommerziellen Einsatz unzureichend ist [94, 95].

Eine weitere, kostengünstige Alternative ist es, die Proteine so anzupassen, dass sie auch in einfach zu handhabenden Wirten produziert werden können [93-95]. Diese neuen, synthetischen Proteine beinhalten zwar modifizierte Bausteine der originalen Spinnenseide, sind aber ein reines Kunstprodukt und kommen in dieser Form in der Natur nicht vor. Ein wichtiger Schritt für das Entwerfen neuer Proteine ist Die Identifikation der für bestimmte Eigenschaften verantwortlichen Primärstrukturen durch Auswerten experimenteller Daten und Computeranalysen [93]. Ist die Aminosäuresequenz bekannt, so wird, mittels reverser Transkriptase, eine Genkassette konstruiert, welche diese Aminosäuresequenz kodiert und dieselben Codons wie der Wirtsorganismus verwendet [93, 94]. Diese Genkassetten können nach Bedarf aneinander gesetzt und so zu neuen Seidengenen kombiniert werden [93]. Die neuen Gene werden über Plasmide in die Bakterienzellen transferiert und anschließend dort synthetisiert [93]. Durch dieses Vorgehen kann rekombinante Spinnenseide preiswert und standardisiert in einfachen bakteriellen Wirten hergestellt werden [93-95]. Es ermöglicht aber auch ein Vereinen von Eigenschaften verschiedener Seidenfäden unterschiedlicher Spinnen oder ein Erweitern um chemische oder biologische Eigenschaften durch das Einbringen artifizierender Sequenzen [93-95].

Die synthetisch gewonnenen Seidenproteine sind der natürlichen Seide in punkto Produktion und Anwendungsspektrum deutlich überlegen [93, 99]. Mittels Zellyse und einer einfachen Reinigung, können die Proteine extrahiert werden, wobei eine Ergiebigkeit von $140 \text{ bis } 360 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden kann [94, 95]. Die gereinigten Proteine können in einem gefriergetrockneten Zustand aufbewahrt und bei Bedarf nach Auftauen und -lösen weiter verarbeitet werden [94]. Unter natürlichen Umständen werden die Proteine zu Fäden assembliert, wohingegen in der rekombinanten Produktion auch die Möglichkeit besteht andere Strukturen, wie z.B. Proteinfilme herzustellen [93]. Bei der Beschichtung mit rekombinanten Spinnenseidenproteinfilmen wird das Proteinlösungsmittel auf eine Oberfläche gegossen und anschließend verdampft, wodurch ein Film von wenigen Nano- bis zu mehreren Mikrometern Dicke entsteht [101]. Durch die Wahl von Prozessablauf und Lösungsmittel lassen sich die chemischen und mechanischen Eigenschaften zusätzlich beeinflussen [93]. Auf diese Weise können auch Silikonimplantate mit einem Proteinfilm überzogen werden und von dessen Eigenschaften profitieren.

Das von der Firma AMSilk entworfene und vom Abseilfaden der Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) abgeleitete, synthetische Protein „Engineered *Araneus diadematus* Fiber“, kurz eADF4(C16), stellt ein solches, rekombinantes Spinnenseideprotein dar. Sollte es ähnliche, antientzündliche Eigenschaften haben, wie sie bereits von der Spinnenseide bekannt sind, könnte eine Beschichtung hiermit die Biokompatibilität der Silikonimplantate verbessern und das Risiko der Kapselkontraktur vermindern.

1.6 Untersuchung einer Beschichtung mit rekombinantem Spinnenseidenprotein

Um die Auswirkung einer Beschichtung mit diesem, neuen Proteinfilm auf die lokale Entzündungsreaktion, die Fibrosierung und die Kapselbildung untersuchen zu können eignet sich das Rattenmodell besonders gut. Dieses kommt dem menschlichen Organismus sehr nahe, ist gut verfügbar und konnte bereits zuvor zur Untersuchung anderer Beschichtungen und der Kapselbildung erfolgreich eingesetzt werden [40, 84, 90]. Analog zu den vorausgegangenen Untersuchungen wurden im vorliegenden Experiment Silikonimplantate mit rekombinanter Spinnenseide beschichtet und in Sprague-Dawley-Inzuchtratten implantiert und nach 3, 6 und 12 Monaten zusammen mit dem perikapsulären Gewebe explantiert (s.a. Kap. 2).

1.7 Zielsetzung

Gegenstand dieser Dissertation sind die Analyse und Auswertung des in o.g. Tierversuch gewonnenen Gewebe mittels Histologie, Immunhistologie und quantitative-Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR). Untersucht werden soll die Frage, ob die übermäßige, periprothetische Fibrosierung durch eine Beschichtung herkömmlicher Implantate mit dem synthetischen Spinnenseideprotein eADF4(C16) vermindert werden kann. Daraus ergeben sich folgende Arbeitshypothesen:

Eine Beschichtung der Silikonoberfläche mit eADF4(C16) hat keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion und Fibrosierung im periprothetischen Gewebe (H0).

Eine Beschichtung der Silikonoberfläche mit eADF4(C16) vermindert die Entzündungsreaktion und Fibrosierung um die Implantate und verbessert so deren Biokompatibilität (H1).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Genehmigung

Für den vorliegenden Versuch wurden 60 männliche Sprague-Dawley Inzuchtratten (Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland) im Alter von 12 Wochen und einem Ausgangsgewicht von 250 – 300 g verwendet. Diese wurden in zwei Gruppen randomisiert. Die Kontrollgruppe (KG) erhielt unbehandelte; die Untersuchungsgruppe (SG) mit eAD-F4(C16) beschichtete Implantate. Beide Gruppen wurden in jeweils 3 Untergruppen unterteilt.

Tab. 2.1 Einteilung Verteilung der Versuchstiere auf Untersuchungs- und Kontrollgruppe

Explantation nach	3 Monaten	6 Monaten	12 Monaten
Kontrollgruppe	KG-3 (n=9)	KG-6 (n=9)	KG-12 (n=12)
Untersuchungsgruppe	SG-3 (n=9)	SG-6 (n=9)	SG-12 (n=12)

Die Tiere wurden zu jeweils 5 Stück in mit Sägemehl ausgelegten Käfigen (Polycarbonat, Makrolon® Typ IV) in Lamin-Air-Flow-Schränken® (Scanbur, Koge, Dänemark) im Kleintierlabor der Universitätsklinik Würzburg gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12h, die Raumtemperatur 21 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 50 – 60%. Die Tiere erhielten während der gesamten Zeit Altromin® Pressfutter und Trinkwasser ad libitum. Ihre Gesundheit wurde regelmäßig kontrolliert und die Käfige wurden bei Bedarf gewechselt. Die Genehmigung des Tierversuches erfolgte durch den Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg bei der Regierung von Unterfranken (Zulassungsnummer AZ 55.2-2531.01-19/09). Alle Eingriffe wurden von autorisierten Personen (Herr Dr.med. M. Jordan und Herr Priv.-Doz. Dr. med. habil. Philip Zeplin) durchgeführt.

2.2 Implantate

Für die Versuche wurden texturierte Miniatursilikonimplantate (Polytech Health & Aesthetics, Dieburg, Deutschland), bestehend aus einer soliden äußeren Silikonhülle und einem flüssigen Silikongel im Inneren, verwendet. Der Durchmesser der Implantate betrug 2,6cm und das Volumen 3ml. Jeweils 30 Implantate wurden auf die Kontrollgruppe KG und auf die Spinnenseidengruppe SG verteilt. Die Implantate der SG wurden

zuvor durch die Firma AMSilk (AMSilk GmbH, Planegg/Martinsried, D) mit dem Proteinfilm eADF4(C16) beschichtet.

2.3 Beschichtung der Implantate

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) (AMSilk GmbH, Planegg/Martinsried, D) wurde nach der Herstellung in einer Konzentration von 1% (m/v) in 6M Guanidiniumthiocyanat gelöst und mit dem gleichen Volumen 50mM Tris/HCl pH 9 (Tris Puffer) versetzt. Über Nacht erfolgte eine Dialyse mit 50mM Tris Puffer bei 4°C. Verbliebene Guanidiniumthiocyanat Rückstände wurden mittels Querstromfiltration bei 4°C entfernt und das Protein anschließend auf 10,9g/l aufkonzentriert.

Die Silikonimplantate wurden vor der Beschichtung mit 70% (v/v) Äthanol gespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie 3-mal für 120ms in die zuvor hergestellte Seidenproteinlösung getaucht und jeweils für 300s bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde die Beschichtung durch Eintauchen in 1M KH₂PO₄ Lösung für 120s und anschließende Trocknung bei Raumtemperatur für 120s fixiert, mit 0,9% (m/v) NaCl-Lösung gespült, in sterilen Behältern mit 500µm 0,9% (m/v)NaCl-Lösung aufbewahrt und mittels Gamma-Strahlung sterilisiert.

2.4 Implantation

Die Tiere wurden während der Implantation mit Isofluran (Forene®, 1-Chlor-2,2,2-trifluoroethyl-difluor-methylether, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) betäubt. Am kaudalen Rücken wurde jeweils eine Tasche unter dem Panniculus carnosus präpariert und das Implantat unter Berücksichtigung steriler Kautelen dort implantiert. Der Wundverschluss erfolgte mit nicht resorbierbaren Fäden, welche 2 Wochen postoperativ wieder entfernt wurden. Als Schmerzprophylaxe wurde den Ratten einmalig Tramal® (Tramadolhydrochlorid, Grünethal GmbH, Aachen) i.m. appliziert. Postoperativ wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt. Eine tägliche Wundkontrolle fand statt.

2.5 Explantation

Das Ausgangsgewicht der Ratten hatte sich auf durchschnittlich 450g verdoppelt. Die Tiere wurden erneut mit Isofluran betäubt und die Implantate samt der sie umgebenden fibrösen Kapsel entfernt. Die Kapsel wurde vom Implantat gelöst und in drei Teile geteilt. Der erste Teil wurde in Formaldehyd eingelegt und diente für die späteren Paraffinschnitte. Der zweite Teil diente der Gewinnung von Gefrierschnitten und wurde in einem Plastikröhrchen (Cat-NR: PR02 3,5ml; Hartenstein, Würzburg, Deutschland) mit Tissue Tek® (Cat-NR: TTEK 125ml; Hartenstein, Würzburg, Deutschland) eingelegt, bei -196°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -18°C in einem Eisschrank aufbewahrt. Der dritte Teil wurde für die Untersuchung mittels PCR in ein Röhrchen RNA-Later® (Best.-Nr. AM7022, Ambion, Austin, USA) gegeben. Alle Proben wurden verschlüsselt beschriftet und dokumentiert. Die Tiere wurden nach der Explantation durch einen Herzschnitt getötet.

2.6 Analyse der Beschichtung nach Explantation

Die explantierten Silikonimplantate wurden durch die Firma AMSilk (AMSilk GmbH, Planegg/Martinsried, D) auf verbleibende Überreste des Proteinfilms untersucht. Sie wurden hierfür vom Kapselgewebe befreit und bis zur Analyse am Folgetag in Saline gelagert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur für 30 min in 50ml Phosphatgepufferter-Saline (PBS) und mit 5% (m/v) Magermilchpulver geblockt. Danach wurden sie 60 min in einer Hybridisierungslösung bestehende aus 50 ml PBS, 1% Magermilchpulver und T7-Tage Antikörper HRP-Konjugat (Novagen #69048-3, Merck Millipor, Darmstadt, Deutschland, Verdünnung 5000-fach) inkubiert, gewaschen und im Dunkeln in Lumi-Light^{PLUS} Lösung (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) erneut inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde die Chemilumineszenz bei einer Belichtungszeit von 1-2 min mit einem ProXima 10 Phi-Scanner (Isogen, De Meern, Niederlande) aufgezeichnet.

2.7 Histologische und immunhistologische Untersuchung

2.7.1. Anfertigen von Paraffinschnitten

Die entnommenen und in 3% Formaldehydlösung eingelegten Kapselproben wurden im pathologischen Institut der Universität Würzburg mithilfe einer Entwässerungsmaschine (Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Deutschland) dehydriert, in 80°C warmes Paraffinwachs eingelegt und zur Auskühlung bei Raumtemperatur 24h gelagert. Aus diesen Blöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom Hn40 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) und einer S22 Klinge (Microtome Blade, Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan) 5µm dicke Schnitte angefertigt und immer paarweise auf einem Objektträger aufgebracht. Die Schnitte blieben bei 40°C über Nacht in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) und wurden anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.7.2. Anfertigen von Gefrierschnitten

Die Proben wurden aus den Gefrier Röhrchen, in denen sie nach der Explantation gelagert wurden, entnommen und mit Tissue Tek® (TTEK 125ml; Apotheke Hartenstein, Würzburg, Deutschland) auf dem Kryoträger eines Kryostat (Cat-Nr. CM3050S, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland), dessen Innenraum auf -20°C abgekühlt war, fixiert. Nachdem die Probe solange getrimmt wurde, bis sich eine glatte Schnittfläche ergab wurden 5µm dicken Schnitte angefertigt und immer paarweise auf einem beschrifteten Glasträger (Superfrost Plus 03-0060, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) abgelegt. Die fertigen Schnitte wurden bei -18°C im Eisschrank gelagert.

2.7.3. Pufferherstellung

Tris-NaCl, 5l:

1. 40,5g NaCl (Art.-Nr. 1080181, Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
2. 3,0 g Tris (Art.-Nr. 48551 M 121,14g/mol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
3. pH 7,4 auftitriert mit HCL ≥ 32% M 36,46 g/mol (REF P074.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

PBS:

1. 5,0 l H₂O (Art.-Nr. 1080181, Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
2. 10 Tabletten PBS (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom; Art.-Nr. BR0014G,)

2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bestandteile der Färbung:

- 1.) Mayer's Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Cat-Nr. MHS32-1L; LOT: 091M4374)
- 2.) Eosin-Floxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Cat-Nr. HT110332-1L; Lot: 040M4352)

Hämalaun ist ein basophiler Farbstoff, welcher vor allem saure Zellbestandteile wie DNA (Zellkern) und RNA blauviolett färbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit dem synthetischen Farbstoff Eosin, welcher vor allem azidophile Strukturen wie Proteine und Kollagen hellrosa bis pink färbt.

Protokoll der HE-Färbung:

- 1.) Entparaffinieren: Gewebeschnitte für 10 min. in Xylol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Cat-Nr. 16446-2.5L; Lot: SZBB2410V) gegeben.
- 2.) Hydrierung in absteigender Alkoholreihe: Zweimal abs. Alk. (absoluter Alkohol über die Klinikapotheke, Uniklinik Würzburg, Deutschland) für je 5 min., 80% Alk. für 3 min., 70% Alk. für 3 min., 50% Alk. für 3 min. und Aqua dest. (destilliertes Wasser über die Klinikapotheke, Uniklinik Würzburg, Deutschland) für 3 min.
- 3.) Eintauchen in Mayer's Hämatoxylin für 15 min.
- 4.) 10 min. Spülen mit Leitungswasser („Bläuen“)
- 5.) kurz in Aqua dest. spülen
- 6.) für 2 bis 3 min. in die Eosin-Lösung geben.
- 7.) kurz in Aqua dest. spülen
- 8.) Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: 50% Alk. für 3 min., 70% Alk. für 3 min., 80% Alk. für 3 min. und zweimal abs. Alk. für 5 min.
- 9.) zweimal für 10 min. in Xylol geben.
- 10.) Eindecken mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Cat-NR. 1.07960.0500; Lot: HX887226) und mit Deckgläsern konservieren.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mittels eines Olympus®-Mikroskop (Typ BX 51 TF Nr. Oc22834, Firma Olympus, Hamburg, Deutschland) und einer Olympus Digitalkamera (DP 71 Nr. 7E10977, Firma Olympus, Hamburg, Deutschland), sowie dem Programm cellSens_Dimensions (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland). Es wurden je 100 Gesichtsfelder der 6 Gruppen (KG 3,6 und 12 sowie SG 3,6 und 12) randomisiert ausgewählt und ihre Kapseldicke in 100-facher Vergrößerung zwischen zwei parallel verlaufenden Linien an der dünnsten Stelle

im Gesichtsfeld in μm gemessen. Die Ergebnisse der Auswertung wurden als Zahlenwerte in einer Excel[®] Tabelle festgehalten.

2.7.5. Immunhistologie

Bei den immunhistologischen Färbungen wurde die Methode der indirekten Färbung verwendet. Während die primären (IgG, monoklonal) Antikörper (AK) gegen das zu untersuchende AG gerichtet waren, waren die sekundären (IgG, polyklonal) AK gegen den verwendeten primären AK gerichtet. Monoklonale AK entstammen nur einer Zellreihe und sind spezifischer als polyklonale Antikörper. Sie weisen dadurch weniger Kreuzreaktivität auf, sind aber anfälliger für Epitopenänderungen. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen B-Zelllinien und sind weniger spezifisch, aber auch weniger anfällig für Epitopenänderungen. Da sie jedoch nicht aufgereinigt sind, können Serumproteine zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führen. Um den Erfolg der Färbevorgänge zu beurteilen wurden jeweils eine Positiv- (Haut- bzw. Milzgewebe) und eine Negativkontrolle (Gewebeprobe ohne primären Antikörper) mitgefärbt.

An die sekundären Antikörper war die horseradish peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich) gekoppelt. Durch Auftragen von Peroxid auf das Präparat färbten die entstandenen Protonen das beigefügte Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) an den Stellen mit sekundärem Antikörper braun. Diese Färbung konnte anschließend unter dem Mikroskop beobachtet und ausgewertet werden. Um eine unspezifische Protonierung des Chromogens zu vermeiden wurde vor der Färbung die endogene Peroxidase mittels einer Peroxid-Methanol-Lösung (3ml 30% H₂O₂ in 200 ml Methanol) blockiert. Eine Gegenfärbung mit Hämalaun färbte die basophilen Zellkerne blauviolette. Dies ermöglichte eine Differenzierung einzelner Zellen.

Färbeprotokoll der Immunhistologie:

- 1.) 10 min. Einwirken in Aceton (Firma: Sigma Aldrich; Cat-NR: 32201-2,5L)
- 2.) 15 min. Lufttrocknen
- 3.) 3 mal 5 min in Puffer waschen
- 4.) 30 min. Einwirken in H₂O₂-Methanol Lsg. (Firma: Sigma Aldrich, Cat-NR: 32213-2,5L)
- 5.) 3 mal 5 min. in Puffer waschen
- 6.) Primären Antikörper in entsprechender Verdünnung mit antibody diluent (Firma: Dako; Cat-NR: S2022; Lot-NR: 00074952) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubieren

- 7.) 3 mal 5 min. in Puffer waschen
- 8.) Sekundären Antikörper, in einer Verdünnung von 1:100 mit antibody diluent (Firma: Dako; Cat-NR: S2022; Lot-NR: 00074952), bei Raumtemperatur 1h in der trockenen Kammer inkubieren.
- 9.) 3 mal 5 min. in Puffer waschen
- 10.) DAB-Färbung (Firma: BioGenex, Cat-NR: HK130-5K) nach Gebrauchsanweisung auftragen
- 11.) 3 mal 5 min. in Puffer waschen
- 12.) Kurz in Aqua dest. spülen
- 13.) 5 min. in Mayer's Hämatoxylin
- 14.) 10 min. mit Leitungswasser („bläuen“) und anschließend kurz in Aqua dest. spülen
- 15.) Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe. 50% Alk. für 3 min., 70% Alk. für 3 min., 80% Alk. für 3 min. und zweimal abs. Alk. für 5 min.
- 16.) 2 mal 10 min. in Xylol (Firma: Sigma Aldrich; Cat-NR: 16446-2,5L) gegeben
- 17.) Eindecken mit Entellan (Firma: Merck KGaA; Cat-NR: 1.07960.0500; Lot: HX887226) und mit Deckgläsern konservieren.

Tab. 2.2 Übersicht der verwendeten Marker der Immunhistologie

AK	Firma	Kat-NR LOT	Isotyp	Verdünnung	Spezifität	Puffer	Blocking	Cross-reactivity	Sek. AK
CD4 (Domain 1)	Se-rotec	MCA372G / 1204	mono IgG2a	1:1000	Mouse-a-Rat	Tris-NaCl	Peroxidase	Rat	Dako, P0161 Lot: 77715 (Mouse-a-R)
CD8 alpha	Se-rotec	MCA48R/ 1004	mono IgG1	1:1000	Mouse-a-Rat	Tris-NaCl	Peroxidase	Rat	Dako, P0161 Lot: 65051 (Mouse-a-R)
CD68	Se-rotec	MCA341R / 31208	mono IgG1	1:1500	Mouse-a-Rat	Tris-NaCl	Peroxidase	Rat	Dako, P0161 Lot: 65051 (Mouse-a-R)

TGF- β-1	Se- rotec	MCA797/ 111010	mono IgG1	1:500	Mouse- a- Human	Tris-NaCl	Peroxidase	Human, Rat, Mus- telid, Mink	Dako, P0161 Lot: 65051 (Mouse-a-R)
P4HB (Fib- robla- sten)	Acris	AF 5110- 1/	mono IgG1	1:500	Mouse- a-Rat	Tris-NaCl	Peroxidase	Rat	Dako, P0161 Lot: 77715 (Mouse-a-R)

Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte erfolgte mittels eines Olympus®-Mikroskop (Typ BX 51 TF Nr. Oc22834, Firma Olympus, Hamburg, Deutschland) und einer Olympus Digitalkamera (DP 71 Nr. 7E10977, Firma Olympus, Hamburg, Deutschland) sowie dem Programm cellSens_Dimensions (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland). Je Gruppe und Marker wurden 100 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 1:200 (1:400 für Fibroblasten) zufällig so ausgewählt, dass die Bindegewebskapsel 2/3 und die leere Implantattasche 1/3 der Fläche ausmachten. Die positiv gefärbten Zellen wurden nun manuell ausgezählt. Hierbei zählten nur solche Zellen als positiv, deren Zytoplasma/Zelloberfläche braun und ihr Zellkern erkennbar blauviolette gefärbt waren. Die Anzahl der positiven Zellen wurde für jedes Gesichtsfeld in einer Excel® Tabelle festgehalten.

2.8 quantitative-Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

Bei der aus mehreren Zyklen bestehenden PCR wird die cDNA einer Probe je Zyklus dupliziert, so dass eine exponentielle Vervielfältigung der DNA stattfindet. Hierfür benötigt man neben Desoxynukleotiden eine DNA-Polymerase, welche die Duplikationsreaktion katalysiert und einen Primer, der den zu duplizierenden Genabschnitt markiert. Um die in der Probe vorhandene Menge an mRNA zu quantifizieren wird bei der quantitativen Echtzeit-PCR (quantitativ-real-time-PCR, qRT-PCR) nach jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Die ermittelte Fluoreszenz des Zielgens wird in Relation auf ein konstantes Referenzgen (Housekeeping-Gene) bezogen. Da die Flu-

oreszenz proportional zur Menge an DNA ist, kann so eine relative Quantifizierung stattfinden.

Die gesamte RNA der Gewebeproben wurde mit TRIZOL (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Aus 1 µg der RNA wurde die cDNA synthetisiert. Dieser Schritt erfolgte mit dem ThermoScript RT-PCR-System (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Für die anschließende PCR-Reaktion wurde die GoTaq-Flexi-DNA-Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) benutzt. Um falsch positive Ergebnisse durch RNA- oder DNA-Kontamination zu vermeiden wurden mRNA-spezifische Primer verwendet. Für die Quantifizierung der untersuchten Gene wurde das unspezifische SYBRGreen®Premix (Eurogentec, Searing, Belgien) in einem Opticon2-Cycler (Biogard, München, Deutschland) verwendet. Die Temperatur betrug 55°C. Die Fluoreszenz wurde während aller Zyklen gemessen und als Standard-Kurve aufgezeichnet. In logarithmischer Darstellung ergab sich ein linearer Plot der Ct-Werte. Die synthetisierte DNA-Menge jeder Untersuchung wurde anhand der Standardkurve quantifiziert, als willkürliche Einheit angegeben und in Relation auf das Housekeeping-Gen (β -Aktin) bezogen.

Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt die Zykluszahl, ab der erstmalig eine Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrundrauschen abgegrenzt werden konnte. Er markiert auch den Start des exponentiellen Wachstums. Je mehr mRNA anfangs in der Probe vorhanden war, desto weniger Zyklen wurden gebraucht um den cycle threshold zu erreichen. Der ct-Wert ist somit umgekehrt proportional zur Anfangs vorhandenen RNA-Menge in der Probe.

Ct = cycle threshold des untersuchten Gens

Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen

$\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct KG – Δ Ct SG

Fold Change Ratio = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Folgende Primer wurden verwendet: P4HB (als Marker für Fibroblasten), Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, CD4, CD8, CD68, TGF- β 1, CTGF, FGF2, IL-6, TNF- α (Quiagen, Hilden, Deutschland).

2.9 Statistische Methoden

Die Analyse der gesammelten Daten erfolgte mit SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Science, IBM, Armonk, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test (auch: Whitney-Mann-Wilcoxon-Test, U-Test) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. Die Auswertung wurde vom Lehrstuhl für Mathematik VIII-Statistik der Universität Würzburg (Emil-Fischer-Str. 30, 97074 Würzburg) unterstützt.

2.10 Versuchsplanung

Der Versuchsaufbau richtete sich nach den Vorgaben der Europäischen Norm, EN ISO 10993-6:2007, mit dem Titel: „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 6: Prüfung auf lokale Effekte nach Implantation“. Der Versuchsablauf deckt sich mit den normativen Prüfverfahren für Implantate in subkutanem Gewebe. Mit der Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen, ihrer Genexpression und der Kapseldicke wird ein hohes Maß an Objektivität und Vergleichbarkeit gewährleistet.

Durch Berücksichtigung der europäischen Leitlinien können Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen besser verglichen werden. Des Weiteren soll die Umsetzung in ein Medizinprodukt in Zukunft auf einheitlichen Richtlinien basieren.

3. Ergebnisse

Während des Untersuchungszeitraumes schieden jeweils ein Tier der Gruppen SG-6 (14.07.2011) und SG-12 (19.09.2011) auf Grund eines kutanen Bindegewebetumors aus. Beide Tiere wurden autopsiert und jeweils Leber, Milz, Lymphknoten und periimplantäre Kapsel histopathologisch untersucht, wobei sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Tumors und dem Implantat oder seiner Beschichtung ergab. Zwischen In- und Explantation der restlichen Implantate lagen jeweils 3, 6 oder 12 Monate. Allgemein- und Ernährungszustand der Ratten waren über den gesamten Zeitraum unauffällig. Nach Entnahme der Implantate war bereits makroskopisch ein Unterschied in der Ausprägung der periimplantären Kapsel zwischen der SG und der Kontrollgruppe erkennbar (Abb. 3.1). Für die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden aus jeder Versuchsgruppe 10 Proben entnommen, die in jeweils 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop untersucht wurden. Kapselgewebe der Proben nach 3 und 12 Monaten wurden zusätzlich mittels qRT-PCR auf den mRNA Gehalt bestimmter Gene untersucht.

Mittels Chemilumineszenz wurden die explantierten Silikonimplantate auf verbleibende Seidenproteine untersucht. Hierbei konnten bis zu 12 Monate nach der Implantation noch Reste der Proteinbeschichtung nachgewiesen werden [102].

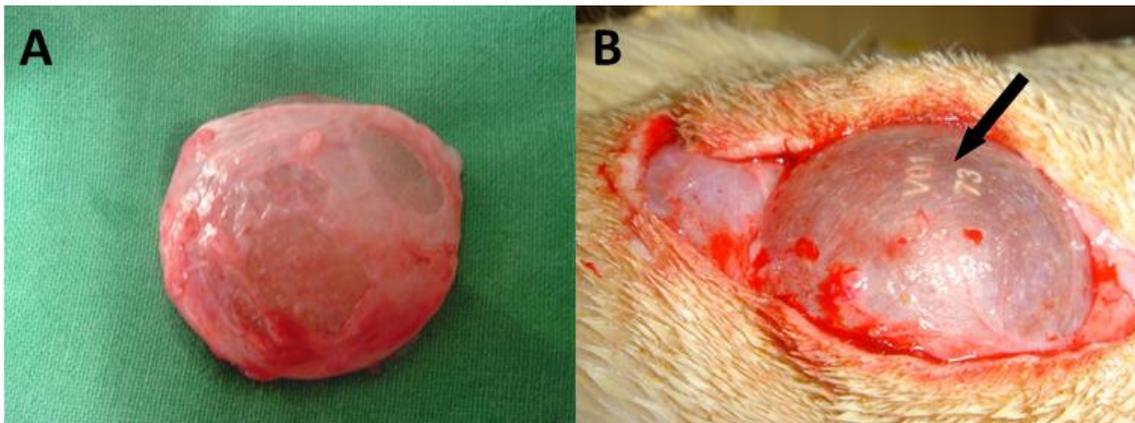


Abbildung 3.1 Beispiele für Implantate mit umgebender Kapsel 12 Monate nach Implantation. **A** Mit fibrinöser Kapsel überzogenes Implantat (ohne Seidenbeschichtung) **B** Seidenbeschichtetes Implantat. Bereits makroskopisch ist die dünner ausgeprägte Kapsel erkennbar (Pfeil) [102]
Die Nutzung der Abb. 3.1 erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag KG.

3.1 Histologische Untersuchung in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In allen Kapseln waren ein zweischichtiger Aufbau und eine chronische Entzündungsreaktion, jedoch keine Granulome oder eine synovia like metaplasia (SLM) erkennbar. In der Bindegewebskapsel um die Implantate der SG fanden sich weniger Zellkerne und eine homogenere, weniger komprimierte Kollagenstruktur mit parallel verlaufenden Fasern, während die Kollagenfasern in der KG stärker komprimiert waren und zum Teil auch multidirektional verliefen (Abbildung 3.2).

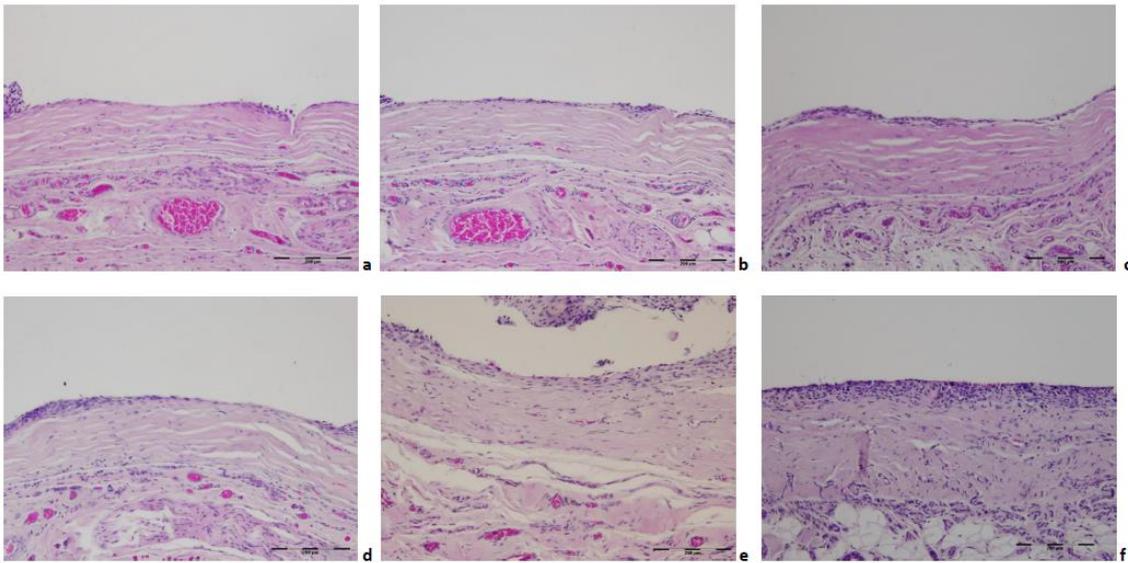


Abbildung 3.2 Querschnitte der Bindegewebskapsel in der HE-Färbung bei 100facher Vergrößerung. Der Messbalken entspricht 200µm. **a** SG-3, **b** SG-6, **c** SG-12, **d** KG-3, **e** KG-6, **f** KG-12. Das Implantat befand sich im oberen, jetzt freien Drittel der Abbildung. In der Mitte ist die Grenze zwischen Implantat und Bindegewebe zu erkennen. Im oberen Teil der Kapsel zeigt sich straffes Kollagen mit einer hohen Zellkerndichte. Weiter peripher (in der Abbildung weiter unten) lockert sich das Bindegewebe deutlich auf. Es sind zahlreiche Gefäßquerschnitte zu erkennen.

Tabelle 3.1 Kapseldicke in µm in der HE-Färbung

	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	P
3 Monate	175 (n=7)	12,9	126 (n=7)	12,6	<0,001*
6 Monate	190 (n=7)	8,9	154 (n=8)	12,2	<0,001*
12 Monate	205 (n=10)	16,7	168 (n=11)	10,8	<0,001*

Es wurden der Mann-Whitney-U-Test verwendet und die Dicke der Kapsel an der dünnsten Stelle im jeweiligen Gesichtsfeld gemessen. SD = Standardabweichung, p = P-Value, p ≤ 0,05 signifikant (*).

Die Kapseldicke war zu allen Untersuchungszeitpunkten in der SG signifikant geringer als in der KG (Tabelle 3.1). Betrachtet man die Entwicklung der Kapseldicke über den Zeitraum von 3,6 und 12 Monaten, zeigt sich ein stetes Wachstum, wobei die Zunahme in der KG steiler verlief und in beiden Gruppen in den ersten 3 Monaten am größten war (Abbildung 3.3).

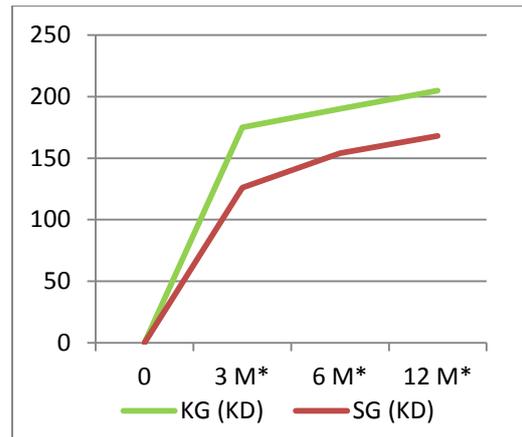


Abbildung 3.3 Kapseldicke in µm nach 3, 6 und 12 Monaten; Messpunkt mit signifikantem Unterschied (*)

3.2 Fibroblasten

Durch Anfärben des für Fibroblasten typischen Antigens Prolyl-4-hydroxylase-β (P4HB) und der Zellkerne ließen sich die Fibroblasten an ihrem braunen Zytoplasma und den blauen Zellkernen erkennen (Abb. 3.4).

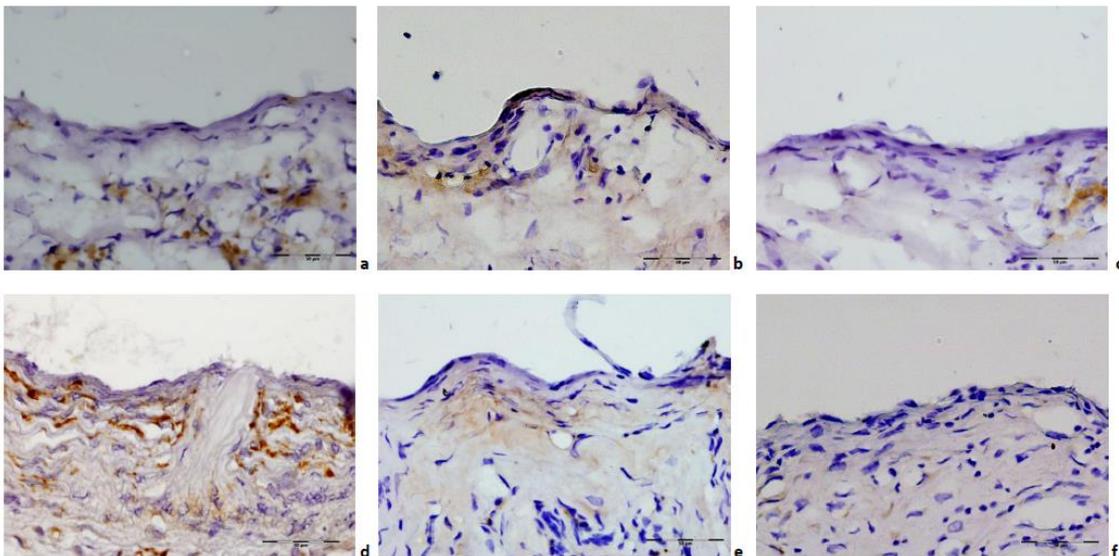


Abbildung 3.4 P4HB-positive Zellen in der Immunhistologie bei 400facher Vergrößerung. Der Messbalken entspricht 50µm. g a SG-3, b SG-6, c SG-12, d KG-3, e KG-6, f KG-12
Die Nutzung der Abb. 3.4 f erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag KG.

Tabelle 3.2 Anzahl der P4HB positiven Zellen in der immunhistologischen Untersuchung

Fibroblasten (P4HB)	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	p
3 Monate	52,2	4,34	26	1,55	<0,05*
6 Monate	10,25	2,7	4,92	0,88	<0,05*
12 Monate	8,97	3,14	4,6	1,14	<0,001*

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SD = Standardabweichung, p = P-Value, p ≤ 0,05 signifikant (*)

Tabelle 3.3 Expression von P4HB in der q-RT-PCR

P4HB - 3M	FB Ct	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	25,87	22,6	3,28	2,14	-2,41	5,31	<0,05 *
KG	22,55	21,68	0,87	1,1			
P4HB - 12M							
SG	20,35	20,6	-0,24	1,61	0,88	0,543	0,419
KG	17,76	17,12	0,64	0,53			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, $\Delta\Delta$ -Ct = Δ Ct SG – Δ Ct KG, Fold Change Ratio = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, p=P-Value; $p \leq 0,05$ signifikant (*)

Die absolute Zahl der Fibroblasten war in beiden Gruppen nach 3 Monaten am höchsten und nahm anschließend deutlich ab (Abbildung 3.5). Zwischen 6 und 12 Monaten änderte sich die Anzahl nur noch geringfügig. Zu allen drei Untersuchungszeitpunkten zeigten sich signifikant weniger Fibroblasten um die Implantate der SG (Tabelle 3.2).

Die qRT-PCR zeigte nach 3 Monaten eine signifikant verringerte Expression von P4HB (als Marker für Fibroblasten) (fold-change-ratio 5,31) in der SG gegenüber der KG. Nach 12 Monaten war kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar (Tabelle 3.3).

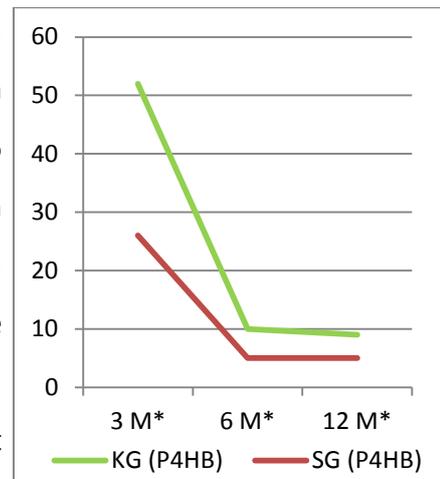


Abbildung 3.5 Anzahl der P4HB-positiven Zellen in der Immunhistologie nach 3, 6 und 12 Monaten. Messpunkt mit signifikantem Unterschied (*)

3.3 Kollagen

Die Auswertung der qRT-PCR ergab nach 3 Monaten eine signifikant geringere Expression von Kollagen 1 (fold-change-ratio 4,56) und 3 (fold-change-ratio 4,05). In der SG ließ sich die geringere Kollagen 1 Expression auch nach 12 Monaten noch nachweisen (fold-change-ratio 1,82), während für Kollagen 3 zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar war (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4 Kollagenexpression in der q-RT-PCR

Kollagen1 - 3M	col-1 Ct	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	22,26	19,95	2,31	1,42	-2,19	4,56	<0,05 *
KG	21,8	21,68	0,12	1,77			
Kollagen1 - 12M							
SG	20,82	20,6	0,21	1,34	-0,86	1,81	<0,05 *
KG	16,47	17,12	-0,65	0,77			

Kollagen3 - 3M	col-3 Ct	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	22,59	19,95	2,64	1,71	-2,02	4,05	<0,05 *
KG	22,31	21,68	0,62	1,46			
Kollagen3 - 12M							
SG	20,56	19,99	0,52	1,02	-0,55	1,464	0,168
KG	17,65	17,73	-0,03	0,59			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct SG – Δ Ct KG, Fold Change Ratio = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, p=P-Value; p \leq 0,05 signifikant (*)

3.4 Makrophagen

Durch die Färbung des für Makrophagen typischen Antigens CD68 ließen sich diese an ihrem braunen Zytoplasma und den blauen Zellkernen erkennen (Abb. 3.6)

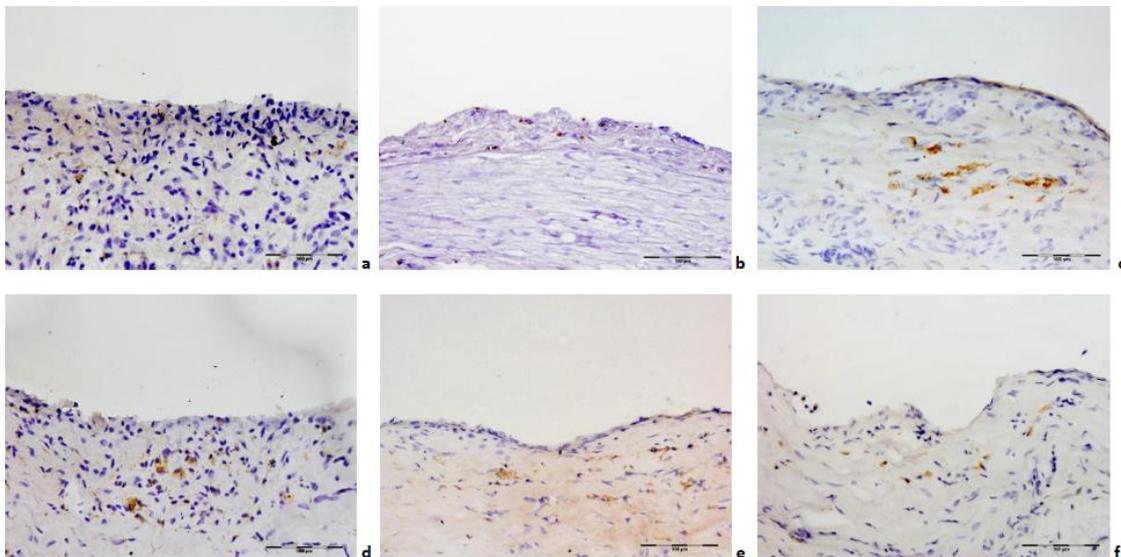


Abbildung 3.6 CD68 positive Zellen in der Immunhistologie bei 200facher Vergrößerung. Der Messbalken entspricht 100 μ m. **a** SG-3, **b** SG-6, **c** SG-12, **d** KG-3, **e** KG-6, **f** KG-12

Die Nutzung der Abb. 3.6 c erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag KG.

Tabelle 3.5 Anzahl der CD 68 positiven Zellen in der immunhistologischen Untersuchung

Makrophagen (CD 68)	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	p
3 Monate	16,34	3,09	4,44	0,59	<0,001*
6 Monate	16,07	3,34	12,55	1,86	<0,05*
12 Monate	14,71	2,73	15,33	4,49	0,7393

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SD = Standardabweichung, p = P-Value, p≤0,05 signifikant (*)

Tabelle 3.6 Expression des Antigens CD68 in der q-RT-PCR

CD68 - 3M	CD68 Ct	β-Actin Ct	ΔCt	SD	ΔΔCt	Fold Diff.	p
SG	25,86	20,23	5,62	1,48	0,45	0,73	0,8125
KG	27,19	21,11	6,07	1,92			
CD68 - 12M							
SG	24,23	20,6	3,66	1,06	-0,3	1,23	0,201
KG	20,67	17,32	3,36	1,15			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, ΔCt = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, ΔΔCt = ΔCt SG – ΔCt KG, Fold Change Ratio = 2^(-ΔΔCt), p=P-Value; p≤0,05 signifikant (*)

Die Anzahl der Makrophagen erreichte in der KG bereits nach 3 Monaten ihr Maximum und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem hohen Niveau relativ konstant, während sie in der SG zwischen 3 und 6 Monaten deutlich zunahm und erst nach 12 Monaten das Niveau der KG erreichte (Abb. 3.7). Entsprechend zeigte sich eine signifikant geringere Makrophagenanzahl in der SG nach 3 und 6 Monaten. Nach 12 Monaten war dieser Unterschied nicht mehr erkennbar (Tabelle 3.5). In der Auswertung der qRT-PCR zeigte sich kein Unterschied in der Expression ihres Oberflächenantigens CD 68 (Tabelle 3.6).

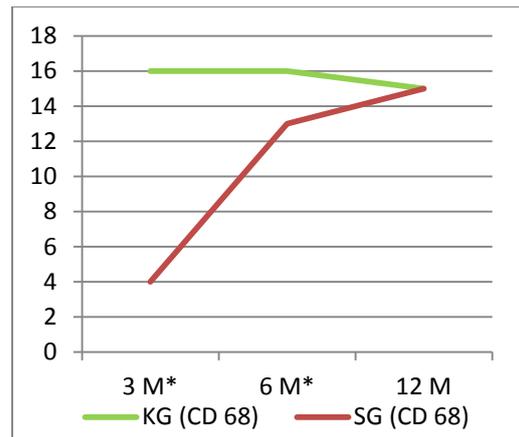


Abbildung 3.7 Anzahl CD68-positiver Zellen in der Immunhistologie bei 3,6 und 12 Monaten. Messpunkt mit signifikantem Unterschied (*)

3.5 TGF- β -Signalweg

Durch das Anfärben von TGF- β ließen sich Zellen, welche TGF- β intrazellulär speichern an ihren blauen Zellkernen und dem braunen Zytoplasma erkennen (Abb. 3.9). Bei ihnen war ebenfalls ein Anstieg in den ersten 6 Monaten zu beobachten, welcher in der SG weniger steil verlief und ein geringeres Maximum erreichte (Abb. 3.8). Zwischen 6 und 12 Monaten viel die Anzahl in beiden Gruppen wieder ab.

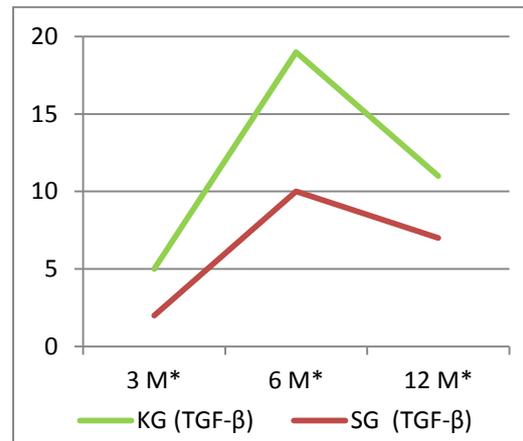


Abbildung 3.8 Anzahl TGF- β -positiver Zellen in der Immunhistologie bei 3,6 und 12 Monaten. Messpunkt mit *signifikantem Unterschied (*)*

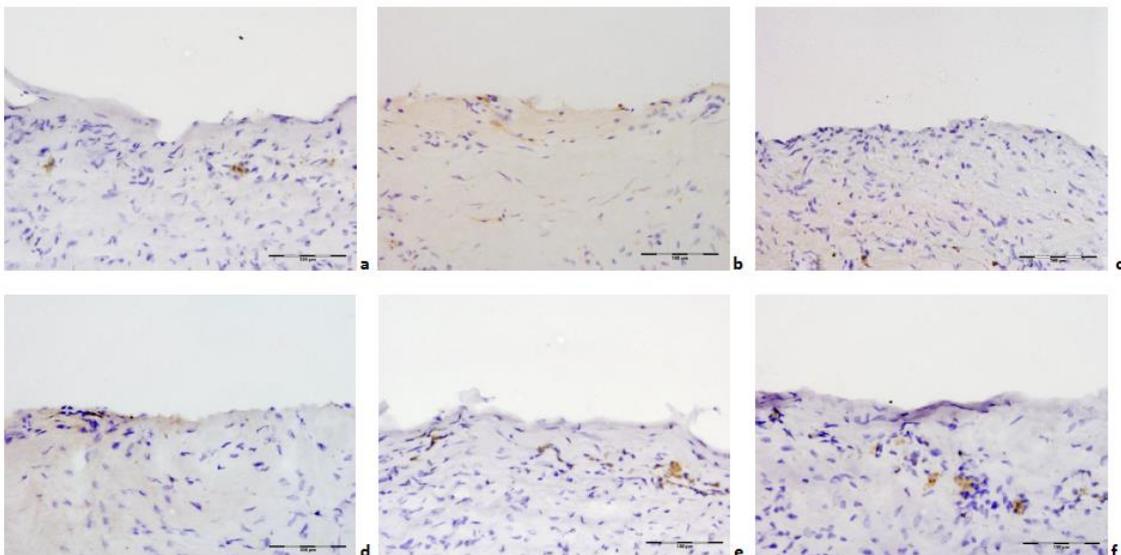


Abbildung 3.9 TGF- β positive Zellen in der Immunhistologie bei 200facher Vergrößerung. Der Messballen entspricht 100 μ m. **a** SG-3, **b** SG-6, **c** SG-12, **d** KG-3, **e** KG-6, **f** KG-12

Entsprechend fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant weniger TGF- β -positive Zellen um die Implantate der SG (Tab. 3.7). Auch die Gen-Expression für TGF- β war in der SG signifikant niedriger als in der KG (fold-change-ratio 14,62 für 3M und 2,9 für 12M). Die Expression der nachgeschalteten Wachstumsfaktoren FGF-2 (fold-change-ratio 11,31) und CTGF (fold-change-ratio 7,72) war nach 3 Monaten ebenfalls erniedrigt, während nach 12 Monaten jedoch kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen war (Tab. 3.8).

Tabelle 3.7 Anzahl der TGF- β positiven Zellen in der immunhistologischen Untersuchung

TGF- β	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	p
3 Monate	5,05	0,62	2,2	0,37	<0,001*
6 Monate	19,03	3,38	9,63	2,66	<0,001*
12 Monate	11,07	2,52	6,55	2,40	<0,05*

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SD = Standardabweichung, p = P-Value, $p \leq 0,05$ signifikant (*),

Tabelle 3.8 Expression der Wachstumsfaktoren TGF- β -1, CTGF und FGF-2 in der q-RT-PCR

TGF- β - 3M	TGF- β 1 Ct	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	28,55	19,95	8,58	2,52	-3,87	14,62	<0,05 *
KG	26,39	21,68	4,71	0,58			
TGF-β - 12M							
SG	25,06	20,34	4,74	1,76	-1,54	2,9	<0,05 *
KG	20,33	17,12	3,2	0,38			
CTGF - 3M							
SG	29,34	20,15	9,19	1,58	-2,95	7,72	<0,05 *
KG	29,05	22,8	6,24	0,88			
CTGF - 12M							
SG	25,26	19,95	5,31	1,71	-0,72	1,64	0,294
KG	23,53	18,93	4,59	0,63			
FGF2 - 3M							
SG	32,13	20,15	11,98	2	-3,5	11,31	<0,05 *
KG	31,29	22,8	8,48	2,44			
FGF2 - 12M							
SG	24,8	19,95	4,85	2,06	0,13	0,91	1
KG	23,92	18,93	4,98	1,28			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct SG – Δ Ct KG, Fold Change Ratio = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, p=P-Value; $p \leq 0,05$ signifikant (*)

3.6 Lymphozyten

Durch Anfärben der Oberflächenantigene CD4 bzw. CD8 und der Zellkerne, konnten die Lymphozyten an ihren blauen Zellkernen und dem braunen Zytoplasma erkannt werden (Abb. 3.10 und 3.11).

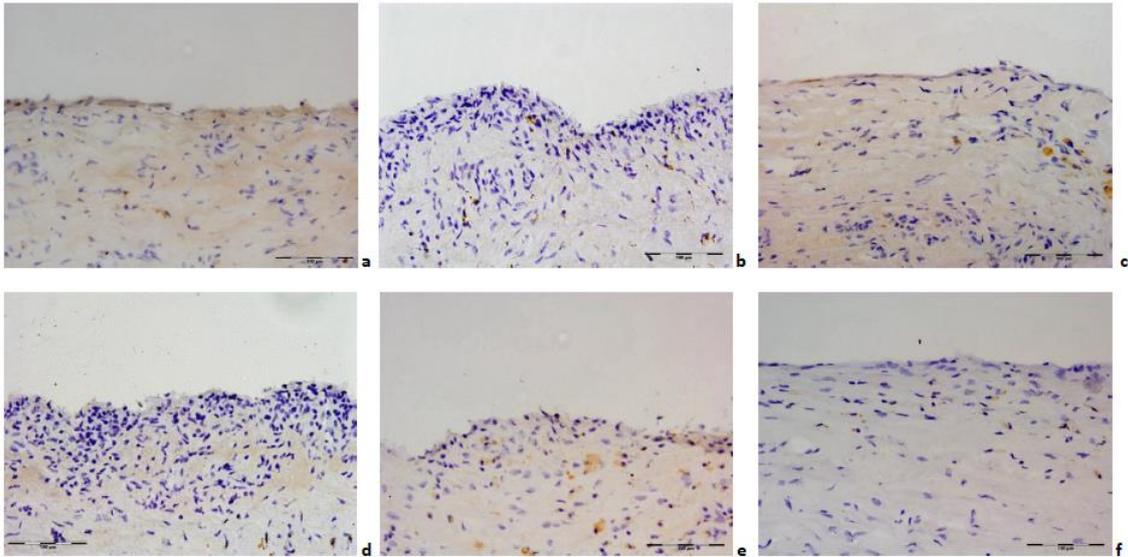


Abbildung 3.10 CD4 positive Zellen in der Immunhistologie bei 200facher Vergrößerung. Der Messbalken entspricht 100µm. **a** SG-3, **b** SG-6, **c** SG-12, **d** KG-3, **e** KG-6, **f** KG-12
Die Nutzung der Abb. 3.10 f erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag KG.

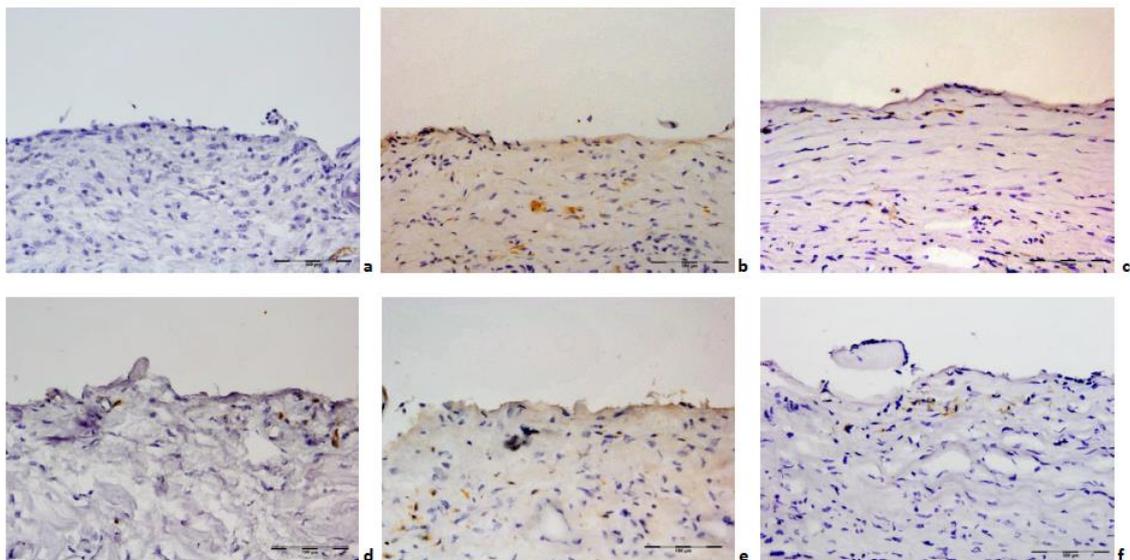


Abbildung 3.11 CD8 positive Zellen in der Immunhistologie bei 200facher Vergrößerung. Der Messbalken entspricht 100µm. **a** SG-3, **b** SG-6, **c** SG-12, **d** KG-3, **e** KG-6, **f** KG-12

Tabelle 3.9 Anzahl der CD 4 bzw. CD 8 positiven Zellen in der immunhistologischen Untersuchung

CD 4	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	p
3 Monate	4,47	0,94	2,59	0,91	<0,05*
6 Monate	27,02	5,61	9,98	2,92	<0,001*
12 Monate	16,36	3,92	9,59	2,67	<0,001*
CD 8	Kontrollgruppe	SD	Versuchsgruppe	SD	P
3 Monate	6,34	0,95	2,4	0,75	<0,001*
6 Monate	16,74	3,53	9,8	2,27	<0,05*
12 Monate	9,54	1,82	10,41	1,67	0,3834

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SD = Standardabweichung, p = P-Value, $p \leq 0,05$ signifikant (*),

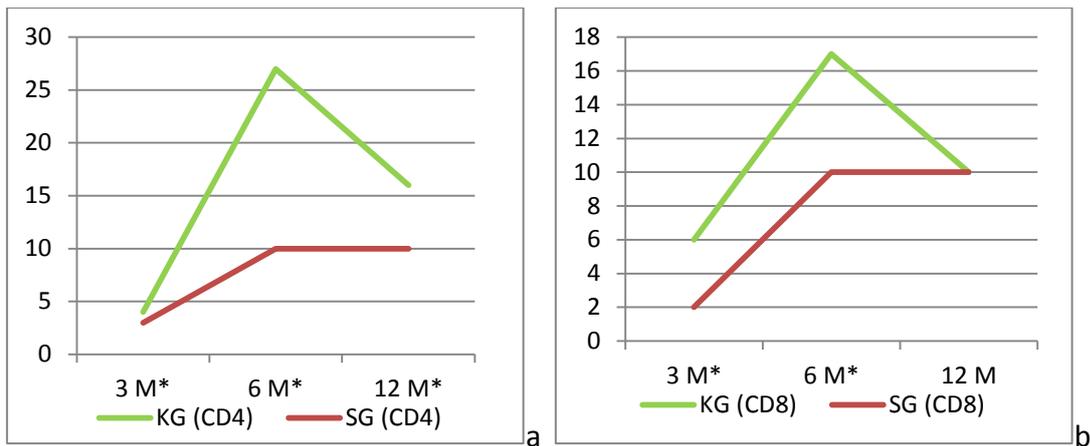


Abbildung 3.12 Die Anzahl (a) CD4- und (b) CD8- positiver Lymphozyten in der Immunhistologie bei 3,6 und 12 Monaten. Messpunkt mit signifikantem Unterschied (*)

Tabelle 3.10 Expression der Antigene CD4 und CD8 in der q-RT-PCR

CD4 - 3M	CD 4 Ct	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	28,42	20,23	8,18	0,99	0,75	0,59	0,4966
KG	30,61	21,68	8,93	1,87			
CD4 - 12M							
SG	24,13	20,92	3,3	1,39	0,05	0,96	0,829
KG	22,12	18,93	3,35	0,8			
CD8 - 3M							
SG	31,47	20,51	10,95	0,47	-0,33	1,25	0,4078
KG	33,23	22,6	10,62	1,07			
CD8 - 12M							
SG	28,41	18,07	10,33	1,77	-0,06	1,04	0,926
KG	25,48	15,21	10,27	0,83			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct SG – Δ Ct KG, Fold Change Ratio = $2^{(-\Delta\Delta$ Ct)}, p=P-Value; $p \leq 0,05$ signifikant (*)

Auch bei der Anzahl der CD4+ und CD8+ positiven Lymphozyten konnte man einen Anstieg in den ersten 6 Monaten erkennen. Dieser hatte in der SG ein geringeres Maximum und verlief weniger steil. Nach 12 Monaten fiel die Anzahl in der KG wieder ab, während sie in der SG auf einem konstanten Level blieb, wodurch sich die Unterschiede in beiden Gruppen relativierten (Abb.3.12). Die Anzahl der CD4+ Zellen war, trotz Annäherung der Werte nach 12 Monaten, über den gesamten Untersuchungszeitraum in der SG signifikant geringer als in der KG. Die der CD8+ Zellen fiel nach 3 und 6 Monaten in der SG signifikant niedriger aus, während nach 12 Monaten kein Unterschied mehr feststellbar war (Tab. 3.9). In der Expression der Gene CD4 und CD8 zeigte sich

über den gesamten Untersuchungszeitraum kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Tab. 3.10).

Das Verhältnis CD4 zu CD8 positiver Zellen blieb in der SG annähernd konstant, während es in der KG zwischen 3 und 6 Monaten stark anstieg, so dass es in der SG nach 3 Monaten signifikant höher, nach 6 und 12 Monaten aber signifikant niedriger als in der KG war (Abb. 3.13).

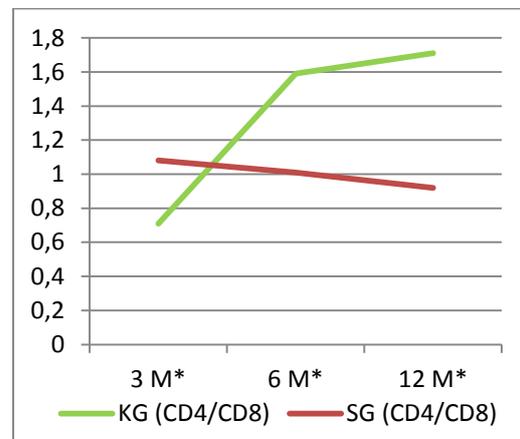


Abbildung 3.13 Ratio CD4+ Zellen/CD8+ Zellen, Messpunkt mit signifikantem Unterschied (*)

3.7 Inflammatorische Zytokine

Die Auswertung der qRT-PCR ergab nach 3 Monaten eine signifikant geringere Expression der Zytokine TNF- α (fold change ratio 13,26) und IL-6 (fold change ratio 4,14). Dieser Unterschied ließ sich nach 12 Monaten nicht mehr nachweisen (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 Expression der Zytokine TNF- α und IL-6 in der q-RT-PCR

TNF- α - 3M	TNF- α	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p
SG	33,49	20,29	13,19	2,67	-3,73	13,26	<0,05 *
KG	32,33	22,86	9,46	1,88			
TNF- α - 12M							
SG	30,52	22,72	7,8	2,52	-1,4	2,63	0,126
KG	26,9	20,4	6,4	0,61			
IL-6 - 3M							
IL-6	β -Actin Ct	Δ Ct	SD	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Diff.	p	
SG	33,78	20,29	13,48	0,96	-2,05	4,14	<0,05 *
KG	34,3	22,86	11,43	1,33			
IL-6 - 12M							
SG	30,4	20,34	10,17	2,35	-1	2	0,975
KG	27,37	18,27	9,17	1,29			

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. SG = Spinnenseidengruppe, KG = Kontrollgruppe, Ct = Fluoreszenz der Probe, Δ Ct = Ct Zielgen – Ct Referenzgen, $\Delta\Delta$ -Ct = Δ Ct SG – Δ Ct KG, Fold Change Ratio = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, p=P-Value; p<0,05 signifikant (*)

4. Diskussion

4.1 Die Kapselkontraktur

Die Inzidenz der Kapselkontraktur wird in der Literatur je nach Studie zwischen 1,3% und 27% angegeben [9-11]. Die publizierten Ergebnisse sind dabei stark vom Beobachtungszeitraum, dem als Kontraktur gewerteten Grad in der Klassifikation nach Baker und der subjektiven Einteilung durch den Untersucher abhängig. Die von Handel et al. in ihrer Langzeitstudie festgestellte Inzidenz von 14% über 15 Jahre ermöglicht eine grobe Einschätzung des Risikos [12]. Etwa die Hälfte aller Kapselkontrakturen tritt in den ersten 12 Monaten nach Implantation auf [9, 14, 15]. Weltweit wurden 2015 ca. 1,5 Millionen Brustimplantate implantiert [8], wobei die Kapselkontraktur einen der häufigsten Revisionsgründe bei der Verwendung von Silikonimplantaten darstellt [9-11]. Eine Verbesserung ihrer Biokompatibilität würde einen wichtigen Zugewinn für die plastische Chirurgie darstellen.

Die Pathogenese der Kapselkontraktur wird als dynamischer, mit einer überschießenden Entzündungsreaktion und Fibrosierung einhergehender Prozess verstanden [11, 15]. Hierbei spielt die Oberflächenbeschaffenheit des Implantates eine entscheidende Rolle. So konnte durch PU-Beschichtung oder Texturierung ein besseres Einwachsen ermöglicht werden [23, 80]. Mittels Hemmung der Entzündungsreaktion durch Sterilisationsverfahren, Leukotrien-Antagonisten oder Pirfenidon konnte eine Reduktion der Fibrosierung erreicht werden [76, 78, 103]. Auf zellulärer Ebene sind eine Hemmung der Fibroblasten durch eine 5-FU- und der Makrophagen durch eine Phosphorylcholinbeschichtung beobachtet worden [84, 91]. Einen weiteren, vielversprechenden Ansatzpunkt stellt die Hemmung des TGF- β -Signalweges dar [85, 90].

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Verträglichkeit von Silikonimplantaten durch eine passende Oberflächenmodifikation entscheidend verbessert werden kann.

4.2 Klassifikation und Beurteilung

Die 1974 von Wilflingseder et al. eingeführte Klassifikation dient heute als Grundlage zur Beurteilung der Kapselkontraktur. Sie orientiert sich an histologischen Gesichtspunkten und korreliert mit der klinischen Klassifikation nach Baker [7, 72]. Später wur-

den die ursprünglichen Parameter Kapseldicke, die Anzahl der Zellschichten, die Kollagenausrichtung und die Gewebeeinfiltration um die Betrachtung von Entzündungszellen erweitert [40]. Bei unseren Untersuchungen orientierten wir uns an dem von Bergman et al. modifizierten Wilflingseder-Score, welcher zusätzlich die Dicke der Synovia-like-Metaplasie (SLM) und die Anzahl von Histo-, Lympho- und Granulozyten beinhaltet (s. Kap. 1.3) [40].

Da der Wilflingseder-Score zur Beurteilung der periimplantären Kapsel bei Brustimplantaten des Menschen entwickelt wurde, ist er nicht direkt auf das Rattenmodell übertragbar. In unserer Versuchsreihe waren die Kapseldicken aller Versuchsgruppen durchschnittlich kleiner als 1 mm, so dass hier keine Differenzierung nach dem Wilflingseder-Score stattfinden konnte. In der KG fanden sich durchwegs zweischichtige Zellreihen, parallel und zum Teil multidirektional verlaufende Kollagenbündel, eine Infiltration mit Histo- und Lymphozyten, jedoch keine Granulome und keine SLM. Dies entspräche, abgesehen von der Kapseldicke und dem Fehlen einer SLM, einer Klassifikation als Grad II. Die Einteilung der Proben der SG war nicht eindeutig. Für eine Einteilung in Grad I sprachen die parallel verlaufenden Kollagenbündel und das Fehlen einer SLM; für Grad II hingegen das Vorhandensein zweier Zellschichten und das Auftreten von Histo- und Lymphozyten. Das Fehlen von Granulomen erlaubte keine Differenzierung zwischen den Graden I und II.

Da der Wilflingseder-Score eine grobe Einteilung vornimmt und sich nicht eindeutig auf unsere Ergebnisse anwenden lässt, konnte mit ihm alleine ein Unterschied der beiden Versuchsgruppen nicht sicher belegt werden. Aus diesem Grund führten wir eine quantifizierte Betrachtung der Elemente Kollagen, Histozyten und Lymphozyten und weiterer, die Entzündung und Fibrose betreffender Parameter, durch.

4.3 Kapseldicke

Architektur und Dicke der Bindegewebskapsel stellen einen wichtigen Risikofaktor der Kapselkontraktur dar [18, 40]. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Kapseldicke, war zu erkennen, dass sie in den ersten 3 Monaten bereits 75% bis 85% der Dicke nach 12 Monaten besaß. Dies kann man als Teil des Wundheilungsprozesses auffassen, welcher besonders in den ersten Monaten abläuft [62]. Auch passt die zu an-

fangs sehr hohe, fibrotische Aktivität zu dem erhöhten Kontrakturrisiko in den ersten 12 Monaten [11, 14, 15].

Die Kapseldicke lässt sich gut objektiv vergleichen. Sie lag bei uns in allen Versuchsgruppen deutlich unterhalb der Grenze zwischen Wilflingseder I und II. Da wir im Rattenmodell andere Größenverhältnisse als beim Menschen haben, kann man diese jedoch nur bedingt mit dem Wilflingseder-Score vergleichen. Die zu allen Messzeitpunkten dünnere Kapsel in der SG Gruppe ($p < 0,001$) ist Ausdruck einer geringeren Fibrosierung und deutet auf ein geringeres Risiko zur Kontrakturbildung hin [11, 15, 18].

4.4 Fibrosierung

Die überschießende Fibrosierung ist ebenfalls ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Kapselkontraktur [6, 9, 15]. Neben der Kapseldicke lässt sich diese auch an einer verstärkten Fibroblastenaktivität erkennen [31]. Bereits im ursprünglichen Score von 1974 wurde die Anordnung der Kollagenfasern von Wilflingseder untersucht. In der KG fanden sich die Kollagenlagen subjektiv deutlich stärker komprimiert als in der SG (s. Abb. 3.2). Dies kann ebenfalls einen Hinweis auf eine erhöhte Kontrakturgefahr in dieser Gruppe darstellen. Da die Beurteilung, inwieweit die Fasern parallel oder multidirektional liegen, jedoch vom Untersucher abhängig ist und nur einen eingeschränkten Grad der Differenzierung zulässt, bestimmten wir zur besseren Vergleichbarkeit die Expression von P4HB (als Marker für Fibroblasten) und der Kollagene 1 und 3. Die absolute Zahl der Fibroblasten ließ sich immunhistochemisch über ein Anfärben von P4HB-positiven Zellen darstellen.

Das Maximum der Fibroblastenzahl zum ersten Messzeitpunkt und ihr massiver Abfall nach 6 Monaten lassen sich gut mit dem starken Kapselwachstum in dieser Zeit und dem eher moderaten Wachstum nach 6 Monaten vereinbaren. Ebenfalls fielen die Expression von Kollagen und P4HB nach 6 Monaten deutlich ab. Diese Beobachtungen zeigen, dass die ersten Monate für die Entstehung der Kapsel entscheidend sind. Dieser Zeitraum scheint auch für die Entstehung der Kapselkontraktur besonders relevant zu sein [11, 14, 15]. Die deutlich geringere Konzentration von Fibroblasten im perikapsulären Gewebe nach 6 Monaten kann mit der beginnenden Umwandlung zu Myofibroblasten erklärt werden [62]. Trotz des Rückgangs der absoluten Anzahl, fanden

sich um die beschichteten Implantate zu allen Messzeitpunkten signifikant weniger Fibroblasten. Gleichzeitig fiel auch die Expression von P4HB dieser Gruppe in der 3-Montasmessung signifikant niedriger aus, was ebenfalls auf eine eingeschränkte Fibroblastenaktivität in dieser Zeit hinweist. Diese geringere Aktivität ist möglicherweise auf eine geringere Aktivierung des TGF- β Signalweges und eine niedrigere Aktivität von TNF- α in diesem Zeitraum zurückzuführen (s.u.) [53, 62]. Da die Kontraktur mit einer verstärkten Fibroblastenaktivität in Zusammenhang steht, lassen diese Ergebnisse eine geringere Kontraktur neigung der SG vermuten [31].

Die Kollagen 1 und 3 sind ein zentraler Bestandteil der sich bildenden Bindegewebskapsel [15]. Ihre signifikant geringere Genexpression in der SG lässt sich ebenfalls als Zeichen der geringeren Fibrosierung in dieser Gruppe sehen. Die reduzierte Fibroblastenzahl und Expression der Gene für P4HB und Kollagen 1 und 3 führten anscheinend zu einer milder verlaufenden Fibrosierung und somit zu der bereits beobachteten dünneren Bindegewebskapsel um die beschichteten Implantate.

4.5 Histiozyten

Der Wilflingseder-Score erlaubt durch die semiquantitative Bestimmung der Histiozyten nur eine grobe Einteilung. Um eine präzisere Einordnung vornehmen zu können, bestimmten wir die Anzahl an Makrophagen und TGF- β speichernden Zellen sowie die Genexpression für TGF- β , die zwei ihm nachgeschalteten Wachstumsfaktoren CTGF und FGF und das Oberflächenantigen CD68 quantitativ. Letzteres wird hauptsächlich von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen getragen [57, 58]. Durch das Ermitteln der CD68 positiven Zellen lässt sich die Makrophagenanzahl und durch die Quantifizierung der mRNA für CD68 deren Genexpression abschätzen.

Makrophagen sind ein zentraler Mediator der Wundheilung und beeinflussen das Verhalten anderer an ihr beteiligter Zellen [44, 48]. Im Wilflingseder-Score stellt ihr Auftreten ein Kriterium für eine Einordnung in einen höheren Kontrakturgrad dar [73]. Ihre geringe Anzahl in der SG kann daher als Hinweis auf eine höhere Kontraktur neigung oder –Ausprägung der KG gegenüber der SG gesehen werden.

Makrophagen sezernieren unter anderem TGF- β , TNF- α und IL-6 und stimulieren das Einwandern weiterer Makrophagen und Fibroblasten [44, 48]. Dies legt den Schluss

nahe, dass die geringere Zellzahl und Genexpression dieser Parameter in der SG eine Folge der niedrigeren Makrophageninvasion darstellt. Die sowohl nach 3, als auch nach 6 Monaten signifikant geringere Anzahl CD68 positiver Zellen im Gewebe um beschichtete Implantate ist, unter diesen Gesichtspunkten, gut mit der geringeren Fibroblastenzahl, der abgeschwächten Fibrosierung und dem langsameren Kapselwachstum (s.o.) in dieser Gruppe vereinbar. Gleichzeitig scheint es in der Genexpression von CD68 keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen zu geben. Eine mögliche Ursache für die geringere Makrophagenanzahl kann in einer gehemmten Invasion gesehen werden. Dieser Effekt scheint sich jedoch nach 12 Monaten zu relativieren.

Sowohl die Expression des Wachstumsfaktors TGF- β , als auch die absolute Anzahl an Zellen, welchen ihn speichern oder synthetisieren, waren zu jedem Messzeitpunkt in der SG signifikant vermindert. Die geringere Makrophagenanzahl in der SG ist vermutlich sowohl Ursache als auch Folge der geringeren Aktivierung von TGF- β . Neben der Makrophageninvasion und Proliferation stimuliert TGF- β direkt [104] und indirekt über FGF-2 [63] und CTGF [67] die Kollagensynthese in den Fibroblasten. Da von einer engen Korrelation zwischen CTGF und Fibrose auszugehen ist, lässt seine verringerte Aktivität in der SG ebenfalls eine reduzierte Fibrose erwarten [67, 68]. Eine Suppression des TGF- β -Signalweges wirkt somit der Fibrosierung entgegen [85, 90]. Die oben bereits dargestellte, geringere Fibroblastenzahl, sowie ihre niedrigere Kollagenexpression können als Folge einer geringeren Aktivierung des TGF- β und seiner nachgeschalteten Wachstumsfaktoren verstanden werden. Da FGF-2 neben der Fibroblastenaktivität auch deren Fähigkeit zur Wundkontraktion stimuliert, lässt seine verringerte Expression eine geringere Kontraktionsfähigkeit und –neigung der entstehenden Kapsel vermuten [67]. In beiden Gruppen fiel die Anzahl der TGF- β positiven Zellen nach 6 Monaten deutlich ab, was auf einen Rückgang der Fibrosierung und des Wundheilungsprozesses hindeutet. Die auch nach 12 Monaten noch bestehende Reduktion der TGF- β positiven Zellen und der TGF- β -Expression in der SG lassen eine reduzierte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs über 12 Monate hinaus erwarten.

4.6 Lymphozyten und Entzündungsmediatoren

Die Anwesenheit von Lymphozyten wird im erweiterten Wilflingseder-Score nach Bergman et al. betrachtet. Da sich in allen Proben CD4⁺- und CD8⁺- Lymphozyten fanden, untersuchten wir ihre Anzahl und Genexpression quantitativ um eine bessere Differenzierbarkeit zu erreichen. Zusätzlich bestimmten wir die Expression von IL-6 und TNF- α .

Entsprechend einer zu erwartenden Entzündungsreaktion nahm die Anzahl der Lymphozyten 3 und 6 Monate nach der Operation und Implantation zunächst deutlich zu, was der postoperativen Inflammation um das Implantat entsprach. Der steilere Verlauf des Zuwachses in der KG und die signifikant höhere Konzentration an Lymphozyten sind Ausdruck einer stärkeren Entzündungsreaktion und somit als Risikofaktor für die Entstehung einer Kapselkontraktur zu sehen [6, 9, 15]. Während die Konzentration der Lymphozyten in der KG nach 12 Monaten deutlich sank und zumindest die der CD8⁺-Lymphozyten auf das Niveau der SG abfiel, blieb sie in der SG zwischen 6 und 12 Monaten annähernd konstant. Trotz unterschiedlicher Lymphozytenanzahl in den beiden Gruppen war die Expression der jeweiligen Oberflächenantigene (CD4 und CD8) in beiden Gruppen annähernd gleich. Als Ursache für den geringen Zuwachs an Lymphozyten in der SG kann eine gehemmte Immigration, welche sich wiederum auf eine geringere Anzahl an Makrophagen und verminderte Expression von TGF- β zurückführen lässt, vermutet werden [43, 44].

Das Verhältnis von CD4⁺- zu CD8⁺- Lymphozyten kann einen Hinweis auf die Aktivität des Wundheilungsprozesses geben[49]. Während sich die CD4⁺/CD8⁺-Ratio der Kontrollgruppe zwischen 3 und 6 Monaten verdoppelte, fiel sie in der SG konstant ab (s. Abb. 3.13). Dies deutet bei gleichzeitigem Anstieg der CD8⁺- Lymphozyten auf einen früheren Abschluss der Wundheilungsreaktion in der Gruppe mit beschichteten Implantaten hin[49].

Makrophagen stellen eine Hauptquelle für IL-6 und TNF- α dar [44]. Ihre gehemmte Invasion in der SG ist eine mögliche Ursache für das geringere Ausmaß der Expression von IL-6- und TNF- α in dieser Gruppe. Da IL-6 und TNF- α , im Gegensatz zu TGF- β , Teil der Akute-Phase-Reaktion sind, ist nach 3 Monaten der deutlichste Unterschied und

nach 12 Monaten eine Relativierung zu erwarten [50]. Dies bestätigte sich in unseren Untersuchungsergebnissen. Beide stimulieren sowohl Lymphozyten, als auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, weswegen ihre reduzierte Expression in der SG als Zeichen einer schwächer verlaufende Inflammation zu sehen ist [51, 52]. Neben der Inflammation verstärkt TNF- α auch die Fibroblastenproliferation, weshalb eine Hemmung der TNF- α Expression auch eine geringeren Fibrosierung erwarten lässt [53]. Da TGF- β ebenfalls positiv auf die Inflammation wirkt, muss wiederum seine Suppression auch als Ursache der schwächer verlaufenden Inflammation in der SG in Betracht gezogen werden [85, 90].

4.7 Schlussfolgerung

Durch die Quantifizierung und Ergänzung der Parameter des Wilflingseder-Score kann eine ausreichend differenzierte Betrachtung der beiden Gruppen vorgenommen werden. Im Bereich der Anzahl der Zelllagen, der Anordnung der Kollagenbündel, der Anzahl der Granulome und dem Auftreten einer SLM (ihr Fehlen ist Ausdruck der grundsätzlich guten Verträglichkeit beider Gruppen) konnten keine eindeutigen und objektiverbaren Unterschiede festgestellt werden. Jedoch fand sich in der SG eine deutlich reduzierte Kapseldicke. Neben der reinen Anzahl der Histiozyten war auch ihre Expression der Wachstumsfaktoren TGF- β , CTGF und FGF-2 reduziert. Ebenso fielen die Anzahl der Lymphozyten und zusätzlich die Genexpression von TNF- α und IL-6 in der SG signifikant geringer aus. Zusätzlich fanden sich eine reduzierte Fibroblastenzahl und -aktivität sowie eine verminderte Expression von Kollagen 1 und 3 was eine geringere Kapseldicke zur Folge hatte. Diese Ergebnisse zeigen einen geringeren Kapselgrad in der SG (Grad I bis II) gegenüber der KG (Grad II), wobei der Unterschied keinem vollen Grad nach Wilflingseder entspricht.

Die geringere Anzahl an Lymphozyten und reduzierte Expression proinflammatorischer Zytokine können als Zeichen einer schwächeren Inflammation gewertet werden. Die geringere Aktivität der Fibroblasten, die reduzierte Kollagenexpression, die geringere Kapseldicke aber auch eine geringere Makrophageninvasion und Aktivierung des TGF- β -Signalweges (inklusive CTGF und FGF-2) sind Zeichen einer geringeren Fibrosie-

rung. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse lässt sich die H0-Hypothese zugunsten der H1-Hypothese verwerfen:

Eine Beschichtung der Silikonoberfläche mit eADF4(C16) vermindert die Entzündungsreaktion und Fibrosierung um die Implantate und verbessert so deren Biokompatibilität (H1).

Da die Kapseldicke [11, 15, 18], die Fibrosierung und die Entzündungsreaktion [6, 9, 15], die Fibroblastenaktivität [31] und ein erhöhter TGF- β -Spiegel [60] in Zusammenhang mit der Kapselkontraktur stehen, lässt die Reduktion dieser Parameter durch eine Beschichtung mit eADF4(C16) auch eine Reduktion des Risikos für das Auftreten einer Kapselkontraktur erwarten.

4.8 Kritische Beurteilung der Ergebnisse

Für einen direkten Vergleich unserer Versuchsgruppen eignet sich der Wilflingseder-Score nur bedingt. Um unsere Ergebnisse mit seiner Hilfe zu vergleichen, müsste die Kapseldicke auf das Rattenmodell angepasst und der Score für eine bessere Differenzierbarkeit um die untersuchten, immunhistologischen Parameter erweitert werden.

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen geben zwar ein gutes Bild der lokalen Reaktion, lassen aber keine ausreichenden Rückschlüsse auf mögliche, systemische Nebenwirkungen zu. Dies wurde in einer Reihe noch nicht publizierter, präklinischer Tests untersucht. Hierbei konnten jedoch bisher keine dosislimitierenden, immunologischen oder toxischen Reaktionen festgestellt werden.

Während des Untersuchungszeitraumes schieden zwei Ratten der SG aufgrund einer kutanen Neoplasie aus. Da die Ergebnisse der Autopsie und die histopathologischen Untersuchungen keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Tumor und den Implantaten oder deren Beschichtung ergaben, können diese als vom Implantat unabhängige, spontane Neoplasien betrachtet werden. Diese stellen bei Sprague-Dawley-Ratten in einem Zeitraum von 12 Monaten keine Ausnahme dar und sind in der Literatur bereits beschrieben [105].

4.9 Ausblick

Die ersten 12 Monate sind für das Auftreten einer Kapselkontraktur besonders entscheidend. Selbst nach diesem Zeitraum konnten noch Reste des Proteinfilms auf der Oberfläche der explantierten Kapseln nachgewiesen werden. Gleichzeitig waren die Anzahl TGF- β positiver Zellen und die Genexpression von TGF- β noch immer signifikant vermindert. Dies lässt vermuten, dass der Effekt der Beschichtung der Implantate über einen Zeitraum von 12 Monaten hinaus noch wirksam ist. Es gab auch keinen Hinweis darauf, dass sich der Unterschied in den Kapseldicken jenseits von 12 Monaten wieder relativieren könnte. Dennoch gilt es, den Effekt der Proteinbeschichtung in länger angelegten Studien über einen größeren Zeitraum zu beobachten. Besondere Beachtung sollte hierbei der sich nach 12 Monaten annähernden Anzahl an Makrophagen und Lymphozyten gelten.

Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch die Beschichtung das Risiko einer Kapselkontraktur reduziert werden kann. Da das Rattenmodell nur bedingt auf den Menschen übertragbar ist, könnten Untersuchungen im Großtiermodell eine bessere Vergleichbarkeit herstellen. Ob Patientinnen nach Brustaugmentation oder –rekonstruktion durch eine Beschichtung mit BioShieldS1 tatsächlich von einer Reduktion der Inzidenz oder des Ausmaßes der Kapselkontraktur profitieren, ist letztendlich nur in klinischen Studien zu klären.

Neben der Beschichtung von Brustimplantaten kann das rekombinante Protein eADF4(C16) auch zur Beschichtung anderer Oberflächen oder als eigenständiges Material (z.B. Nahtmaterial) verwendet werden.

5. Zusammenfassung

In unserer Versuchsreihe verglichen wir das periimplantäre Bindegewebe um beschichtete Silikonimplantate mit dem Gewebe um unbeschichtete Implantate, nach jeweils 3, 6 und 12 Monaten Implantationszeit, im Rattenmodell. Als Beschichtung diente BioShieldS1, ein Proteinfilm aus dem rekombinanten Spinnenseideprotein eADF4(C16). Zur Untersuchung des Gewebes bedienten wir uns der Histologie, Immunhistologie und qRT-PCR.

Histologisch unterschieden sich die beiden Gruppen neben einer geringeren Zellkern-dichte und einer homogeneren, weniger komprimierten Kollagenstruktur in der SG gegenüber der KG, vor allem durch eine signifikant geringere Kapseldicke um die beschichteten Implantate. In dieser Gruppe konnten wir eine zeitlich verzögerte Makrophageninvasion und eine zu allen Messzeitpunkten reduzierte Aktivität des TGF- β -Signalweges beobachten. Zu Beginn war die Expression der Wachstumsfaktoren CTGF und FGF-2 hier ebenfalls vermindert. Vermutlich als Folge der geringeren Aktivierung des TGF- β -Signalweges, wurden die Fibroblastenaktivität und -invasion weniger stark stimuliert, was sich in einer über den gesamten Zeitraum verminderten Anzahl und anfangs auch reduzierten Genexpression der Fibroblasten zeigte. Die Expression der Kollagene 1 und 3 war nach 3 (Kollagen 1 auch noch nach 12) Monaten ebenfalls signifikant erniedrigt. Folglich kam es im Gewebe um die Implantate der SG zu einer schwächer ausgeprägten Fibrosierung und zur Formierung einer dünneren Bindegewebekapsel. Daneben waren in der SG auch die Invasion CD4⁺- und CD8⁺- Lymphozyten und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α gehemmt, was die Inflammation und Fibrosierung ebenfalls reduzierte und, zumindest teilweise, auf eine geringere Makrophageninvasion und Aktivierung des TGF- β -Signalweges zurückgeführt werden kann.

Der Kapselkontraktur werden als Ursachen eine überschießende Entzündungsreaktion und eine daraus entstehende, ebenfalls verstärkte Fibrosierung zugrunde gelegt [6, 9, 11, 15]. Durch eine Beschichtung mit BioShieldS1 konnten beide Faktoren deutlich gehemmt werden, weswegen zu erwarten ist, dass das Risiko des Auftretens einer Kapselkontraktur gesenkt wird. Eine Beschichtung mit dem Spinnenseidenproteinfilm stellt somit eine deutliche Verbesserung der Biokompatibilität von Silikonimplantaten dar.

6. Literaturverzeichnis:

1. Busch, H., *Silicone toxicology*. Semin Arthritis Rheum, 1994. **24**(1 Suppl 1): p. 11-7.
2. Habal, M.B., *The biologic basis for the clinical application of the silicones. A correlate to their biocompatibility*. Arch Surg, 1984. **119**(7): p. 843-8.
3. Saxon, A., *The antigen that wasn't--silicone*. Clin Immunol, 2000. **95**(3): p. 171-2.
4. Duffy, D.M., *Silicone: a critical review*. Adv Dermatol, 1990. **5**: p. 93-107; discussion 108-9.
5. Belanger, M.C. and Y. Marois, *Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(5): p. 467-77.
6. Siggelkow, W., B. Klosterhalfen, U. Klinge, W. Rath, and A. Faridi, *Analysis of local complications following explantation of silicone breast implants*. Breast, 2004. **13**(2): p. 122-8.
7. Araco, A., R. Caruso, F. Araco, J. Overton, and G. Gravante, *Capsular contractures: a systematic review*. Plast Reconstr Surg, 2009. **124**(6): p. 1808-19.
8. ISAPS international society of aesthetic plastic surgery. *Global Statistics on Cosmetic Procedures - 2015*. Global Statistics 2016 [cited 2016 25.07.2016]; Available from: <https://www.isaps.org/Media/Default/global-statistics/2016%20ISAPS%20Results.pdf>.
9. Berry, M.G., V. Cucchiara, and D.M. Davies, *Breast augmentation: Part II--Adverse capsular contracture*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010. **63**(12): p. 2098-107.
10. Dancey, A., A. Nassimizadeh, and P. Levick, *Capsular contracture - What are the risk factors? A 14 year series of 1400 consecutive augmentations*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2012. **65**(2): p. 213-8.
11. Henriksen, T.F., J.P. Fryzek, L.R. Holmich, J.K. McLaughlin, K. Kjoller, A.P. Hoyer, J.H. Olsen, and S. Friis, *Surgical intervention and capsular contracture after breast augmentation: a prospective study of risk factors*. Ann Plast Surg, 2005. **54**(4): p. 343-51.
12. Handel, N., T. Cordray, J. Gutierrez, and J.A. Jensen, *A long-term study of outcomes, complications, and patient satisfaction with breast implants*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(3): p. 757-67; discussion 768-72.
13. Marques, M., S.A. Brown, I. Oliveira, M.N. Cordeiro, A. Morales-Helguera, A. Rodrigues, and J. Amarante, *Long-term follow-up of breast capsule contracture rates in cosmetic and reconstructive cases*. Plast Reconstr Surg, 2010. **126**(3): p. 769-78.
14. Henriksen, T.F., L.R. Holmich, J.P. Fryzek, S. Friis, J.K. McLaughlin, A.P. Hoyer, K. Kjoller, and J.H. Olsen, *Incidence and severity of short-term complications after breast augmentation: results from a nationwide breast implant registry*. Ann Plast Surg, 2003. **51**(6): p. 531-9.
15. Prantl, L., S. Schreml, S. Fichtner-Feigl, N. Poppl, C. Roll, M. Eisenmann-Klein, and F. Hofstadter, *[Histological and immunohistochemical investigations with capsular contracture after breast augmentation with smooth silicone gel implants]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2006. **38**(4): p. 224-32.
16. McGrath, M.H. and B.R. Burkhardt, *The safety and efficacy of breast implants for augmentation mammoplasty*. Plast Reconstr Surg, 1984. **74**(4): p. 550-60.
17. Gabriel, S.E., J.E. Woods, W.M. O'Fallon, C.M. Beard, L.T. Kurland, and L.J. Melton, 3rd, *Complications leading to surgery after breast implantation*. N Engl J Med, 1997. **336**(10): p. 677-82.
18. Siggelkow, W., A. Faridi, K. Spiritus, U. Klinge, W. Rath, and B. Klosterhalfen, *Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 1101-9.

19. Schaub, T.A., J. Ahmad, and R.J. Rohrich, *Capsular contracture with breast implants in the cosmetic patient: saline versus silicone--a systematic review of the literature*. *Plast Reconstr Surg*, 2010. **126**(6): p. 2140-9.
20. Namnoum, J.D., J. Largent, H.M. Kaplan, M.G. Oefelein, and M.H. Brown, *Primary breast augmentation clinical trial outcomes stratified by surgical incision, anatomical placement and implant device type*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2013. **66**(9): p. 1165-72.
21. Asplund, O., L. Gylbert, G. Jurell, and C. Ward, *Textured or smooth implants for submuscular breast augmentation: a controlled study*. *Plast Reconstr Surg*, 1996. **97**(6): p. 1200-6.
22. Coleman, D.J., I.T. Foo, and D.T. Sharpe, *Textured or smooth implants for breast augmentation? A prospective controlled trial*. *Br J Plast Surg*, 1991. **44**(6): p. 444-8.
23. Barnsley, G.P., L.J. Sigurdson, and S.E. Barnsley, *Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. **117**(7): p. 2182-90.
24. Wong, C.H., M. Samuel, B.K. Tan, and C. Song, *Capsular contracture in subglandular breast augmentation with textured versus smooth breast implants: a systematic review*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. **118**(5): p. 1224-36.
25. Fagrell, D., A. Berggren, and E. Tarpila, *Capsular contracture around saline-filled fine textured and smooth mammary implants: a prospective 7.5-year follow-up*. *Plast Reconstr Surg*, 2001. **108**(7): p. 2108-12; discussion 2113.
26. Liu, X., L. Zhou, F. Pan, Y. Gao, X. Yuan, and D. Fan, *Comparison of the postoperative incidence rate of capsular contracture among different breast implants: a cumulative meta-analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0116071.
27. Handel, N., J.A. Jensen, Q. Black, J.R. Waisman, and M.J. Silverstein, *The fate of breast implants: a critical analysis of complications and outcomes*. *Plast Reconstr Surg*, 1995. **96**(7): p. 1521-33.
28. El-Sheikh, Y., R. Tutino, C. Knight, F. Farrokhyar, and N. Hynes, *Incidence of capsular contracture in silicone versus saline cosmetic augmentation mammoplasty: A meta-analysis*. *Can J Plast Surg*, 2008. **16**(4): p. 211-5.
29. Spear, S.L. and M.R. Jespersen, *Breast implants: saline or silicone?* *Aesthet Surg J*, 2010. **30**(4): p. 557-70.
30. Zeplin, P.H. and N. Corduff, *Influence of patient age on capsular contracture after aesthetic breast augmentation*. *Plast Surg (Oakv)*, 2015. **23**(2): p. 67-9.
31. Gayou, R.M., *A histological comparison of contracted and non-contracted capsules around silicone breast implants*. *Plast Reconstr Surg*, 1979. **63**(5): p. 700-7.
32. Wolfram, D., C. Rainer, H. Niederegger, H. Piza, and G. Wick, *Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions*. *J Autoimmun*, 2004. **23**(1): p. 81-91.
33. Schreml, S., N. Heine, M. Eisenmann-Klein, and L. Prantl, *Bacterial colonization is of major relevance for high-grade capsular contracture after augmentation mammoplasty*. *Ann Plast Surg*, 2007. **59**(2): p. 126-30.
34. Gylbert, L., O. Asplund, A. Berggren, G. Jurell, U. Ransjo, and L. Ostrup, *Preoperative antibiotics and capsular contracture in augmentation mammoplasty*. *Plast Reconstr Surg*, 1990. **86**(2): p. 260-7; discussion 268-9.
35. Granchi, D., D. Cavedagna, G. Ciapetti, S. Stea, P. Schiavon, R. Giuliani, and A. Pizzoferrato, *Silicone breast implants: the role of immune system on capsular contracture formation*. *J Biomed Mater Res*, 1995. **29**(2): p. 197-202.
36. Copeland, M., M. Choi, and I.J. Bleiweiss, *Silicone breakdown and capsular synovial metaplasia in textured-wall saline breast prostheses*. *Plast Reconstr Surg*, 1994. **94**(5): p. 628-33; discussion 634-6.

37. Raso, D.S., W.B. Greene, and J.S. Metcalf, *Synovial metaplasia of a periprosthetic breast capsule*. Arch Pathol Lab Med, 1994. **118**(3): p. 249-51.
38. Wyatt, L.E., J.D. Sinow, J.S. Wollman, D.A. Sami, and T.A. Miller, *The influence of time on human breast capsule histology: smooth and textured silicone-surfaced implants*. Plast Reconstr Surg, 1998. **102**(6): p. 1922-31.
39. Ko, C.Y., C.Y. Ahn, J. Ko, W. Chopra, and W.W. Shaw, *Capsular synovial metaplasia as a common response to both textured and smooth implants*. Plast Reconstr Surg, 1996. **97**(7): p. 1427-33; discussion 1434-5.
40. Bergmann, P.A., M.E. Liodaki, K.L. Mauss, T. Lange, M. Gebhard, P. Mailander, and F. Siemers, *[Histological and immunohistochemical study of capsular contracture in an animal model--a comparison of two implants according to a modification of Wilflingseder's classification]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2012. **44**(4): p. 220-6.
41. Rubino, C., V. Mazzarello, F. Farace, F. D'Andrea, A. Montella, G. Fenu, and G.V. Campus, *Ultrastructural anatomy of contracted capsules around textured implants in augmented breasts*. Ann Plast Surg, 2001. **46**(2): p. 95-102.
42. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 86-100.
43. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
44. Lawrence, W.T. and R.F. Diegelmann, *Growth factors in wound healing*. Clin Dermatol, 1994. **12**(1): p. 157-69.
45. Brodbeck, W.G., M. Macewan, E. Colton, H. Meyerson, and J.M. Anderson, *Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion*. J Biomed Mater Res A, 2005. **74**(2): p. 222-9.
46. Keysser, G., U. Alpermann, and G.R. Burmester, *[Anti-CD4 therapy in treatment of rheumatoid arthritis--have the die been cast?]*. Z Rheumatol, 1998. **57**(5): p. 320-5.
47. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
48. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.
49. Boyce, D.E., W.D. Jones, F. Ruge, K.G. Harding, and K. Moore, *The role of lymphocytes in human dermal wound healing*. Br J Dermatol, 2000. **143**(1): p. 59-65.
50. Ramadori, G. and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *[The acute phase reaction and its mediators. II: Alpha tumor necrosis factor and interleukin 6]*. Z Gastroenterol, 1990. **28**(1): p. 14-21.
51. Luttkhuizen, D.T., M.C. Harmsen, and M.J. Van Luyn, *Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction*. Tissue Eng, 2006. **12**(7): p. 1955-70.
52. Mang, R. and H. Stege, *[The use of TNF-alpha antagonists in dermatology]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2003. **1**(5): p. 383-90; quiz 391-2.
53. Herrmann, F. and R. Mertelsmann, *[Tumor necrosis factor]*. Dtsch Med Wochenschr, 1989. **114**(8): p. 312-6.
54. Henry, G. and W.L. Garner, *Inflammatory mediators in wound healing*. Surg Clin North Am, 2003. **83**(3): p. 483-507.
55. Martin, P. and S.J. Leibovich, *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 599-607.
56. Goldman, R., *Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future*. Adv Skin Wound Care, 2004. **17**(1): p. 24-35.
57. Siedek, E.M., N. Honnah-Symns, S.C. Fincham, S. Mayall, and A.S. Hamblin, *Equine macrophage identification with an antibody (Ki-M6) to human CD68 and a new monoclonal antibody (JB10)*. J Comp Pathol, 2000. **122**(2-3): p. 145-54.

58. Beranek, J.T., *CD68 is not a macrophage-specific antigen*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 342-3; author reply 343-4.
59. Barrientos, S., O. Stojadinovic, M.S. Golinko, H. Brem, and M. Tomic-Canic, *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(5): p. 585-601.
60. Kuhn, A., S. Singh, P.D. Smith, F. Ko, R. Falcone, W.G. Lyle, S.P. Maggi, K.E. Wells, and M.C. Robson, *Periprosthetic breast capsules contain the fibrogenic cytokines TGF-beta1 and TGF-beta2, suggesting possible new treatment approaches*. Ann Plast Surg, 2000. **44**(4): p. 387-91.
61. Massague, J., *The TGF-beta family of growth and differentiation factors*. Cell, 1987. **49**(4): p. 437-8.
62. Scheithauer, M. and H. Riechelmann, [Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing]. Laryngorhinootologie, 2003. **82**(1): p. 31-5.
63. Wahl, S.M., D.A. Hunt, L.M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L.M. Wahl, A.B. Roberts, and M.B. Sporn, *Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5788-92.
64. Igotz, R.A., T. Endo, and J. Massague, *Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1987. **262**(14): p. 6443-6.
65. Edwards, D.R., G. Murphy, J.J. Reynolds, S.E. Whitham, A.J. Docherty, P. Angel, and J.K. Heath, *Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor*. EMBO J, 1987. **6**(7): p. 1899-904.
66. Igarashi, A., H. Okochi, D.M. Bradham, and G.R. Grotendorst, *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(6): p. 637-45.
67. Ihn, H., *Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(6): p. 681-5.
68. Igarashi, A., K. Nashiro, K. Kikuchi, S. Sato, H. Ihn, M. Fujimoto, G.R. Grotendorst, and K. Takehara, *Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(4): p. 729-33.
69. McGee, G.S., J.M. Davidson, A. Buckley, A. Sommer, S.C. Woodward, A.M. Aquino, R. Barbour, and A.A. Demetriou, *Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing*. J Surg Res, 1988. **45**(1): p. 145-53.
70. Spear, S.L. and J.L. Baker, Jr., *Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction*. Plast Reconstr Surg, 1995. **96**(5): p. 1119-23; discussion 1124.
71. Wilflingseder, P., [Advances in the surgical treatment of skin tumors]. Wien Med Wochenschr, 1974. **124**(41): p. 593-7.
72. Prantl, L., S. Schreml, S. Fichtner-Feigl, N. Poppl, M. Eisenmann-Klein, H. Schwarze, and B. Fuchtmeier, *Clinical and morphological conditions in capsular contracture formed around silicone breast implants*. Plast Reconstr Surg, 2007. **120**(1): p. 275-84.
73. Wilflingseder, P., P. A, and M. G, *Constrictive fibrosis following silicone implants in mammary augmentation*. Chir plastica, 1974(2): p. 215 - 229.
74. Sukhova, I., D. Muller, M. Eisenmann-Klein, H.G. Machens, and J.T. Schantz, [Quo vadis? Breast implants--current trends and new concepts]. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2012. **44**(4): p. 240-53.
75. van Heerden, J., M. Turner, D. Hoffmann, and J. Moolman, *Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented?* J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009. **62**(5): p. 610-7.
76. Schlesinger, S.L., R. Ellenbogen, M.N. Desvigne, S. Svehlak, and R. Heck, *Zafirlukast (Accolate): A new treatment for capsular contracture*. Aesthet Surg J, 2002. **22**(4): p. 329-36.

77. Moreira, M., D.J. Fagundes, M. de Jesus Simoes, M.C. de Oliveira, I.T. Dos Santos Previdelli, and A.C. Moreira, *Zafirlukast pocket delivery impairs the capsule healing around textured implants in rats*. *Aesthetic Plast Surg*, 2009. **33**(1): p. 90-7.
78. Gancedo, M., L. Ruiz-Corro, A. Salazar-Montes, A.R. Rincon, and J. Armendariz-Borunda, *Pirfenidone prevents capsular contracture after mammary implantation*. *Aesthetic Plast Surg*, 2008. **32**(1): p. 32-40.
79. Veras-Castillo, E.R., L. Cardenas-Camarena, I. Lyra-Gonzalez, J.F. Munoz-Valle, S. Lucano-Landeros, J. Guerrerosantos, B. Gonzalez-Ulloa, J.L. Mercado-Barajas, M.G. Sanchez-Parada, R. Azabache-Wenceslao, and J. Armendariz-Borunda, *Controlled clinical trial with pirfenidone in the treatment of breast capsular contracture: association of TGF-beta polymorphisms*. *Ann Plast Surg*, 2013. **70**(1): p. 16-22.
80. Handel, N. and J. Gutierrez, *Long-term safety and efficacy of polyurethane foam-covered breast implants*. *Aesthet Surg J*, 2006. **26**(3): p. 265-74.
81. Handel, N., M.J. Silverstein, J.A. Jensen, A. Collins, and K. Zierk, *Comparative experience with smooth and polyurethane breast implants using the Kaplan-Meier method of survival analysis*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **88**(3): p. 475-81.
82. Luu, H.M., J.C. Hutter, and H.F. Bushar, *A physiologically based pharmacokinetic model for 2,4-toluenediamine leached from polyurethane foam-covered breast implants*. *Environ Health Perspect*, 1998. **106**(7): p. 393-400.
83. Barr, S. and A. Bayat, *Breast implant surface development: perspectives on development and manufacture*. *Aesthet Surg J*, 2011. **31**(1): p. 56-67.
84. Zeplin, P.H., A. Larena-Avellaneda, M. Jordan, M. Laske, and K. Schmidt, *Phosphorylcholine-coated silicone implants: effect on inflammatory response and fibrous capsule formation*. *Ann Plast Surg*, 2010. **65**(6): p. 560-4.
85. Diao, Z.Y., H.L. Fu, C.L. Nie, L.J. Hao, D.P. Yang, and W.H. Chen, *Controlled release of transforming growth factor-beta receptor kinase inhibitor from thermosensitive Chitosan-based hydrogel: application for prevention of capsular contracture*. *Chin Med J (Engl)*, 2011. **124**(2): p. 284-90.
86. Lin, X., X. Duan, Y.Y. Liang, Y. Su, K.H. Wrighton, J. Long, M. Hu, C.M. Davis, J. Wang, F.C. Brunicardi, Y. Shi, Y.G. Chen, A. Meng, and X.H. Feng, *PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 915-28.
87. Park, S.H., *Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads*. *J Biochem Mol Biol*, 2005. **38**(1): p. 9-16.
88. Flanders, K.C., *Smad3 as a mediator of the fibrotic response*. *Int J Exp Pathol*, 2004. **85**(2): p. 47-64.
89. Flanders, K.C., C.D. Sullivan, M. Fujii, A. Sowers, M.A. Anzano, A. Arabshahi, C. Major, C. Deng, A. Russo, J.B. Mitchell, and A.B. Roberts, *Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(3): p. 1057-68.
90. Zeplin, P.H., A. Larena-Avellaneda, and K. Schmidt, *Surface modification of silicone breast implants by binding the antifibrotic drug halofuginone reduces capsular fibrosis*. *Plast Reconstr Surg*, 2010. **126**(1): p. 266-74.
91. Ibrahim Canter, H., E. Konas, O. Bozdogan, I. Vargel, B. Ozbahir, F. Oner, and Y. Erk, *Effect of slow-release 5-Fluorouracil on capsule formation around silicone breast implants: an experimental study with mice*. *Aesthetic Plast Surg*, 2007. **31**(6): p. 674-9.
92. Allmeling, C., K. Reimers-Fadhlaoui, and P.M. Vogt, *Spinnenseide in der plastischen Chirurgie. Wunderwerkstoff der Natur*. *Chemie in unserer Zeit*, 2007. **41**(6): p. 428-434.
93. Römer, L. and T. Scheibel, *Spinnenseidenproteine: Grundlage für neue Materialien*. *Chemie in unserer Zeit*, 2007. **41**(4): p. 306-314.
94. Vendrely, C. and T. Scheibel, *Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications*. *Macromol Biosci*, 2007. **7**(4): p. 401-9.

95. Scheibel, T., *Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins*. *Microb Cell Fact*, 2004. **3**(1): p. 14.
96. Omenetto, F.G. and D.L. Kaplan, *New opportunities for an ancient material*. *Science*, 2010. **329**(5991): p. 528-31.
97. Allmeling, C., A. Jokuszies, K. Reimers, S. Kall, C.Y. Choi, G. Brandes, C. Kasper, T. Scheper, M. Guggenheim, and P.M. Vogt, *Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration*. *Cell Prolif*, 2008. **41**(3): p. 408-20.
98. Winkler, S. and D.L. Kaplan, *Molecular biology of spider silk*. *J Biotechnol*, 2000. **74**(2): p. 85-93.
99. Heim, M., D. Keerl, and T. Scheibel, *Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. **48**(20): p. 3584-96.
100. Arcidiacono, S., C. Mello, D. Kaplan, S. Cheley, and H. Bayley, *Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998. **49**(1): p. 31-8.
101. Huemmerich, D., U. Slotta, and T. Scheibel, *Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins*. *Applied Physics A*, 2006. **82**(2): p. 219-222.
102. Zeplin, P.H., A.K. Berninger, N.C. Maksimovikj, P. van Gelder, T. Scheibel, and H. Walles, *[Improving the biocompatibility of silicone implants using spider silk coatings: immunohistochemical analysis of capsule formation]*. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2014. **46**(6): p. 336-41.
103. Hauser, J., J. Zietlow, M. Koller, S.A. Esenwein, H. Halfmann, P. Awakowicz, and H.U. Steinau, *Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification*. *J Mater Sci Mater Med*, 2009. **20**(12): p. 2541-8.
104. Stricklin, G.P., L. Li, V. Jancic, B.A. Wenczak, and L.B. Nanney, *Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(6): p. 1657-66.
105. Chandra, M., M.G. Riley, and D.E. Johnson, *Spontaneous neoplasms in aged Sprague-Dawley rats*. *Arch Toxicol*, 1992. **66**(7): p. 496-502.

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Labor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. R. Meffert für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die umfangreiche Laborausstattung danken.

Herrn Prof. Dr. med. R. Jakubietz danke ich für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Torsten Blunk danke ich für die Übernahme des Korreferats, die Einbeziehung in das Labor für Tissue Engineering und Regenerative Medizin und seine ausgesprochen konstruktive Kritik.

Dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Würzburg danke ich für die finanzielle Förderung des Projekts (Projektnummer A-106N).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Philip Zeplin für die Überlassung des Themas sowie die durchgehend gewissenhafte Betreuung und Förderung. Für sein anhaltendes Engagement und den wissenschaftlichen Austausch bin ich ihm sehr dankbar.

Ein herzlicher Dank gilt Herr Dr. med. Martin Jordan für die experimentelle Unterstützung, die Einweisung in die Laborarbeit und den Wissenschaftlichen Austausch.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau I. Chodnevsckaja, die mich stets bei den histologischen Untersuchungen mit ihrer langjährigen Erfahrung unterstützte und Frau S. Müller für die Durchführung der PCR und ihrer steten Hilfe im Labor.

Bei der Firma AMSilk GmbH bedanke ich mich für die Seidenbeschichtung der Silikonimplantate.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg. Die freundschaftliche Unterstützung während meiner Promotion und meines Studiums schätze ich sehr.