

Aus dem Institut für
Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Elektrochemisch abgeschiedenes Calciumhydroxid Ca(OH)_2 als
antibakterielle, antiinflammatorische und proosseointegrative
Titanimplantat-Oberflächen-Modifikation im In vivo Versuch**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Fabian Vogt
aus 90518 Altdorf bei Nürnberg
Würzburg, März 2023



Referent:

Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Koreferent/Koreferentin:

Prof. Dr. med. Maximilian Rudert

Dekan:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

28.11.2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FORSCHUNGSSTAND	1
1.1 IMPLANTATE UND IHRE RELEVANZ IN DER MODERNEN MEDIZIN	1
1.2 ZIELSETZUNG DER EXPERIMENTELLEN ARBEIT	2
1.3 FORSCHUNGSSTAND	3
1.3.1 Probleme der Endoprothetik: Postoperative, bakterielle Implantatinfektionen	3
1.3.2 Der Biofilm: Bildung, Veränderung und Problematik in der Behandlung	5
1.3.3 Charakterisierung des verwendeten Bakterienstamms Staphylococcus aureus	9
1.3.4 Beschichtungen zur Verhinderung der Biofilmbildung	12
1.3.5 Aktuelle antimikrobielle Beschichtungen und Verfahren	15
1.3.5.1 Passive Oberflächenmodifikationen / Antiadhäsive Moleküle zur Verhinderung der Adhäsion ...	15
1.3.5.2 Aktive Oberflächenmodifikationen zur primären Abtötung oder Minimierung von Bakterien	15
1.3.6 Die Relevanz von Calciumhydroxid in der Zahnmedizin	18
1.3.6.1 Antimikrobielle Wirkmechanismen von Calciumhydroxid.....	18
1.3.6.2 Bildung von knochenähnlicher Substanz durch Calciumhydroxid.....	19
1.3.7 Calciumphosphat als Standardbeschichtung für lasttragende Implantate	20
1.4 UNTERSUCHTE HISTOLOGISCHE ENTZÜNDUNGSMARKER ZUR QUANTIFIZIERUNG UND QUALIFIZIERUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE: AUSGEWERTETE LEUKOZYTEN-ARTEN	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 STUDIENBESCHREIBUNG	24
2.1.1 Versuchstiere	24
2.1.2 Haltungsbedingungen	25
2.1.3 Versuchsdurchführung	26
2.1.3.1 Anlegen der Bakterienkulturen.....	26
2.1.3.2 Einteilung der Versuchstiere.....	27
2.1.3.3 Operation mit Implantation und Infektion der Tiere.....	27
2.1.3.4 Versuchsbegleitendes Monitoring des Gesundheitszustandes.....	30
2.1.3.5 Euthanasie und Probenentnahme.....	32
2.1.4 Untersuchung der entnommenen Proben	34
2.1.4.1 Bakterieller Nachweis durch Ausplattieren.....	34
2.1.4.2 Histologische Aufbereitung der Proben.....	35
2.1.4.2.1 Herstellung der Gewebepreparate zur H.E. Färbung.....	35
2.1.4.2.2 Doppelfärbung der Gewebepreparate mit Hämalun/Hämatoxylin-Eosin – H.E. Färbung....	42
2.1.4.2.3 Herstellung der Synovia-Ausstrich-Preparate.....	45
2.1.4.2.4 Färbung der Synovia-Ausstriche mittels Pappenheimfärbung/May-Grünwald-Giemsafärbung.....	46
2.1.4.2.5 Erfassung der relevanten Zelltypen in den gefärbten Präparaten.....	47
2.2 STATISTISCHE METHODEN	49
3. ERGEBNISSE	51
3.1 ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER ERFASSTEN ZELLTYPEN	51
3.2 RELATIVE HÄUFIGKEIT DER ERFASSTEN ZELLTYPEN	57
3.2.1 Relative Häufigkeit und visuelle Analyse der Gewebeproben	57
3.2.2 Relative Häufigkeit und visuelle Analyse der Synovia-Proben	64
3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG	72
3.3.1 Nachweisverfahren Normalverteilung (Gewebe- und Synoviaproben; via Excel)	72
3.3.2 Detaillierte statistische Auswertung der 0 KBE-Gruppe	73
3.3.2.1 Gewebe 0 KBE.....	73
3.3.2.2 Synovia 0 KBE.....	77
3.3.3 Detaillierte statistische Auswertung der 100 KBE-Gruppe (Synovia)	81
3.3.4 Detaillierte statistische Auswertung der 1000 KBE-Gruppe	84

3.3.4.1 Gewebe 1000 KBE	84
3.3.4.2 Synovia 1000 KBE	87
3.3.5 Statistik - Tabellarische Zusammenfassung	90
4. DISKUSSION	92
4.1 DIE VERSUCHSGRUPPEN 0 KBE UND 100 KBE	92
4.2 DIE VERSUCHSGRUPPE 1000 KBE	95
4.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	99
4.4 CALCIUMHYDROXID ALS AUSSICHTSREICHE IMPLANTATBESCHICHTUNG	101
5. ZUSAMMENFASSUNG	105
6. LITERATURVERZEICHNIS	107
APPENDIX	
I ABKÜRZUNGSSVERZEICHNIS	
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
III ABBILDUNGSNACHWEISE.....	
IV TABELLENVERZEICHNIS	
V MATERIALANHANG	
VI DANKSAGUNG	
VII LEBENSLAUF	

1. Einleitung und Forschungsstand

1.1 Implantate und ihre Relevanz in der modernen Medizin

Einer der Grundgedanken der modernen Medizin ist, dem Menschen die Lebensqualität bis in das hohe Alter zu erhalten oder diese bei Bedarf wiederherzustellen. Eine moderne Form der Therapie stellen hierbei Implantate dar, beispielsweise Cochlea-Implantate [1, 2] oder Herzschrittmacher [3]. Die Insertation von Implantaten in den Knochen als primäre Verankerungselemente mit Aufbau oder als Möglichkeit zur Befestigung von Suprakonstruktionen stellen im Bereich der Orthopädie sowie der Zahnmedizin eine Behandlungsoption mit vielfältigen Möglichkeiten dar.

In der chirurgischen Orthopädie können Implantate im Bereich der Endoprothetik in Form von Knie- oder Hüftgelenksprothesen die schmerzfreie Mobilität wiederherstellen, wenn Bewegungen durch Knorpel- und Gelenksabnutzung sowie Degeneration in Form von Arthritiden oder Arthrose sehr schmerzhaft oder nur noch eingeschränkt möglich sind [4, 5]. Im Bereich der Zahnmedizin dienen Implantate als Verankerung für Suprakonstruktionen um funktionell primär die Kaufähigkeit wiederherzustellen und so eine selbstständige, uneingeschränkte Ernährung zu gewährleisten. Weitere Indikationen für Implantate finden sich im Bereich der Kieferorthopädie, z.B. in Form von temporären Gaumenimplantaten zur Verankerung kieferorthopädischer Geräte. Speziell im sichtbaren Frontzahnbereich erfüllen Implantate aber auch eine ästhetisch sowie psychologisch rehabilitierende Funktion für den Patienten [6-10].

Eine erfolgreiche Implantation ist von vielen Faktoren abhängig. Eine sorgfältige Planung und Durchführung durch den Chirurgen, sterile Operationsmaterialien und Instrumentarien, Raumluftqualität sowie die Gewährleistung der Sterilzonen zu allen Zeiten sind von großer Bedeutung. Einen besonders großen Risikofaktor bei der Implantation stellt die Besiedelung des Implantatbetts und der Implantatoberflächen durch Bakterien dar. Infektionen und Komplikationen bis hin zum Implantatversagen können das Resultat sein und bedeuten für den Patienten meist Schmerzen und Folgeschäden physischer und psychischer Art. Auch das Gesundheitssystem wird durch Revisionsbehandlungen zusätzlich belastet [11-13].

Um dieses Risiko zu reduzieren, befinden sich verschiedene proosseointegrative und antimikrobielle Implantatwerkstoffe und Beschichtungen in der Erforschung.

1.2 Zielsetzung der experimentellen Arbeit

Ein aktueller Forschungsansatz für die moderne Implantologie stellt die Implantatbeschichtung mit elektrochemisch abgeschiedenem Calciumhydroxid (Ca(OH)_2) dar. Entsprechende In vitro Versuche wurden bereits von Moseke et al. durchgeführt [14]. Zusammenfassend konnten die In vitro Versuche gute antibakterielle Eigenschaften der Ca(OH)_2 -Beschichtung durch eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums auf entsprechend beschichteten Oberflächen nachweisen. Insbesondere zur Vorbeugung von Infektionen in der initialen Implantationsphase ist dies essenziell. Die Umwandlung von Ca(OH)_2 in Hydroxylapatit (HA) nach nur wenigen Tagen lässt außerdem darauf schließen, dass die Bildung von knochenähnlicher Substanz auch beim Einsatz der Beschichtung bei In vivo Versuchen zu erwarten ist. Die Implantatbeschichtung mit Ca(OH)_2 zeigte mit ihren Eigenschaften insgesamt also großes Potential für den Einsatz im medizinischen Bereich für osseointegrierte Implantate, sodass im nächsten Schritt eine Erprobung am lebendigen Organismus erfolgen konnte.

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war die Erprobung eben dieser Ca(OH)_2 -Beschichtung In vivo unter dem Aspekt, ob und inwieweit die antibakteriellen und somit auch antiinflammatorischen bzw. entzündungsmoderierenden Eigenschaften der Ca(OH)_2 -Beschichtung eine sinnvolle und effektive Ergänzung zu den bisher erfolgreich eingesetzten Calciumphosphat(CaP)-Beschichtungen mit bewiesenen, guten proosseointegrativen Eigenschaften bei lasttragenden Implantaten sein können.

Sollten sich die im Verlauf der In vitro Versuche nachgewiesenen Eigenschaften erwartungsgemäß auf den In vivo Versuch übertragen lassen, sollten die positiven Effekte der Ca(OH)_2 -Beschichtung ebenfalls nachweisbar sein. Konkret sind etwa verringerte bakterielle Entzündungsparameter zu erwarten, was wiederum für eine bessere Einheilung sprechen würde.

1.3 Forschungsstand

1.3.1 Probleme der Endoprothetik: Postoperative, bakterielle Implantatinfektionen

Die Komplikationsrate einer periprothetischen Gelenksinfektion ist bei primärer Hüft- und Kniegelenks-Endoprothetik mit bis zu 2,5% immer noch sehr hoch. Bei revisionschirurgischen Maßnahmen steigt das Risiko sogar um den Faktor 4 auf bis zu 10% an [15]. Nach retrospektiven Analysen von Dale et al. an 97344 zwischen 1987-2007 gesetzten Hüftendoprothesen stieg der relative Anteil an notwendigen Revisionen durch Protheseninfektion stetig an [16]. Durch den Anstieg der absoluten Patientenzahlen (USA: 2004 etwa 600.000 Gelenkprothesen [17], 2009 bereits etwa 905.000 [18], Prognose USA für 2030 etwa 572.000 Hüftgelenksendoprothesen sowie etwa 3.480.000 Kniegelenksendoprothesen [19]), ist es jedoch eher der relative Anteil auftretender postoperativer, implantatassoziiertes bakterieller Infektionen mit zunehmend resistenten bzw. multiresistenten Erregern, der zur Sorge veranlasst [16, 20, 21]. Die periprothetische Implantatinfektion ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der Endoprothetik, einhergehend mit Prothesenrevision, hoher Morbidität und steigender Mortalität [22].

Des Weiteren stellt jedes xenogene Material einen Fremdkörper und damit auch ein Risiko dar, Implantate jeglicher Art eingeschlossen. Nowakowska et al. beschreiben, dass das Risiko einer Infektion mit Staphylokokken durch Einbringung von Fremdmaterial bis um das 10.000-fache erhöht ist [23]. Dabei berufen sie sich auf die Ergebnisse von Zimmerli sowie Elek, wobei letzterer beschreibt, dass bereits 100-300 Staphylokokken als suffizient für eine Infektion gelten [24, 25].

Infektionszunahmen sind jedoch nicht ausschließlich auf die fortschreitende Resistenzentwicklung von pathogenen Keimen zurückzuführen. Ebenso ist die steigende Lebenserwartung und das Alter des Patienten und somit die allgemeine Abwehrlage des Körpers zum Zeitpunkt der Operation oft reduziert. Die weltweite Prävalenz und teils rapide zunehmende Inzidenz spezieller wundheilungsbeeinflussender Ko-Morbiditäten wie Diabetes, Adipositas und Hypertonie, könnte einen weiteren entscheidenden Faktor darstellen [16, 26].

Darüber hinaus sind auch Operationsumfeld und -dauer, insbesondere die Expositionsdauer offener Wunden, Risikofaktoren [27]. Trotz fortschrittlicher OP-Saal-Belüftung zeigen Untersuchungen, dass OP-Räume bereits geringe Zeit nach Betreten des Personals kontaminiert sind [28, 29]. Auch kostenintensive Lamina-Air-Flow-Systeme führten nach Gastmeier sogar zu einer erhöhten Komplikationsrate in der orthopädischen Endoprothetik [30]. Obwohl es gelingt, durch perioperative infektionsprophylaktische Maßnahmen, wie die Gabe von Antibiotika, implantatassoziierte Infektionen zu reduzieren [31, 32], stellen sie im Bereich der Implantatchirurgie ein sehr ernst zu nehmendes Problem dar.

Aus der Perspektive der Werkstoffkunde ist es angesichts der zahlreichen Fehlerquellen das oberste Ziel, Materialien zu entwickeln, welche die nötigen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften besitzen, um das Gesamtergebnis positiv zu beeinflussen. Dazu gehören unter anderem [33, 34]:

- spezielle bakterizide, viruzide oder fungizide Oberflächenbehandlungen von OP-Belüftungsanlagen und Filtern
- antiadhäsive Oberflächen zur leichteren Desinfektion und Sterilisation
- Materialmodifikationen im Bereich metallischer oder keramischer Werkstoffe
- Antibakterielle Oberflächenbeschichtungen von Implantaten

Nach Gristina ist die Prognose eines Implantates durch die jeweiligen Erstbesiedler seiner Oberfläche bestimmt. Bei dem sogenannten „race for the surface“ stehen körpereigene Zellen in einem kompetitiven Wettbewerb mit adhäsionsbefähigten Mikroorganismen. Eine schnelle Besiedelung durch körpereigene Zellen wurde mit einem geringeren Risiko für die Kolonialisierung durch Fremdorganismen assoziiert und umgekehrt [35].

Dieses Modell geriet jedoch aufgrund von starker Simplifizierung, unbestätigten Vermutungen und mangelnden konkreten Aussagen zur Infektionswahrscheinlichkeit zunehmend in Kritik. Die strikte Annahme, dass entweder nur gewebeeigene Zellen oder nur Fremdzellen/Keime adhärieren, liegt so in der Realität kaum vor.

Die Vorstellung, dass die initiale Besiedlung der Implantatoberfläche durch Bakterien und die daraus resultierende Biofilmbildung jedoch der entscheidende Faktor für die Ausbildung einer periimplantären Infektion darstellt, ist allgemein anerkannt und stellt den Ausgangspunkt verschiedener Lösungsansätze dar [36].

1.3.2 Der Biofilm: Bildung, Veränderung und Problematik in der Behandlung

Bildung von Biofilmen

Die Entwicklung bakterieller Biofilme lässt sich in der Regel in 5 Stadien mit jeweils charakteristischen Eigenschaften unterteilen (Abbildung 1). Sauer et al. wiesen als eine der ersten Autoren diese Stadien detailliert an *P. aeruginosa* nach [37]. Der Mechanismus lässt sich auch auf Staphylokokken übertragen [38], welche auch im späteren Versuch als Testorganismen verwendet wurden.

Folgende Phasen werden unterschieden (siehe Abb. 1):

- Phase 1 Reversible / passive Adhäsion
- Phase 2 Irreversible / aktive Adhäsion - initiale Biofilmmatrix-Bildung
- Phase 3 Reifungsphase I
- Phase 4 Reifungsphase II
- Phase 5 Ablösungsphase

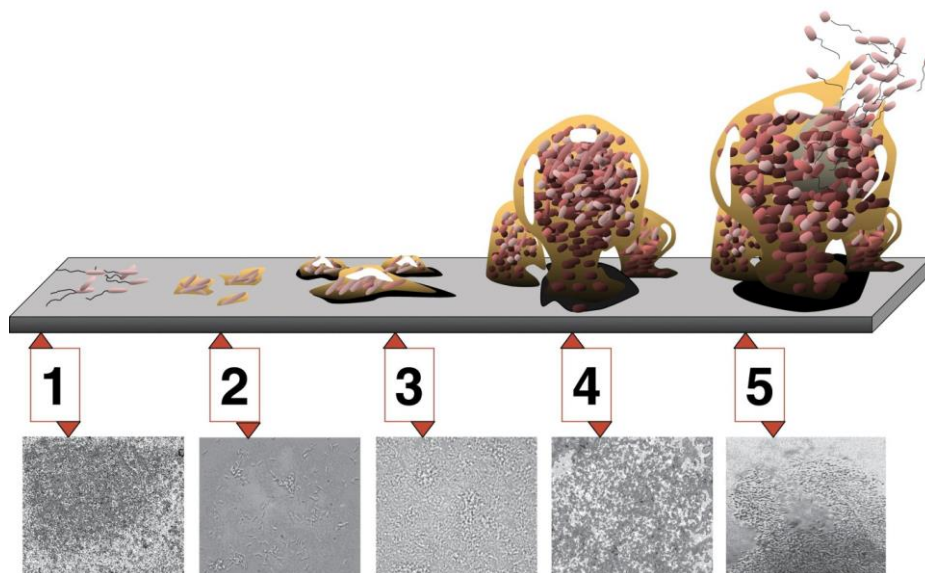


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FÜNF STADIEN DER BIOFILMBILDUNG NACH D. DAVIS [39]

In Phase 1 (der reversiblen Adhäsionsphase) heften sich planktonisch lebende Mikroorganismen durch physikalische Phänomene, wie Van der Waals Kräfte entsprechend echter Dipol-Dipol- und/oder induzierter Dipol-Wechselwirkungen, positiv/negativer Ladungseffekte und hydrophober Wechselwirkung, spontan und ohne Veränderung des Organismus auf Oberflächen an [40-42]. Die bindenden Kräfte sind hierbei sehr schwach, sodass es in dieser Phase wieder zur Ablösung mancher Organismen kommt. Sauer et al. zeigten, dass die initiale Anheftungsart bereits dazu beiträgt, ob ein Fortschreiten in die nächste Phase der Biofilmreifung eintreten kann [37].

Die flächig adhärenierten Bakterien verändern in Phase 2 (irreversible Adhäsionsphase), stimuliert durch den Oberflächenkontakt einerseits und durch selbstproduzierte Botenstoffe/Quorum Sensing (QS)-Moleküle, ihr exprimiertes Proteinmuster drastisch. Es werden Exopolysaccharide (EPS) und verschiedene Proteine gebildet, um eine irreversible Oberflächenbindung durch kovalente Wechselwirkungen zu schaffen.

In der sich anschließenden Phase 3 (Reifungsphase I) entsteht mit zunehmendem Bakterienwachstum und Höhenzunahme des sich bildenden Biofilms (10 - 100 μm) eine natürliche Konkurrenz um Nährstoffe in tieferen Schichten. Die Verfügbarkeit eben dieser wird, QS induziert durch die Bildung und Offenhaltung von Kanälen und Poren, verbessert. Gram-positive und gram-negative Bakterien nutzen hierbei mitunter unterschiedliche Signalmoleküle, deren Wirkung konzentrationsabhängig ist. Durch Proliferation ändert sich, bedingt durch QS, das Genexpressionsmuster und Syntheseverhalten [37, 43-45].

Ab einer Biofilmdicke von über 100 μm gilt dieser als ausgereift und die Bakterien zeigen in Phase 4 (Reifungsphase II) ein komplexes Proteinprofil. ABC-Transporter werden für eine zunehmende Resistenz gegenüber Schadstoffen exprimiert [46]. Denitrifikationsproteine sorgen für den Abtransport und die Umsetzung toxischer Verbindungen [47]. Die zunehmende Komplexität und Dicke des kovalent fixierten Biofilms bietet Bakterien in tieferen Schichten zum einen unmittelbaren Schutz gegen physische Reize wie Scheerkräfte. Zum anderen stellt er als dreidimensionales Gebilde ein Diffusionshindernis für gelöste Stoffe dar. Durch die Expressierung von

Exopolysacchariden (EPS) der Extrazellulärmatrix werden Bindungsstellen für speziellere Bakterienarten geschaffen. Ein klassisches Beispiel sind hier orale Biofilme, welche sich durch Früh- und Spätbesiedler auszeichnen. Wird die Erstbesiedelung erschwert, werden auch die Bindungsmöglichkeiten für spätsiedelnde, spezifischere Bakterien reduziert und so der Bildung eines komplexeren und mitunter aggressiven Biofilms entgegen gewirkt [37, 48, 49].

Phase 5 (Ablösungsphase) schließt sich nahtlos an Phase 4 (Reifungsphase II) an und ist durch weiteres Wachstum und den Ausbau des Kanal- und Porensystems des Biofilms gekennzeichnet. Charakteristisch ist, dass die Konzentration der QS-Moleküle unter der sehr hohen Bakteriendichte einen derart hohen Spiegel erreicht, dass Bakterien der obersten Biofilmschichten wieder ein planktonisches Proteinsynthesemuster annehmen und sich aktiv vom Biofilm lösen, um neue Oberflächen zu besiedeln [37, 50]. Der Zyklus kann nun von neuem beginnen und eine stetige Ausbreitung der Bakterien des Biofilms ist ermöglicht.

Um die Bildung von Biofilmen zu verhindern, sind neben Kenntnissen über deren Entwicklungsphasen weiterhin deren spezifische Eigenschaften hinsichtlich der folgenden Aspekte relevant.

Resistenz von Biofilmen

Die Widerstandsfähigkeit jeglicher Biofilme gegenüber therapeutischen Mitteln, insbesondere auch Antibiotika, geht auf mehrere Mechanismen zurück, die sich gegenseitig synergetisch verhalten. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Teilmechanismen eingegangen, um diese Problematik und die Relevanz der initialen Bekämpfung besser zu verdeutlichen.

EPS und Diffusionsbarriere

Die extreme Resistenz von Biofilmen ist mitunter auch auf die unterschiedlichen Bakterienarten zurückzuführen. Der Biofilm als mehrschichtiger Komplex gewinnt so eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika jeglicher Art, da aufgrund der vielen verschiedenen synthetisierten EPS, Peptide und Proteine die Bakterien durch die so

entstandene Schleimkapsel effektiv geschützt werden. Insgesamt beträgt der Anteil der schützenden und adhäsionsvermittelnden extrazellulären Matrix etwa 75% - 90% der gesamten Biofilmmasse [51]. Je nach Bakterienart, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix oder Gemeinschaftsbildung aus verschiedenen Bakterienstämmen können Antibiotika gut oder weniger gut in den Biofilm diffundieren. Die verzögerte Penetration, die Adsorption sowie der Abtransport über ABC-Transporter führen dazu, dass Antibiotika häufig keinen ausreichenden Wirkspiegel bzw. nur unterhalb der minimalen Hemmkonzentration erreichen, was weiterhin die Resistenzentwicklung begünstigen könnte [52-56].

Nährstoffangebot, Wachstum, Ruhephase und Stationäre Phase

Aufgrund des unterschiedlichen Nährstoff- und Sauerstoffangebots im Biofilm, welcher an der Basis sogar anaerob werden kann [57], kommt es zu einer natürlichen bakteriellen Heterogenität in den unterschiedlichen Biofilmschichten hinsichtlich Art und Genexpression. So ist die Wachstumsrate, die Proteinsynthese und die generelle metabolische Aktivität in oberflächennahen Kompartimenten des Biofilms mit günstigeren Wachstumsverhältnissen wesentlich höher als in dessen mittleren oder basalen Bereichen, wo langsames oder auch gar kein Wachstum vorliegen kann [58]. Keren et al. beschreiben bei *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *E. coli* sogenannte persistierende Zellen (Persister Cells), welche durch ihren extrem herabgesetzten Stoffwechsel und ihre reduzierte Wachstumsrate resistent gegen antimikrobielle Substanzen erscheinen [59].

Beta-Laktamase-Bildung, Mutationsrate

Ein weiterer Grund für die extreme Therapieresistenz von Biofilmen ist die Bildung von Substanzen, die schädliche Verbindungen deaktivieren können. Der bekannteste und klinisch wahrscheinlich relevanteste Mechanismus zur Deaktivierung schädlicher Verbindungen ist die Bildung von Beta-Laktamasen (Penicillinasen, Cephalosporinasen, Carbapenemasen und ESBLs (extended spectrum beta-lactamases)). Dies sind bakterielle Enzyme, welche den Beta-Laktam-Ring von Beta-Laktam-Antibiotika hydrolysieren und

so unschädlich machen können [60]. Die Beta-Laktamase-Bildung wurde bereits bei vielen Bakterienstämmen beschrieben [61]. Da die Fähigkeit zur Bildung sowohl chromosomal als auch über Plasmide weitergegeben wird, stellt dies ein zunehmendes Problem dar [62, 63]. Sind im Biofilm Beta-Laktamase sezernierende Bakterien vorhanden, profitieren alle Bakterien im gesamten Verbund von der zusätzlichen ‚Abwehrleistung‘, speziell jedoch all jene, die keine natürliche Resistenz gegen Beta-Laktam-Antibiotika aufweisen oder selbst Beta-Laktamase-Aktivität zeigen [64].

Driffield et al. zeigten des Weiteren, dass in Biofilmen eine erhöhte Mutationsrate vorliegt [65] und ein verstärkter vertikaler Gentransfer zu beobachten ist [66]. Als Grund für die erhöhte Mutationsrate der Zellen wird oxidativer Stress als Folge normaler, metabolischer Aktivitäten oder herbeigeführt durch Fremdfaktoren, wie z.B. Antibiotika angesehen [67]. Mutationsrate und Selektionsdruck könnten somit die biofilmassoziierte Resistenzentwicklung und den Resistenztransfer maßgeblich verstärken und Biofilmen das Bestehen und Weiterentwickeln auch unter widrigen Umständen ermöglichen.

Da ausgebildete Biofilme wie beschrieben mit höherer Reifungsphase zusehends diffiziler in der Therapie werden und die begünstigte Resistenzentwicklung möglichst unterbunden werden sollte, ist der logische Ansatz, deren initiale Bildung zu verhindern.

1.3.3 Charakterisierung des verwendeten Bakterienstamms *Staphylococcus aureus*

S. aureus lässt sich in nahezu 100% aller Abszesse/Furunkel und bei über 70 - 80% der Wundinfektionen jeglicher Art nachweisen, was ihn als Versuchskeim prädestiniert. Bei den Staphylokokken handelt es sich um gram-positive Haufenkokken. Sie untergliedern sich in Koagulase-positive mit *S. aureus* als deren wichtigster Vertreter und Koagulase-negative Kokken, z.B. *S. Epidermis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* oder *S. captitis*.

S. aureus ist fakultativ anaerob, katalasepositiv, oxydasenegativ und unbeweglich. Im Allgemeinen zeigt er bezüglich seiner Umgebung keine speziellen Anforderungen und weist eine hohe Resistenz gegenüber Austrocknung auf. Ebenso stellt die Magenpassage kein Hindernis für den Erreger dar [68].

Die für die Wundinfektion und den durchgeführten Versuch relevanten Pathogenitätseigenschaften seien im Folgenden kurz aufgeführt.

Zellwand assoziierte Virulenzfaktoren

Das primär zellwandgebundene *Protein A* vermag den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden und somit die Interaktion mit dem Fc-Rezeptor auf Makrophagen zu unterbinden. Es wirkt somit antiphagozytär.

Durch den *Clumpingfaktor* ist es *S. aureus* möglich, an Fibrinogen zu binden und dessen Polymerisation zu Fibrin zu induzieren. In Kombination mit der Plasmakoagulase sorgt dies für die Bildung eines Fibrinschutzwalles um den Erreger, welcher ihn vor dem Immunsystem abschirmt [68, 69].

Sezernierte Virulenzfaktoren

Die *Plasmakoagulase* führt zur Bildung von Staphthrombin aus Prothrombin, welches dann zur Polymerisation von Fibrin aus Fibrinogen führt. Des Weiteren ist die Plasmakoagulase ein labortechnisches Differenzierungsmerkmal für Staphylokokken.

Nachdem zuerst ein schützender Fibrinwall gebildet wird, um die initiale unbeeinträchtigte Vermehrung zu ermöglichen, wird im folgenden Verlauf der Infektion die *Staphylokinase* von großer Bedeutung. Sie vermag es, die gebildete Fibrinhülle in ihrer Integrität anzugreifen und die mittlerweile entstandene Abszess-Wand durchlässig zu machen. Eine weiterhin gebildete Hyaluronidase und die DNase ermöglichen die weitere Ausbreitung im Organismus durch enzymatische Spaltung von Gewebebestandteilen und interzellulärer Substanz. Gemeinsam sorgen Staphylokinase, Hyaluronidase und DNase für die enorme Gewebeinvasivität von *S. aureus* und dessen Ausbreitung im Körper.

Sezernierte *Hämolyse* (alpha, beta, gamma, delta) greifen die Zellwände von Erythrozyten und Phagozyten direkt an und führen zum Zelltod. Alpha-Hämolysin wird auch als Staphylolysin bezeichnet und weist eine starke Immunogenität auf. Es wird auf dem Blutagar als differentialdiagnostisches Mittel zur Unterscheidung von *S. aureus* zu

den anderen Staphylokokken, welche hier keine vollständige Hämolyse zeigen, herangezogen.

Etwa 5% aller Stämme von *S. aureus* bilden die *Exfoliatintoxine A + B*, welche zu einer Epidermolyse zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum führen. Die hieraus resultierende, massive Blasenbildung (SSSS - Staphylococcal scaled skin syndrom) kann zu – mitunter lebensbedrohlichen - Hautablösungen enormer Areale führen.

Das nur noch bei 1% aller *S. aureus*-Stämme vorkommende *Toxin-1 (TSST-1 Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1)* wirkt als Superantigen und ist dadurch im Stande, MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) ohne gebundenes Antigen direkt mit dem T-Zell-Rezeptor zu verknüpfen. Das Resultat ist eine polyklonale T-Zell-Aktivierung mit einer anschließenden, unangemessen hohen Makrophagenaktivierung, welche wiederum unverhältnismäßig und unkontrolliert Zytokine, hauptsächlich Tumornekrosefaktor-alpha, freisetzt. Das dadurch bedingte Toxic-Shock-Syndrom ist lebensbedrohlich.

Die von circa 5% aller *S. aureus* gebildeten *Enterotoxine (A, B, C1, C2, C3, D, E)* besitzen ebenfalls superantigen Charakter und können aufgrund ihrer Hitzestabilität bei kontaminierter Nahrung bereits vor Bakterienvermehrung im Fremdorganismus zum Schock führen [68, 69].

1.3.4 Beschichtungen zur Verhinderung der Biofilmbildung

Nicht jede Beschichtung ist für jede Indikation geeignet. Jedoch lassen sich allgemeingültige Kriterien formulieren, welche als Grundlage und Bewertungsschema für einzelne antimikrobielle Beschichtungssysteme herangezogen werden können. Die Eigenschaften, die optimalerweise erreicht werden, sind folgend tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 1).

TABELLE 1: ANFORDERUNGEN AN EINE 'OPTIMALE' ANTIBAKTERIELLE IMPLANTATBESCHICHTUNG NACH ROMANO [70]

Sicherheit	Keine systemische Toxizität	Keine lokale Toxizität	Keine negativen Effekte auf die Gewebe- und Knochenheilung	Keine unerwünschten Langzeiteffekte
Aktivität In vitro	Keine Cyto-/Genotoxizität	Wirksamkeit gegen planktonische Bakterien und Biofilm auf verschiedenen Oberflächen	Weites Bakterienspektrum wird abgedeckt	Keine Induktion von Resistenzen wie klassische Antibiotika
Effektivität	In vivo bewiesene Effektivität	Einzelfall-Studien belegen Wirkung	Multicenter Studien beweisen Wirkung	Randomisierte Studien beweisen Wirkung
Anwendung	Einfache Handhabung	Vielseitigkeit	Resistenz gegenüber temporärer Belastung z.B. Press-fit Einbringung	Einfache Lagerung
Wirtschaftlichkeit	Akzeptable Kosten	Große, einfache Verfügbarkeit	Einfache Herstellung	Unproblematisch hinsichtlich Gesetzgebung

Neben einem hohen Maß an Sicherheit hinsichtlich toxischer und Langzeiteffekte sollte eine solche Beschichtung effektiv gegen ein großes Bakterienspektrum wirken, ohne dabei körpereigenen Zellen zu schaden oder Resistenzen hervorzurufen. Darüber hinaus

sollte sie vielseitig und einfach in der Handhabung sowie kostengünstig in der Herstellung und damit auch wirtschaftlich zweckmäßig sein [70].

Aktuelle Ansätze bezüglich der Entwicklung antimikrobieller Beschichtungen fokussieren auf zwei wesentliche Mechanismen – zum einen die Verhinderung der Adhäsion, zum anderen die Abtötung der Bakterien durch Kontakt oder Freisetzung antibakterieller Substanzen.

Implantate besitzen mehrere funktionelle Bereiche, in denen verschiedene Modifikationen zu besseren Ergebnissen führen können. Betrachtet man beispielsweise ein orthopädisches Implantat, hier eine totale Hüftendoprothese (Abbildung 2), so zeigen sich verschiedene Bereiche, die gänzlich unterschiedlichen Beanspruchungen ausgesetzt sind. Unter Voraussetzung guter Eigenschaften im Bereich Biokompatibilität und Biokorrosion des Grundmaterials, welche mit Titan [71-73] als Ausgangsstoff erreicht werden, stehen - wie folgend dargestellt - eine Vielzahl von Ansatzpunkten für Oberflächenmodifikationen offen [74].

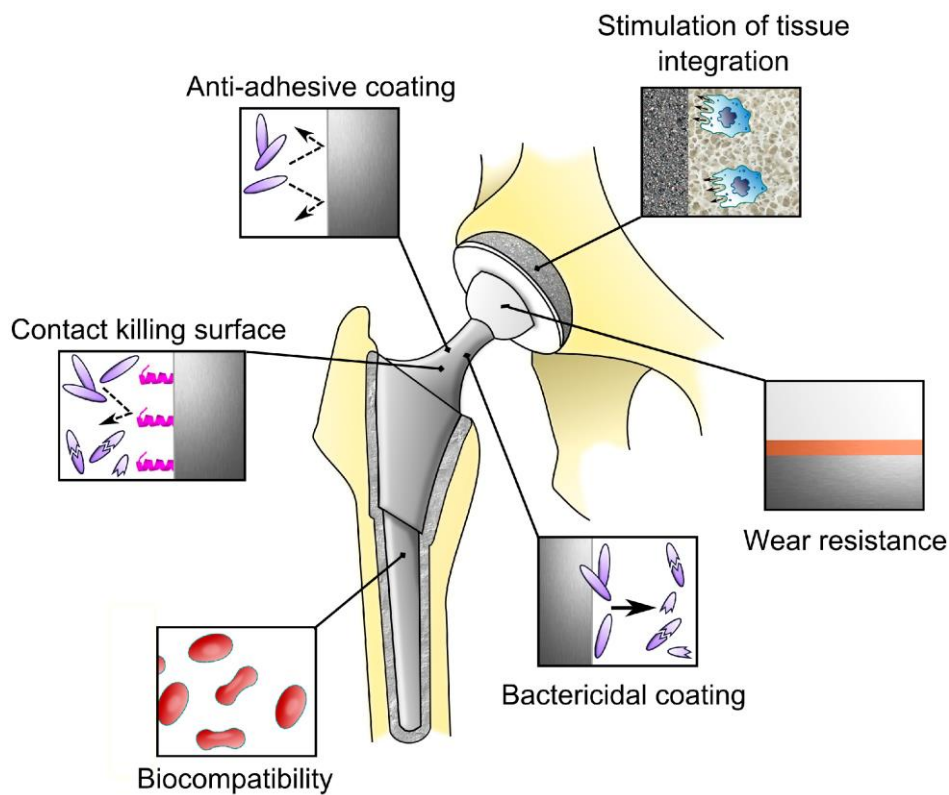


ABBILDUNG 2: EINSATZMÖGLICHKEITEN VON OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN AN VERSCHIEDENEN STELLEN EINES IMPLANTATS [74]

Bei Oberflächen, die keiner großen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, könnte eine anti-adhäsive Oberfläche oder eine nicht abbaubare Beschichtung mit antimikrobiellen Substanzen vorteilhaft sein, um einer bakteriellen Besiedelung vorzubeugen. Der dem Knochen zugewandte Teil der Hüftgelenkspfanne könnte von einer pro-osseointegrativen Oberfläche profitieren. Hierbei stehen Veränderungen im Bereich der Oberflächenrauigkeit oder -beschichtung mit biodegradierbaren, knochenwachstumsfördernden Substanzen zur Verfügung, welche optimalerweise zusätzlich antibakterielle Eigenschaften aufweisen, um mögliche Kontaminationen zu verhindern [74]. Unterschiedliche funktionelle Bereiche finden sich sowohl bei orthopädischen als auch bei dentalen Implantaten.

Im Folgenden soll ausschließlich auf die Entwicklung aktuell vielversprechender, werkstoffkundlicher Ansätze zur Verhinderung und Reduktion implantat-assoziiertes bakterieller Infektionen eingegangen werden. Hierbei liegt der Fokus auf möglichen antibakteriellen sowie entzündungsmoderierenden Oberflächenmodifikationen, um die bakterielle Biofilmbildung zu verhindern und so die Grundlage implantat-assoziiertes Infektionen zu unterbinden.

1.3.5 Aktuelle antimikrobielle Beschichtungen und Verfahren

1.3.5.1 Passive Oberflächenmodifikationen / Antiadhäsive Moleküle zur Verhinderung der Adhäsion

Bei der passiven Oberflächenmodifikation sollen Bakterien an der Ansiedelung gehindert und damit die Biofilmbildung erschwert oder unterbunden werden, um dem körpereigenen Immunsystem mehr Zeit zur Bekämpfung planktonischer Organismen zu geben. Nachteilig ist dabei jedoch, dass auch körpereigene Zellen an der Besiedelung von Oberflächen gehemmt werden können, was den Einsatz dieser Beschichtungen bei dauerhaft osseointegrierten Implantaten erschwert [74]. Follmann et al. wiesen für Multilayerbeschichtungen aus N-Trimethyl Chitosan (TMC) und Heparin (HP) anti-adhäsive Eigenschaften nach [75, 76]. Für die von Mikroorganismen synthetisierte, stark heterogene Gruppe der amphiphilen Biosurfactants konnten Rovardo et al. positive Effekte bezüglich der Reduktion von Biofilmen nachweisen [77, 78]. Modifikationen durch (Nano)-Oberflächenstrukturierungen zeigten unter bestimmten Bedingungen materialabhängige anti-adhäsive Erfolge durch die Variation der Oberflächenrauigkeit. Etablierter Standard für osseointegrierte Implantate sind Rauigkeiten im Bereich weniger Mikrometer. Die Ergebnisse dieser Studien sind folglich nur begrenzt übertragbar [79-81]. Natürliche superhydrophobe Oberflächen können die bakterielle Besiedelung deutlich reduzieren [82-85], im medizinischen Bereich sind die Ergebnisse widersprüchlich. Teilweise konnte eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion, teils jedoch auch eine erhöhte Bakterienadhäsion nachgewiesen werden. Zytotoxizität stellt allerdings häufig ein Problem dar [86-90].

1.3.5.2 Aktive Oberflächenmodifikationen zur primären Abtötung oder Minimierung von Bakterien

Die primäre Aufgabe von aktiven Oberflächenmodifikationen ist die direkte Abtötung von Bakterien durch Oberflächenkontakt oder Abgabe aktiver Substanzen. Silberbeschichtungen als etablierter Industriestandard [91-94] zeigen gute antibakterielle Eigenschaften, können bei höherer Konzentration jedoch negativen Einfluss auf die Osseokonduktivität haben [95-98]. Titandioxid zeigte je nach kristalliner

Struktur (Rutil, Anatas, Brookit) teils antibakterielle Eigenschaften, teilweise jedoch auch zytotoxische und gentoxische Effekte. Ein beobachteter Wirkungsverlust in wässriger Lösung sowie eine signifikant verringerte Adhäsion körpereigener Zellen macht einen erfolgreichen Einsatz unter physiologischen Bedingungen nicht uneingeschränkt möglich [99-101]. Ebenso zeigten sich für Kupfer und Zink teils widersprüchliche Effekte [102-107].

Bei der Verwendung des Halbmetalls Selen konnten in verschiedenen Studien antibakterielle und antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden [108-110].

Unter den Nichtmetallen gilt Jod seit Jahren als Standard zur Wund- und Hautdesinfektion [111, 112]. Auch der Einsatz von Jodpartikeln auf Implantaten wurde in Studien erforscht und als vorteilhaft im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten beschrieben [113-115].

Oberflächenbeschichtungen mit Antibiotika verfolgen das Ziel einer initialen, kontrollierten Abgabe (Vancomycin, Cefuroxim, Gentamicin) oder einer kovalenten Anbindung (hauptsächlich Vancomycin). Initial konnte ein reduziertes Bakterienwachstum beobachtet werden, ein entscheidender Nachteil des Antibiotikaeinsatzes stellt jedoch die Gefahr steigender Resistenzen dar [116-123].

Chitosan ist ein polykationisches Polymer mit einer natürlichen hemmenden Wirkung auf Pilze, Bakterien und Viren [124, 125]. Die antibakterielle Wirkung und die Biokompatibilität von Chitosan-Derivaten sind dabei eng an die Substituenten und den prozentualen Substitutionsgrad des quartären Amins gebunden [125-127]. Allerdings wurden auch Störungen bei der Differenzierung und Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen sowie zytotoxische Effekte an Mäusefibroblasten nachgewiesen [128].

Auch in der Verhinderung des Wechsels von der planktonischen in die sessile Lebensweise oder der Unterdrückung der Expression von Virulenzgenen durch gezielte Manipulation des N-Acyl-Homoserinlaktin-basierten QS-Systems sehen Chen et al. [129] sowie viele andere Autoren [130-134] einen möglichen Mechanismus zur erfolgreichen Bekämpfung von Biofilmen und Infektionen. Ebenso wurden für die Verwendung von Furanon-Derivaten positive Erfolge bei der Unterdrückung der Biofilmbildung bestätigt

[135, 136]. Die alleinige Anwendung von QS-Inhibitoren im medizinischen Bereich ist bis jetzt anhand der Datenlage allerdings fraglich und bedarf weiterer Forschung.

Die Verwendung von Enzymen wie Lysostaphin zur bakteriellen Bekämpfung erwies sich im Bereich medizinischer Biomaterialien (etwa Celluloseverbände, Kathether, Biomesches) als vorteilhaft. Für eine Verwendung von Enzymen als Implantatbeschichtung liegen zum Zeitpunkt der Recherche noch zu wenig Erkenntnisse vor. Körpereigenes Lysozym könnte in den nächsten Jahren noch an Bedeutung gewinnen [137, 138].

Eine weitere Möglichkeit stellt die Nutzung von Zytokinen, insbesondere Interleukin 12 (IL-12) und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) dar, deren primäres Ziel die positive Beeinflussung von Immunzellen der ersten Linie durch Anlockung und Steigerung der Makrophagenaktivität ist. Bereits die alleinige Administration von Zytokinen konnte die Infektionsrate deutlich senken [139, 140]. Ebenso konnte die Effektivität von Antibiotikabehandlungen durch die Kombination mit IL-12 nochmals gesteigert werden [141].

Weiterhin liegt noch keine ausreichende Erfahrung auf dem Gebiet der Nanopartikelnutzung im medizinisch-implantologischen Bereich vor. Karlsson et al. beschreiben beispielsweise schädliche Auswirkungen auf das menschliche Lungenepithel, insbesondere für Kupfer(II)oxid-Nanopartikel [142].

In Hinblick auf die zuvor dargestellten Kriterien einer idealen Implantatbeschichtung zeigt sich, dass jede Beschichtung zwar nachgewiesene, positive Eigenschaften aufweist, jedoch nicht als ideal gelten kann und dass eine in allen Bereichen herausragende, vielseitige, bedenkenlos einsetzbare und zusätzlich wirtschaftlich tragbare Beschichtung aktuell nicht zu existieren scheint. Daher ist die weitere Erforschung und Entwicklung von Implantatbeschichtungen von größter Relevanz.

An den Kriterien einer idealen Beschichtung muss sich auch die in dieser experimentellen Arbeit verwendete Implantatbeschichtung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ messen. Diese Beschichtung wurde ausgewählt, weil $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in physiologischer Umgebung nachgewiesenermaßen als Vorläufermolekül für HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) dient [14],

welches wiederum die wichtigste, anorganische Komponente von natürlichem Knochenmaterial darstellt. Aus diesem Grund konnten sich Calciumphosphate, speziell HA, als ein klinischer Standard für Implantatbeschichtungen etablieren [143, 144]. Die Umwandlung In vitro ist dabei eine rein thermodynamisch getriebene Lösungs-Fällungsreaktion der Calciumionen des gelösten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und freien Phosphationen des umgebenden Mediums (z.B. SBF / DMEM) bei alkalischem pH, welche zur Bildung von $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ führt.

1.3.6 Die Relevanz von Calciumhydroxid in der Zahnmedizin

1.3.6.1 Antimikrobielle Wirkmechanismen von Calciumhydroxid

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ ist eine stark alkalisch reagierende Substanz, gesättigte wässrige Lösungen haben einen pH-Wert von 12,4. Entsprechende Lösungen und Pasten werden in der Zahnmedizin seit langem erfolgreich als temporäre Wurzelkanaleinlage zur Desinfektion genutzt. 90% aller Wurzelkanäle sind nach Calciumhydroxid-Einlage bakterienfrei. Die dissoziierten Hydroxylionen/ OH^- -Radikale reagieren stark oxidierend, unspezifisch und intensiv mit diversen organischen Verbindungen. Die Reaktivität des Hydroxyl-Radikals ist dabei so hoch, dass es kaum zu einer nennenswerten Diffusion kommt und die Wirkung eher lokal an der Stelle der Entstehung der Hydroxylionen begrenzt bleibt. Die antimikrobielle / abtötende Wirkung beruht hierbei auf mehreren Mechanismen [145]. Einerseits spalten Hydroxylionen Wasserstoffatome von ungesättigten Fettsäuren und führen so zur Bildung von freien Lipid-Radikalen. Diese wiederum reagieren mit Sauerstoff, was in der Bildung von Lipid-Peroxid-Radikalen resultiert, welche nun wieder ein Wasserstoffatom aus einer weiteren ungesättigten Fettsäure abspalten können und so eine radikalische Kettenreaktion ermöglichen. Letztendlich führt dies zur massiven Schädigung der zytoplasmatischen Zellmembran. Wichtige Aufgaben der Zellmembran, wie die Gewährleistung einer selektiven Permeabilität, die Aufrechterhaltung von intrazellulären Ionen- und Protonengradienten sowie ein gerichteter Stofftransport, sind somit gestört und führen zum Untergang der Zelle [146].

Darüber hinaus ist der Metabolismus jeder Zelle stark von der korrekten Funktion seiner Enzyme abhängig. Jedes Enzym verfügt über einen optimalen Arbeitsbereich bezüglich

des pH-Wertes. Abweichungen davon führen zur Reduktion der Aktivität und der Umsatzrate dieses Enzyms oder zur Desintegration des Moleküls. Die starke Alkalisierung durch Ca(OH)_2 führt zum Aufbrechen von Ionenbindungen, welche neben hydrophoben Wechselwirkungen, Disulfidbrücken und Van der Waals Kräften die Tertiärstruktur von Proteinen und Enzymen erhalten. Kovalente Bindungen der Primärstruktur bleiben dagegen erhalten. Die unkontrollierte Entfaltung der Proteine und die Auflösung der Tertiärstruktur führen zum Funktionsverlust von Enzymen und Strukturproteinen, eine Unterbrechung des Zellmetabolismus ist die Konsequenz [147, 148].

Der dritte bedeutende Mechanismus von Ca(OH)_2 bei der Abtötung von Bakterien beruht auf der Schädigung der bakteriellen DNA. Die direkte Reaktion von Hydroxylionen und reaktiven Sauerstoffprodukten mit der bakteriellen DNA führt zur Aufspaltung der DNA-Stränge und zu Strangbrüchen. Infolgedessen kommt es zu Funktions- und Genverlusten. Angriffspunkt ist hierbei die jeweilige Nukleinbase Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin, wahlweise auch der glykosidisch verknüpfte Zucker Ribose. Die Replikation und Translation des Erbgutes ist somit nicht mehr gewährleistet und führt unweigerlich zum Untergang zellulärer Stoffwechselforgänge. Weiterhin ist auch die Induktion von letalen Mutationen als möglicher Mechanismus in Betracht zu ziehen [147, 149].

1.3.6.2 Bildung von knochenähnlicher Substanz durch Calciumhydroxid

So wie die guten antimikrobiellen Eigenschaften von Ca(OH)_2 in der Zahnmedizin Anwendung als temporäre Wurzelkanalfüllung finden, wird die Substanz ebenso erfolgreich zur Induktion von osteoider Hartschubstanzbildung im Sinne einer Apexifikationsbehandlung wurzelunreifer Zähne nach Untergang/Absterben der Zahnpulpa eingesetzt, beispielsweise nach Avulsions- oder Intrusionstraumata [150]. Bei der Apexifikationsbehandlung wird Ca(OH)_2 meist als Paste mit Wasser in den aufbereiteten und gereinigten Wurzelkanal eingebracht und gegebenenfalls nach 3-6 Monaten oder nach röntgenologisch sichtbarer Resorption gewechselt. Die darauf

einsetzende Hartschubstanzbildung ist in der Regel nach 6-24 Monaten abgeschlossen und zeigt sich histologisch als knochenähnliche Substanz [151].

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung von Ca(OH)_2 stellt die indirekte Überkappung von Dentin und die direkte Überkappung von Pulpawunden dar. Dabei wird Ca(OH)_2 in einer dünnen Schicht aufgetragen, um einen gezielten Reiz für die Neubildung von kalzifizierter Hartschubstanz über der eröffneten Pulpa, dem sogenannten Bridging, zu setzen. Direkte Überkappungen haben eine sehr hohe Erfolgsquote bezüglich der Vitalerhaltung. Bei offenem Apex können Erfolgsquoten von 90-95%, bei geschlossenem Apex sogar annähernd 100% erreicht werden. Als ebenso erfolgreich stellt sich die Behandlung mit Calciumhydroxid-Pasten nach einer Mikroamputation der Zahnpulpa nach Cvek dar, welche zu 94-97% bei offenem Apex und 98% bei geschlossenem erfolgreich sind [152].

Für die induktiven Eigenschaften von Ca(OH)_2 auf die Hartgewebs- und Knochenbildung spielt das Hydroxylion die wichtigste Rolle. Durch die Erhöhung des pH-Wertes ist es möglich, von Osteoklasten und Odontoklasten sezernierte Säuren zu neutralisieren und so einer Demineralisation von Knochen und Dentin entgegen zu wirken. Weiterhin wird durch den erhöhten pH-Wert die alkalische Phosphatase aktiviert. Diese hat je nach Gewebe und Temperatur einen Aktivierungsbereich bei einem pH-Wert zwischen 8,6 und 10,3 und ist für eine geregelte und korrekte Mineralisation von Knochenmatrix nötig. Mutationen des Enzyms sind je nach Ausprägungsgrad bereits In utero oder postnatal letal. Leichtere mutationsbedingte Modifikationen der alkalischen Phosphatase führen zu diversen Fehlregulationen des Stoffwechsels mit dem Krankheitsbild der Hypophosphatasie. Mögliche Folgen sind unter anderem Mineralisationsstörungen, Stabilitätsverlust, Deformitäten und frühzeitiger Milchzahnverlust [151, 153-155].

1.3.7 Calciumphosphate als Standardbeschichtung für lasttragende Implantate

Calciumphosphate, darunter HA-Beschichtungen, zeigen sowohl kurzfristig eine Verbesserung und Beschleunigung der ossären Einheilung als auch Vorteile bezüglich der Langzeitintegration. Knochen besteht im Wesentlichen aus den drei Zelltypen

Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sowie mineralisierter extrazellulärer Matrix (EZM). Die EZM besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen (Kollagen Typ I) und $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, wobei letzteres bereits 45% des Feuchtgewichts des Knochens ausmacht. Hydroxylapatit ist biokompatibel, biodegradierbar, osteokonduktiv, nicht toxisch und ruft keine inflammatorischen Effekte hervor [156-159].

Meist wird für die Beschichtung von Implantaten mit HA das kosteneffiziente und universell einsetzbare Plasma-Spray-Verfahren genutzt. Allerdings entstehen durch die hohen Temperaturen beim Beschichtungsprozess sehr dichte und kompakte Schichten, die sich hinsichtlich Porosität und Kristallgefüge deutlich vom natürlich vorkommenden HA unterscheiden. Es entsteht ein relativ inhomogenes Gefüge, in dem hochkristalline Bereiche in amorpher Umgebung auftreten [160, 161], welche jeweils eine andere Abbau- und Umwandlungskinetik aufweisen. Dies reduziert die mechanische Stabilität und könnte aufgrund von Delaminations- oder Enthftungsprozessen zum Implantatversagen führen [162].

Für den Umbauprozess von Calciumphosphaten durch Osteoklasten und Osteoblasten unter physiologischen Bedingungen erwiesen sich nach Bienengraber et al. homogene, gleichmäßig degradierbare und bei niedrigen Temperaturen hergestellte Beschichtungen als vorteilhaft. Zudem ist die Inkorporation von organischen Bestandteilen oder thermosensibler Substanzen besser möglich [163].

Weiterhin stößt die Plasma-Spray-Technik bei der Beschichtung von Objekten komplexerer Strukturen an ihre Grenzen, da keine gleichmäßige Abscheidung mehr garantiert werden kann. Eine Alternative bieten hier elektrochemische Abscheidungsverfahren sowie Ausfällungsverfahren aus übersättigten Lösungen, welche auch für komplexere geometrische Objekte geeignet sind und dünne, poröse Beschichtungen ermöglichen. Die höhere Energiezufuhr während der Synthese führt zu einem stärkeren Adhäsivverbund zwischen Beschichtung und Grundmaterial. Da in der Orthopädie und der Zahnmedizin bei Implantatinsertation Reibungskräfte auftreten, die die Integrität der Beschichtung gefährden, zeigt sich die aktive elektrochemische Abscheidung im Vergleich zum Plasma-Spray-Verfahren als überlegen [14].

Mit Calciumphosphaten als Implantatbeschichtung konnte ein klinischer Standard geschaffen werden, der bereits vielen Anforderungen wie guter Osseointegration, Biodegradierbarkeit und hoher Gewebeerträglichkeit gerecht wird. Eine Anforderung, die mit Calciumphosphaten allein bislang nicht realisiert werden konnte, ist eine antibakterielle bzw. antiinflammatorische Wirkung.

Eine Substanz, die genau diese Kriterien erfüllt, könnte Ca(OH)_2 sein, welches unter physiologischen Bedingungen nachgewiesenermaßen ein Vorläufermolekül von $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ist. Aufgrund der guten antibakteriellen Eigenschaften von Ca(OH)_2 sowie dessen Fähigkeit zur Anregung von osteoide Hartschichtbildung ist es im Bereich der Zahnmedizin bereits seit Jahrzehnten etablierter und zugelassener klinischer Standard.

Ließen sich diese Eigenschaften auch für Implantatbeschichtungen nutzen, könnte Ca(OH)_2 künftig eine wertvolle Ergänzung oder Alternative zu bislang etablierten CaP-Beschichtungen darstellen, insbesondere aufgrund der Tatsache, dass Ca(OH)_2 sowohl In vitro als auch In vivo in $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ umgewandelt wird. Daher liegt die Erprobung von Ca(OH)_2 im implantologisch-chirurgischen Bereich nahe.

1.4 Untersuchte histologische Entzündungsmarker zur Quantifizierung und Qualifizierung der Versuchsergebnisse: Ausgewertete Leukozyten-Arten

Die Leukozyten als zelluläre Abwehrfaktoren werden aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks gebildet. Aus myeloischen Stammzellen entstehen hierbei Granulozyten (welche sich je nach Inhalt ihrer namensgebenden Granula in Neutrophile, Eosinophile und Basophile untergliedern lassen) sowie Monozyten/Makrophagen. Gemeinsam bilden sie Faktoren der angeborenen Immunabwehr. Aus Lymphoiden Stammzellen werden die T- und B-Lymphozyten, welche Zellen der erworbenen Immunität bilden, und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gebildet. Letztere werden der angeborenen Immunität zugerechnet.

Neutrophile sind hierbei die Hauptvertreter der natürlichen angeborenen Abwehr und erste Abwehrzellen gegen pathogene Bakterien. Die Abtötung der Fremdorganismen erfolgt durch Phagozytose, exozytotische Freisetzung von intrazellulär in Granula

gespeicherten Stoffen (Hydrolasen, Lysozym, Elastase, Laktoferrin), sowie Bildung von Sauerstoffradikalen (Myeloperoxidase).

Etwa 3% aller Granulozyten sind Eosinophile Granulozyten, welche hauptsächlich der Parasitenabwehr über die Degranulation von lysosomalen Enzymen, dem Major Basic Protein (MBP), dem Eosinophil cationic protein (ECP) und Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) dienen. Basophile bilden etwa 1% aller Granulozyten und enthalten hauptsächlich Granula mit Heparin, Histamin und Leukotriene. Genau wie die Eosinophilen Granulozyten übernehmen sie bei der Bakterienabwehr nur eine untergeordnete Rolle. Monozyten, welche nach Zirkulation im Blut und Auswanderung ins Gewebe zu Makrophagen differenzieren, dienen hauptsächlich der Phagozytose pathogener Mikroorganismen und körpereigener, toter Zellen. Über die Freisetzung von Zytokinen fördern sie die Rekrutierung weiterer Granulozyten (speziell Neutrophiler Granulozyten). Des Weiteren übernehmen sie durch die Antigenpräsentation nach Phagozytose einen wichtigen Schritt bei der Aktivierung der adaptiv erworbenen Immunantwort. Weiterhin dienen sie bei der Geweberemodellierung / Wundheilung durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren.

Die T-Lymphozyten steuern hauptsächlich über Sekretion von Zytokinen die adaptive, erworbene Immunantwort und untergliedern sich in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen, welche zur zellulären adaptiven Immunabwehr zählen. B-Lymphozyten, welche hauptsächlich durch die Fähigkeit der Antikörperbildung und Differenzierung zur Plasmazelle der Abwehr dienen, zählen zur humoralen adaptiven Immunabwehr [68, 69].

2. Material und Methoden

2.1 Studienbeschreibung

Für die In vivo Versuche (Aktenzeichen 55.2.-2531.01-75/14) wurden bei jedem der insgesamt 16 Versuchstiere aus drei Versuchsgruppen jeweils zwei Implantate in den Femurkondylen gesetzt, wobei linksseitig jeweils das Ca(OH)_2 -beschichtete und rechtsseitig jeweils ein unbeschichtetes Titanimplantat eingebracht wurde. Da die In vitro Studie und die In vivo Studie methodisch aufeinander aufbauen, wurde die identische Implantatbeschichtung mit gleichbleibenden Parametern verwendet. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Homogenität, Rauigkeit, Dichte und Adhäsionskraft ließen sich mit einer Kombination aus den folgenden untersuchten Parametern bei der elektrochemischen Abscheidung erreichen:

- 0.084 mol/l $\text{Ca(NO}_3)_2$
- 0.025 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$
- 0.05 mol/l $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- Elektrolyttemperatur von 50°C
- Stromdichte von 100mA/cm²

Simultan zur Implantatsetzung wurden die Tiere der jeweiligen Gruppe beidseitig mit 0 KBE, 100 KBE oder 1000 KBE *S. aureus* infiziert. Nach 7-tägiger Einheilphase wurden die Gelenke der euthanasierten Tiere eröffnet und Synoviaflüssigkeit sowie periartikuläres, implantatnahes Weichgewebe zur histologischen Aufbereitung entnommen.

Der Verfasser der Arbeit assistierte nicht-operativ während der Implantatinsertation und der Entnahme der Proben. Die Gewebeproben und die Synoviaprobe wurden vom Verfasser aufbereitet, histologisch untersucht und ausgewertet. Die Implantate und die Ca(OH)_2 -Beschichtungen sowie die Bakterienkulturen wurden vorab in den Laboratorien des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg hergestellt. Eine vollständige Materialliste befindet sich unter 6.7. im Anhang.

2.1.1 Versuchstiere

Für die Durchführung des Versuchs wurden Auszuchtkaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit gewählt. Nach Anlieferung der Tiere wurde der tägliche Standardablauf

circa zwei Wochen lang trainiert, um Stress bei den Kaninchen in der Folgezeit zu minimieren, insbesondere während der regelmäßigen Untersuchungen. Das Training war hierbei an die klassische Konditionierung angelehnt, sodass gezeigtes, erwünschtes Verhalten mit einem positiven Reiz, in diesem Fall besonderem Futter, verstärkt wurde. Im Fokus standen vor allem die angstfreie und stressfreie Entnahme aus dem Käfig sowie die Rücksetzung und Fütterung durch die Pfleger, die rektale Kontrolle der Körperkerntemperatur, die Gewichtsmessung des Tieres sowie die Kontrolle auf Verletzungen, Bewegungseinschränkungen, Fellqualität und Fellverklebungen.

Zur Verbesserung der Haltungsbedingungen und zur Schaffung einer ruhigen, gleichbleibenden Atmosphäre für die kommende Versuchsphase wurden die Tiere stets persönlich von ausgebildetem Tierpflegepersonal umsorgt. Körperlicher Kontakt, Gesprächsführungen und Zuwendung dienten außerdem dazu, die Tiere an den Umgang mit dem Menschen zu gewöhnen.

2.1.2 Haltungsbedingungen

Für die Gewährleistung artgerechter Haltungsbedingungen sowie stets identischer Versuchsrahmenbedingungen wurden relevante Parameter überwacht und auf konstantem Niveau während der gesamten Eingewöhnungs- und Versuchsphase gehalten.

Die Raumtemperatur betrug konstant 18,0 °Celsius bei dauerhafter Frischluftzufuhr über die Lüftungsanlagen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-60%. Des Weiteren sorgte eine tageszeitabhängige Beleuchtung für die Simulation eines natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus, wobei die Tag- und Nachtphasen jeweils 12 Stunden andauerten.

Für die Haltung der Tiere wurden Käfige des Typs EC2 mit einer effektiven Nutzfläche von 4252 cm² pro Tier verwendet, was ausreichend für alle natürlichen Bewegungsabläufe ist. Die Kunststoffanteile des Käfigs sind aus Polypropylen oder Noryl gefertigt, was die hygienische Reinigung sowie die Desinfektion erleichterte und somit auch eine weitgehende Keimfreiheit für die Versuche ermöglichte. Durch die Perforation des Bodens und die leicht abfallende Bodenplatte wurden Schmutz und Ausscheidungen des Tieres direkt aus dem Käfig befördert. Dadurch wird eine optimale Hygiene im

Tierversuch gewährleistet und das Risiko für eine ungewollte Nebeninfektion während der Einheilphase der Implantate nach der Operation gesenkt. Zusätzlich ist hierdurch eine gute Durchlüftung gewährleistet, die Entstehung von Feuchtigkeit im Käfig wird vermindert und die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung ungewollter Nährböden für Mikroorganismen, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, wird effektiv gesenkt.

Ein integriertes Schutzhaus als Rückzugsmöglichkeit mit erhöhtem Liegeplatz bot den Kaninchen die Möglichkeit, sich körperlich zu betätigen. Dies entspricht nicht nur dem natürlichen Verhalten von New Zealand White Kaninchen, sondern ist zudem für die Kräftigung der Hinterläufe sowie zur Vorbeugung der Knochengewebsdegeneration durch mangelnde Belastung relevant.

Weiterhin wurde stets auf die Verfügbarkeit von Heu geachtet, da dauerhafter Zugang zu frischem Heu laut Studien für erhöhtes Wohlbefinden und geregeltes Wachstum der Inzisiven der Tiere sorgt [164, 165]. Aus infektionstechnischen Gründen wurde das Heu stets gammabestrahlt.

Das Hauptfutter Ssniff K-H, ausreichend Nagehölzer zur Zahnpflege und Förderung des natürlichen Nagebedürfnisses sowie getrocknete Fruchtstücke (Plexx Fruity Bites) als Belohnungsfutter bei der Konditionierung stellten eine vollwertige Versorgung der Tiere während der Versuchsphase sicher.

2.1.3 Versuchsdurchführung

Im Folgenden wird ausführlich auf die einzelnen Phasen der Versuchsdurchführung eingegangen.

2.1.3.1 Anlegen der Bakterienkulturen

Für die In vivo Versuche wurden Bakterienkulturen von *S. aureus* (RN4220) nach dem folgenden Ablauf angefertigt. Zunächst wurden Übernachtskulturen angesetzt, die am nächsten Tag verdünnt und zur Kontrolle bei 37 °C für 24 Stunden ausplattiert wurden, wobei von einer Ausgangskonzentration von $6 \cdot 10^9$ KBE/ml ausgegangen wurde. Diese wurde auf 10000 KBE/ml verdünnt, um durch eine Applikation von 10 µl pro Bohrloch eine effektive Kontamination mit 100 KBE zu erhalten. Für weitere Versuchsreihen

wurde analog vorgegangen, lediglich die Verdünnung wurde angepasst, um eine Kontamination mit 1000 KBE zu erhalten.

2.1.3.2 Einteilung der Versuchstiere

Die Versuche wurden mit insgesamt 16 Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit durchgeführt. Es wurden 3 funktionale Versuchsgruppen (0, 100 und 1000 KBE) gebildet. Die Bezeichnung der Gruppen richtet sich nach dem Datum der Euthanasie, welche an 5 Terminen stattfand (Tabelle 2).

TABELLE 2: EINTEILUNG DER VERSUCHSTIERE

Gruppe	Inokulierte Keimanzahl	Anzahl der Versuchstiere	Entnommene Proben für die histologische Untersuchung
19.05.15	100 KBE	3	Synovia
07.07.15	1000 KBE	3	Synovia + Gewebe
21.07.15	1000 KBE	2	Synovia + Gewebe
13.04.16	0 KBE	4	Synovia + Gewebe
21.04.16	0 KBE	4 ¹	Synovia + Gewebe

2.1.3.3 Operation mit Implantation und Infektion der Tiere

Die Tiere wurden einzeln mittels Injektionsnarkose für die Operation vorbereitet. Dabei kam eine Mischung aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl zum Einsatz. Midazolam zählt zu den Benzodiazepinen und vermittelt seine Wirkung über die Bindung am GABA_A-Rezeptor. Durch den verstärkten Chlorideinstrom kommt es zur Hyperpolarisation und zur Hemmung neuronaler Aktivität. Fentanyl als stark wirkendes Opioid hemmt sowohl prä- als auch postsynaptisch die Weiterleitung von Schmerzimpulsen und Aktionspotentialen über die G-Protein vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase mit folgendem Abfall der cAMP-Konzentration. Die daraus resultierende Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle vermittelt die zentrale und periphere Wirkung [60].

¹ Ein Tier dieser Gruppe wurde aufgrund eines Beinbruchs bereits nach 6 anstatt nach 7 Tagen euthanasiert.

Medetomidin wirkt als hochspezifischer α_2 -Adrenorezeptor-Agonist im Speziellen direkt auf das zentrale Nervensystem mit sedativ-hypnotischer, muskelrelaxierender sowie teils analgetischer Wirkung [166]. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde das Inhalationsnarkotikum Isofluran verwendet, welches bei New Zealand White Rabbits mit geringem Risiko standardmäßig eingesetzt werden kann [167]. Die Gabe sämtlicher Medikamente wurde durch den Tierarzt durchgeführt, der während der gesamten Operation auch die Vitalparameter der Tiere überwachte.

Zu Beginn der Operation wurden die Operationsgebiete rasiert, mit Octenisept-Lösung desinfiziert und steril abgedeckt. Anschließend wurde ein etwa 3 cm langer, vertikaler Schnitt über den Kniegelenken durchgeführt. Nach lateraler Verlagerung der Patella und Eröffnung der Kniegelenkkapsel wurde der Femurknochen manuell fixiert. Mit einem mikromotorgetriebenen, geraden Dentalhandstück wurde via Trepanbohrer (\varnothing 2,0 mm) die Kavität zur Aufnahme des Implantats im distalen Femurknochen bzw. Femurkondyle unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung 6 mm tief präpariert (Abbildungen 3 und 4).

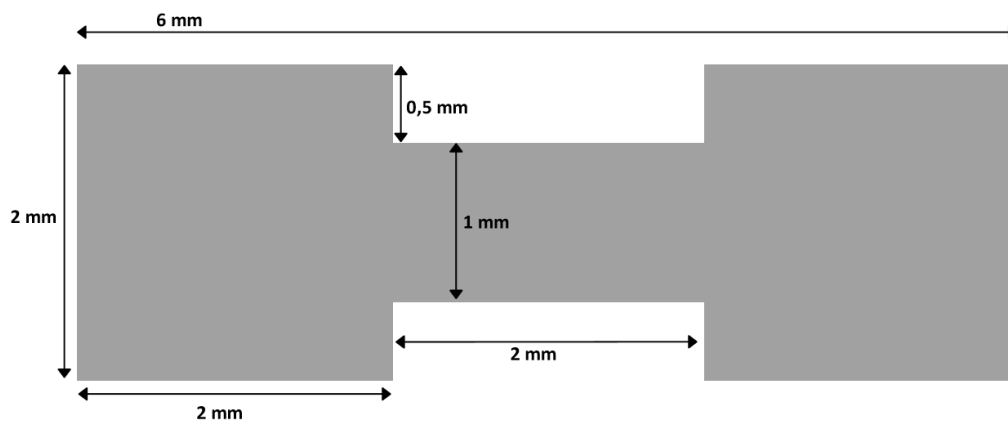


ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES IMPLANTATS, BESCHICHTUNGSOBERFLÄCHE CA. 42MM²



ABBILDUNG 4: RÖNTGENAUFNAHME NACH EUTHANASIE ZUR VERDEUTLICHUNG DER IMPLANTATPOSITION

Die Angulation zur Femurachse betrug dabei ca. 45°. Abhängig von der jeweiligen Versuchsreihe erfolgte nun die Inokulation von entweder 0, 100 oder 1000 KBE *S. aureus* und die Insertion des Implantats, linksseitig mit und rechtsseitig ohne Ca(OH)₂-Beschichtung. Schließlich erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss mit Hilfe des nicht resorbierbaren, monofilen Materials Seralon. Als zusätzliche Wundversorgung wurde eine dünne Schicht Hansaplast Sprühpflaster aufgebracht. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte für Medetomidin mittels Atipamezol, für Midazolam mittels Flumazenil und für Fentanyl mittels Naloxon, welche kompetitive Antagonisten am jeweiligen Rezeptor darstellen.

Als initiale postoperative Schmerztherapie wurde zusätzlich das Meloxicam-Präparat Metacam verabreicht. Hierbei handelt es sich um ein nichtsteroidales Antirheumatikum (NSAR/NSAID) aus der Gruppe der Oxicame. Es zeigt eine leichte COX-2 Selektivität und wird aufgrund der guten Anreicherung in der Synovia vor allem in der Therapie chronisch entzündlicher Arthropathien eingesetzt [168, 169].

2.1.3.4 Versuchsbegleitendes Monitoring des Gesundheitszustandes

Um einen komplikationsarmen Ablauf zu ermöglichen, wurden während der gesamten Versuchsdauer zahlreiche Parameter in Kontrolluntersuchungen erfasst. Dies schloss die regelmäßige Überwachung des Gesundheitszustandes in Hinblick auf vier zentrale Kriterien ein (Tabelle 3).

TABELLE 3: KRITERIEN ZUR BEURTEILUNG DES GESUNDHEITZUSTANDES DER VERSUCHSTIERE IN ANLEHNUNG AN DR. CYNIS [170]

Beobachtung	Punktwertung
<p>Beobachtungskriterium I: Körpergewicht</p> <p>Da bei den Tieren aufgrund ihres Alters noch ein Restwachstum zu erwarten war, wurden lediglich Abnahmen als kritisch betrachtet. Zur Verringerung von Messungenauigkeiten erfolgte die Messung stets am Morgen zu einer ähnlichen Uhrzeit.</p> <ul style="list-style-type: none"> - unbeeinflusst oder Anstieg - Gewichtsreduktion <5% - Gewichtsreduktion 5-10% - Gewichtsreduktion 11-20% - Gewichtsreduktion >20% 	<p style="text-align: right;">0</p> <p style="text-align: right;">1</p> <p style="text-align: right;">5</p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">20</p>
<p>Beobachtungskriterium II: Allgemeinzustand</p> <p>Relevante Aspekte stellten die Fellbeschaffenheit, das Fellpflegeverhalten, der Zustand von Augen, Körperöffnungen und Haut sowie die Durchblutung und die Oberflächentemperatur dar.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend - Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege) - Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb; erhöhter Muskeltonus - Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus - Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an 	<p style="text-align: right;">0</p> <p style="text-align: right;">1</p> <p style="text-align: right;">5</p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">20</p>

<p>Beobachtungskriterium III: Spontanverhalten</p> <p>Das Kriterium schloss Schlafrhythmus, Reaktion und Neugier in Bezug auf die Umgebung, Koordinationsstörungen, Schmerzlaute oder autoaggressives Verhalten bis hin zur Autotomie ein.</p> <ul style="list-style-type: none"> - normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) 0 - geringe Abweichungen vom Normalverhalten 1 - ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik 5 - Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörungen 10 - Schmerzlaute beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression, Autotomie) 20 	
<p>Beobachtungskriterium IV: Klinischer Befund</p> <p>Relevant waren die rektale Körperkerntemperatur, Puls, Atemrhythmus, Atemgeräusche, Zustand der Schleimhäute sowie tastbare Veränderungen.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatur, Atmung und Puls normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet 0 - geringe Abweichungen von der Normalsituation 1 - Temperaturabweichung 1 – 2 °C, Atmung und Puls +/- 30% 10 - Temperaturabweichung >2 °C, Atmung/Puls +/- 50%; Ø eines tastbaren Tumors =2 cm, Abszessbildung, Fistelung 20 	
Bewertung, Maßnahmen	Punktsumme
<ul style="list-style-type: none"> - Belastungsgrad 0 = keine Belastung 0 - Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten 1-9 - Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; ggf. tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie) 10-19 - Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung; Tierschutzbeauftragten konsultieren; bei mehrtägiger Andauer der Belastung - ggf. auch sofort - Versuch abbrechen, tierärztliche Versorgung einleiten, ggf. Tier einschläfern 20 oder höher 	

2.1.3.5 Euthanasie und Probenentnahme

Für die initiale Narkose kam zunächst eine Kombination aus Ketamin und Xylazin (Hellabrunner Mischung) zum Einsatz [171]. Ketamin zählt zu den N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptorantagonisten und führt zu einer dissoziativen Anästhesie. Bei Xylazin handelt es sich um einen α_2 -Adrenorezeptor-Agonist, welcher an prä- und postsynaptischen Nervenden primär sedierend, muskelrelaxierend und analgesierend und somit ähnlich wie Medetomidin wirkt [171, 172].

Für die Euthanasie selbst wurde schließlich Pentobarbital verwendet. Diese zu den Barbituraten gehörige Substanz bindet – ähnlich wie Benzodiazepine – direkt am GABA_A-Rezeptor, führt jedoch zur unmittelbaren Öffnung des Chloridkanals, auch ohne Einwirkung von GABA. Durch den Chlorideinstrom kommt es zur Hyperpolarisation und die neuronale Aktivität wird gehemmt, was in ausreichender Konzentration zum Herz-Kreislauf-Stillstand führt [60].

Nach der Euthanasie erfolgte die Probenentnahme (Abbildungen 5 bis 7). Dazu wurden die Nähte entfernt und die Gelenke mit der identischen Schnittführung wie bei der Implantation eröffnet. Zunächst wurde Gelenksflüssigkeit mit der Mikroliterpipette aufgenommen, auf Objektträgern aufgebracht, ausgestrichen und luftgetrocknet. Darüber hinaus wurden implantatnahe Weichgewebeproben entnommen.



ABBILDUNG 5: KNIEGELENK EINES VERSUCHSTIERES NACH EUTHANASIE UND VOR GELENKSERÖFFNUNG



ABBILDUNG 6: KNIEGELENK NACH ERÖFFNUNG DER OBERFLÄCHLICHEN NAHT



ABBILDUNG 7: VOLLSTÄNDIG ERÖFFNETES KNIEGELENK, BEREIT ZUR PROBENENTNAHME

Des Weiteren wurden für einen bakteriellen Nachweis jeweils eine weitere Weichgewebe-, Synovia- und Knochenprobe pro Tier und Implantationsstelle sowie das Implantat selbst entnommen und ausplattiert.

2.1.4 Untersuchung der entnommenen Proben

2.1.4.1 Bakterieller Nachweis durch Ausplattieren

Die zum bakteriellen Nachweis entnommenen Proben wurden jeweils nach einem bestimmten Verfahren aufbereitet und zu Ausgangssuspensionen verarbeitet.

Für die Gelenksaspiratproben wurden nach Eröffnung des Gelenks intraoperativ jeweils 10 µl Aspirat zu 40 µl isotonischer Kochsalzlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Labor wurden weitere 100 µl isotonische Kochsalzlösung hinzugefügt und dies als Ausgangslösung verwendet.

Für die Gewebeproben wurden jeweils Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 50 µl isotonischer Kochsalzlösung vorbereitet, in welchen die intraartikulär entnommenen und gewogenen Gewebestücke gelagert wurden. Anschließend folgte im Labor die manuelle Homogenisierung im Eppendorf-Reaktionsgefäß mittels geeignetem Stößel. Die weitere Zugabe von 100 µl Kochsalzlösung und Vortexen der Proben sowie kurze Lagerung ergaben die Ausgangslösung.

Die Knochenproben, jeweils etwa 0,5cm*0,5cm*0,5cm groß, wurden allesamt aus dem periimplantären Femurknochen gewonnen. Das jeweilige Gewicht wurde dabei aus der Differenz der Zentrifugenröhrchen mit und ohne Knochenprobe ermittelt, diese waren im Vorhinein mit 500 µl Kochsalzlösung befüllt worden. Nach der Homogenisierung der Knochenproben mittels Knochenmühle wurden jeweils 200 µl entnommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde als Ausgangslösung verwendet.

Für die Aufbereitung des Implantats wurde dieses nach Entnahme und unter Zugabe von 500 µl Kochsalzlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 10 Mal für jeweils 30s mit 15s Pause sonifiziert. Anschließend wurde die Lösung vier Mal für 15s mit jeweils 45s Pause gevortext, um die Ausgangslösung zu erhalten. Speziell im Bereich der orthopädischen Implantate zeigt sich die Sonifikation bei Implantaten mit anhaftendem Biofilm als effizient und sinnvoll [173, 174].

Die gewonnenen Ausgangslösungen wurden anschließend zur besseren Auswertbarkeit nach Bedarf mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und ausplattiert. Nach Anzucht bei 37 °C über 24 Stunden erfolgte die Zählung der Kolonien.

2.1.4.2 Histologische Aufbereitung der Proben

2.1.4.2.1 Herstellung der Gewebepreparate zur H.E. Färbung

Das entnommene Weichgewebe wurde in 4%-iger Formaldehyd-Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für mindestens 14 Tage gelagert, wobei die Formaldehyd-Lösung mindestens zwei Mal während dieser Zeit gewechselt wurde. Anschließend wurden die Präparate vor dem Einbetten in mit Wasser gefüllte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und jeweils für 10 Minuten gelagert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Präparate aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen entnommen, mit einer feinen Pinzette auf Cellulosestreifen überführt und in zuvor beschrifteten Einweg-Einbettkassetten fest verschlossen. Zuerst wurden die Präparate erneut in Wasser gelagert und etwa 8 Stunden später für die Übernachteinbettung in den Einbettautomaten überführt. Zur Paraffineinbettung wurde der Gewebeeinbettautomat Thermo Scientific Microm STP 120 des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin genutzt (Abbildung 8).



ABBILDUNG 8: THERMO SCIENTIFIC MICROM STP 120

Hierbei wurden die Präparate in einen Gitterkorb eingebracht, welcher anschließend in definierten Zeitabständen von einer Lösung in die nächste überführt wurde, um eine perfekte Entwässerung der Präparate zu gewährleisten, sodass diese in den letzten Schritten das Paraffin aufnehmen konnten. Zuletzt wurden die Einbettkassetten zum Abtropfen entnommen und bei Raumtemperatur bis zur völligen Erstarrung abgekühlt. Zur Verdeutlichung des Vorgangs und der verwendeten Tauchmedien sei hier das verwendete Standardeinbettschema aufgeführt (Tabelle 4).

TABELLE 4: VERWENDETES STANDARDEINBETTSHEMA ZUR PARAFFINEINBETTUNG

<i>Arbeits- schritt</i>	<i>Tauchmedium des jeweiligen Arbeitsschrittes</i>	<i>Dauer des Tauchgangs</i>	<i>Beginn des Tauchgangs</i>
1	Wasser		
2	50% Ethanol	2 Stunden	17:00 Uhr
3	70% Ethanol	2 Stunden	19:00 Uhr
4	70% Ethanol	2 Stunden	21:00 Uhr
5	80% Ethanol	2 Stunden	23:00 Uhr
6	96% Ethanol	2 Stunden	01:00 Uhr
7	100% Ethanol	2 Stunden	03:00 Uhr
8	100% Ethanol	2 Stunden	05:00 Uhr
9	Xylol	2 Stunden	07:00 Uhr
10	Xylol	2 Stunden	09:00 Uhr
11	Paraffin	2 Stunden	11:00 Uhr
12	Paraffin	2 Stunden	13:00 Uhr

Um für das Mikrotom schneidfähige Präparate zu erhalten, wurden diese aufgeblockt. Hierzu wurden die Einbettkassetten in dem dafür vorgesehenen, mit Paraffin gefüllten Wärmebecken des Aufblock-Geräts Leica EG1150 H (Abbildung 9) für ca. 5 Minuten eingelegt, sodass sich das Präparat im nächsten Schritt entnehmen ließ.



ABBILDUNG 9: AUFBLOCK-GERÄT LEICA EG1150 H

Ein Aufblockrahmen wurde bis kurz unter den Rand mit Paraffin gefüllt und kurz auf der Kälteplatte angekühlt, sodass sich am Boden eine hauchdünne, verfestigte Paraffindecke bildete. Auf diese dünne, zu erstarren beginnende Paraffinschicht wurde

nun die Gewebeprobe mit einer feinen Pinzette so platziert, dass bei der Nutzung des Mikrotoms möglichst große Bereiche orthogonal angeschnitten werden würden. Nach Ausrichtung der Probe wurde diese erneut für etwa 2 Sekunden auf die Kälteplatte gestellt, um die eingestellte Position zu festigen. Die untere, beschriftete Hälfte der Einbettkassette wurde aufgelegt, um eine Verwechslung der Präparate auszuschließen. Weiterhin diente der Rahmen der Einbettkassette der Fixierung im Mikrotom. Die restliche Aushärtung erfolgte anschließend bei Raumtemperatur über Nacht.

Nach vollständiger Aushärtung wurden die aufgeblockten Präparate durch leichtes Klopfen aus dem Aufblockrahmen entfernt. Die Blöcke wurden gesäubert und unnötiges Paraffin so zurückgeschnitten, dass ausreichend Abstand zum Präparat eingehalten wurde, jedoch keine unnötig extendierten Dünnschnitte entstehen (Abbildung 10). Dies begünstigte zum einen die spätere Handhabung der Schnitte beim Schneiden mit dem Mikrotom, zum anderen führt die Kürzung der Paraffinblöcke zur Schonung der Klingen des Mikrotoms und somit zu einer wirtschaftlicheren Arbeitsweise.



ABBILDUNG 10: AUFGEBLOCKTES UND BESCHRIFTETES PRÄPARAT

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Präparatblöcke mit der jeweiligen Probe nach oben in eine Petrischale gegeben. Diese wurde in einem isolierten Gefäß auf zerkleinertes Eis gestellt und mit einem Deckel abgedeckt. Das Paraffin wurde auf diese Weise langsam abgekühlt, um es in einen besser schneidfähigen Zustand zu überführen. Während der Abkühlungszeit der Präparate wurde das Rotationsmikrotom CUT 4060 auf die in der Testphase ermittelten Parameter eingestellt. Die Präparate wurden mit einer

Standardklinge mit einem Schliffwinkel von 35° und einem Klingenanstellwinkel von 20° am Rotationsmikrotom auf 4 µm Dicke geschnitten. Es wurden zusammenhängende Schnittbänder mit 4-5 Schnitten angefertigt, sodass ein kontinuierlicher Abschnitt des Gewebes untersucht werden konnte. Um möglichst viele verschiedene Anschnitte der Probe zu erhalten, wurden nach dem Erstellen des Schnittbandes jeweils 10-25 Schnitte mit einer Dicke von 40-100 µm verworfen, um anschließend erneut ein Schnittband anzufertigen. Der entstandene Dünnschnitt wurde mit einer Rasierklinge vom Trägertisch abgetrennt und mit einem feinen Pinsel in ein Wasserbad überführt. Hierzu wurde eine Petrischale mit Wasser gefüllt und auf einer temperaturgeregelten Wärmeplatte auf 42°C erhitzt. Alle Parameter sind in Vorversuchen an Testpräparaten erprobt worden. Besagte Dicke, Schnittwinkel und Temperatur erwiesen sich in der Kombination insofern als günstig, da es weder zur übermäßigen Überlagerungen von Strukturen aufgrund der Dicke, zu Zerreißen von Gewebe aufgrund ungeeigneter Strecktemperaturen, noch zur Aufrollung der Präparate durch ungünstige Schnittwinkel kam.

Nach Beendigung des Streckvorgangs wurden die Paraffinschnitte auf Objektträger aufgezoogen, indem die gereinigten Träger vorsichtig im 45° Winkel und ohne Blaseneinschlüsse unter die schwimmenden Präparate geführt wurden. Die kurze Schnittkante der Präparatbänder wurde an der Oberkante der Objektträger angesetzt und diese anschließend im selben Winkel langsam aus dem Wasser gezogen. So konnte sich das Präparat auf dem Träger gut anlegen und überschüssiges Wasser leicht ablaufen. Aufgrund der Geometrie der beschnittenen Präparatblöcke ließen sich jeweils Präparatschnittbänder mit etwa 4-5 Präparatanschnitten gut auf einem Objektträger platzieren, die nun zum Trocknen senkrecht für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden. Eine Übersicht über die angefertigten Präparatschnitte ist in den Tabellen 5 bis 9 gegeben.

TABELLE 5: ANZAHL DER PRÄPARATSCHNITTE (GRUPPE 19.05.15; 100 KBE; 3 TIERE)

<p>Versuchsgruppe 19.05.15</p> <p>→ 100 KBE</p> <p>Es wurden nur Synoviaaspirate und keine Gewebeproben entnommen.</p>

TABELLE 6: ANZAHL DER PRÄPARATSCHNITTE (GRUPPE 07.07.15; 1000 KBE; 3 TIERE)

<p>Versuchsgruppe 7.7.15</p> <p>→ 1000 KBE</p>			
Tier	Seite des Kniegelenks	Anzahl der Objektträger	Anzahl der Präparatschnitte
Tier 1	Rechts a	21	75
Tier 1	Rechts b	10	45
Tier 1	Links	10	40
Tier 2	Rechts	20	94
Tier 2	Links	10	44
Tier 3	Rechts	20	102
Tier 3	Links	10	49
Gesamtzahl:		101	449

TABELLE 7: ANZAHL DER PRÄPARATSCHNITTE (GRUPPE 21.07.15; 1000 KBE; 2 TIERE)

<p>Versuchsgruppe 21.7.15</p> <p>→ 1000 KBE Gruppe</p>			
Tier	Seite des Kniegelenks	Anzahl der Objektträger	Anzahl der Präparatschnitte
Tier 1	Rechts	10	47
Tier 1	Links	10	49
Tier 2	Rechts	10	58
Tier 2	Links	10	41
Gesamtzahl:		40	195

TABELLE 8: ANZAHL DER PRÄPARATSCHNITTE (GRUPPE 13.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 13.04.16			
→ 0 KBE			
Tier	Seite des Kniegelenks	Anzahl der Objektträger	Anzahl der Präparatschnitte
Tier 1	Rechts a	5	28
Tier 1	Rechts b	5	30
Tier 1	Links a	5	32
Tier 1	Links b	5	39
Tier 2	Rechts a	5	42
Tier 2	Rechts b	5	25
Tier 2	Links a	5	28
Tier 2	Links b	5	29
Tier 3	Rechts a	5	27
Tier 3	Rechts b	5	30
Tier 3	Links a	5	35
Tier 3	Links b	5	24
Tier 4	Rechts a	5	28
Tier 4	Rechts b	5	26
Tier 4	Links a	5	28
Tier 4	Links b	5	30
Gesamtzahl:		80	468

TABELLE 9: ANZAHL DER PRÄPARATSCHNITTE (GRUPPE 21.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 21.4.16			
→ 0 KBE			
Tier	Seite des Kniegelenks	Anzahl der Objektträger	Anzahl der Präparatschnitte
Tier 1	Rechts a	5	27
Tier 1	Rechts b	5	27
Tier 1	Links a	5	21
Tier 1	Links b	5	36
Tier 2	Rechts a	5	26
Tier 2	Rechts b	5	24
Tier 2	Links a	5	26
Tier 2	Links b	5	24
Tier 3	Rechts a	5	25
Tier 3	Rechts b	5	24
Tier 3	Links a	5	22
Tier 3	Links b	5	25
Tier 4	Rechts a	5	24
Tier 4	Rechts b	5	24
Tier 4	Links a	5	26
Tier 4	Links b	5	28
Gesamtzahl:		80	410

Entparaffinierung

Die Färbung und Entparaffinierung erfolgte im Wesentlichen nach dem Verfahren gemäß Romeis [175], allerdings leicht modifiziert, da sich dies in Tests mit den gestellten Materialien bezüglich der Farbtintensität als günstiger erwies.

Nachdem die Präparate fest auf dem Objektträger fixiert waren, wurden jeweils 3 Objektträger in einem Färbegestell für 3-5 Minuten in einer mit Xylol gefüllten Glasküvette eingestellt, um das Paraffin wieder vollständig aus dem Präparat zu lösen und so eine bessere Färbung zu erreichen. Aufgrund der gesundheitsgefährdenden Xyloldämpfe erfolgte dies unter Absaugung.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Präparate durch Tauchen in Bäder mit absteigender Alkoholkonzentration weiter gereinigt und rehydriert. Die Objektträger wurden für 2 Minuten in Küvetten in absolutem Alkohol (>99,8% Ethanol) und dann jeweils für weitere 2 Minuten in 96%, 80% und 60% Ethanol eingestellt. Die jeweilige Flüssigkeit wurde dabei durch Verdünnung des reinen Alkohols mit destilliertem Wasser erzeugt. Anschließend erfolgte die Überführung in bidestilliertes Wasser, in welchem die Präparate bis zur Färbung zwischenlagerten, in der Regel etwa 5 Minuten. Zu betonen sei hierbei, dass es sich bei den jeweiligen Behandlungszeiten um vorgeschlagene Mindestzeiten seitens der Paraffinschnittverarbeitung nach Romeis handelt und die Präparate auch bei längerer Lagerung in dem jeweiligen Medium keinen Schaden nehmen.

2.1.4.2.2 Doppelfärbung der Gewebepreparate mit Hämalaun/Hämatoxylin-Eosin – H.E. Färbung

Exkurs: Hämalaun nach Mayer

Der Naturfarbstoff Hämatoxylin wird aus dem zerkleinerten roten Kernholz des Campechebaumes (Blauholz, Haematoxylon campechianum) aus Mittelamerika mittels Etherextraktion gewonnen. Hämatoxylin wird durch Oxidation in den eigentlichen Farbstoff Hämatein umgewandelt. Als Oxidationsmittel kommt hier in der Regel Kaliumiodid zum Einsatz (200mg oder 197mg Natriumiodid pro 1g Hämatoxylin in 1000ml Wasser). Durch die Zugabe mehrwertiger Metallionen, in aller Regel Al^{3+} in Form von Kalialaun, kommt es zur Chelatbildung des Hämateins mit den positiven Metallkationen und zur charakteristischen, dunkelblau-violetten Färbung der resultierenden Hämalaun-Komplexe.

Das Hämalaun nach Mayer wird zudem mit 50g Chloralhydrat als Stabilisator und 1g Zitronensäure versetzt. Hämalaun als positiver, basischer Farbstoff lagert sich im Zellkern an, die negativ geladenen Phosphatgruppen lagern sich dagegen an die Nucleinsäuren an. Die schwerlösliche Verbindung führt schließlich zu einer dauerhaften Färbung. Im Falle des hier verwendeten Ansatzes nach Mayer liegt das Hämalaun bedingt durch die Zitronensäure in saurem Milieu vor. Negativ geladene

Carboxylgruppen im Cytoplasma werden dadurch abgesättigt und eine selektive Kernfärbung durch das positiv geladenen Hämalaun wird erreicht [175].

Zuerst wurden die rehydrierten Präparate zur Kernfärbung in die eben beschriebene Mayers-Hämalaunlösung mittels Färbegestell in Glasküvetten eingebracht. Nach 2 Minuten Einwirkzeit erfolgte die Überführung der Färbegestelle in eine Küvette mit destilliertem Wasser. Hier wurden die Farbüberschüsse durch mehrfache, leichte Auf- und Abbewegungen der Färbegestelle entfernt. Anschließend erfolgte eine weitere Reinigung für 1 Minute, diesmal stehend in frischem, destilliertem Wasser. Im Anschluss wurden die Proben mit konstant zugeführtem, frischem Leitungswasser in einer Küvette gebläut. Um Schäden trotz geringer Strömung zu vermeiden, befanden sich die Präparate stets auf der zur Wasserzufuhr abgewandten Seite. Somit wurde über 5 Minuten eine konstante Frischwasserzufuhr für homogene Bläuung gesichert, Wasserüberschüsse sowie Restpartikel wurden abgeführt.

Als zweiter Farbstoff zur Gegenfärbung des Zytoplasmas wurde Eosin-G-Lösung 0,5% verwendet.

Exkurs: Eosin

Eosin G(elblich) / Y(ellow) ist ein chemisch hergestellter und der wahrscheinlich am häufigsten verwendete Farbstoff zur Färbung von Zytoplasma. Chemisch handelt es sich dabei um Tetrabrom-Fluorescein. Eosin liegt in leicht saurer Lösung vor. Die Mehrzahl der Proteine im Zytoplasma besitzen einen niedrigen isoelektrischen Punkt und sind somit negativ geladen. Durch die H^+ -Ionen der Lösung kommt es zu einer positiven Ladung des Zytoplasmas, was wiederum zu einer guten Anlagerung des negativ geladenen Eosins führt.

Angesäuertes Eosin eignet sich somit gut zur Färbung bzw. Gegenfärbung positiv geladener Strukturen, beispielsweise der Kollagenmatrix oder intrazellulärer, zytoplasmatischer Proteine. Zur Verstärkung der Färbung kann prinzipiell eine Vorbehandlung der Präparate mit Säure erfolgen, um bereits im Vorhinein eine positive Ladung durch H^+ -Anlagerung an Aminogruppen zu erreichen. Dies war in den hier durchgeführten Versuchen nicht von Nöten [175].

Die besagte Eosin-G-Ausgangslösung 0,5% wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass die effektive Färbung für 15 Minuten mit jeweils 0,1% Eosin-G-Lösung erfolgte. Die Präparate wurden dazu ohne Zwischenspülung direkt aus dem fließenden Färbebad übertragen. Erneut folgte eine Ausreinigung überschüssigen Farbstoffs durch Lagerung in destilliertem Wasser für 5 Minuten mit anschließender Differenzierung in 80% Ethanol für 30 Sekunden, auch hier im Tauchverfahren. Die Entwässerung der Präparate erfolgte zunächst für 2 Minuten in 96% Ethanol und anschließend nochmals für 2 Minuten in reinem Ethanol (>99,8%). Zur Aufhellung der Präparate wurden diese wieder unter der Absauganlage in Xylol-Lösung überführt und für 4 Minuten dort belassen. Unter dauerhafter Absaugung wurden die Xylol-Überschüsse nach der Einwirkzeit durch Kippen des Trägers um 45° sowie durch Aufstellen des Objektträgers im Randbereich auf einem Einwegpapiertuch entfernt. Anschließend wurden die Präparate für das Eindecken mit dem synthetischen, histologischen Einschlussmittel Roti®-Histokitt vorbereitet. Die Objekte wurden je nach Größe bedarfsorientiert mit einer geringen Menge des Einschlussmittels per Pipette überschichtet. Um einen Luftblaseneinschluss zu vermeiden, wurden Deckgläser schräg angesetzt und langsam auf den Objektträger gesenkt. Anschließend erfolgte die Trocknung für 24 Stunden im Abzug (Abbildung 11).

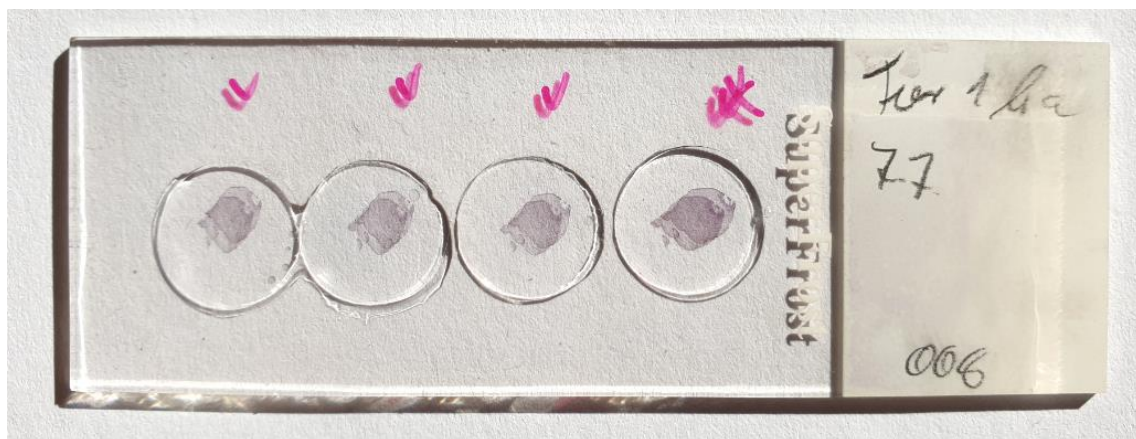


ABBILDUNG 11: BEISPIEL FÜR EINEN GEWEBESCHNITT NACH H.E.-FÄRBUNG

2.1.4.2.3 Herstellung der Synovia-Ausstrich-Präparate

Die Synovia-Ausstriche wurden nach Euthanasie direkt nach Eröffnung der Gelenkshöhle gewonnen. Hierzu wurden mit einer feinen Kanüle und Mikroliterpipette 50 µl Gelenkflüssigkeit aufgenommen und auf Objektträgern aufgebracht. Danach wurde jeweils ein weiterer, sauberer Objektträger im 45°-Winkel auf das im Randbereich platzierte Aspirat schräg angestellt und zur flächigen Verteilung durch einfaches, flaches Ausstreichen genutzt. Die Präparate wurden anschließend für mindestens 24 Stunden luftgetrocknet. Eine Übersicht über die Anzahl der gewonnenen Synoviapräparatproben ist in den Tabellen 10 bis 14 gegeben.

TABELLE 10: ANZAHL DER SYNOVIA-AUSSTRICHPRÄPARATE (GRUPPE 19.05.15; 100 KBE; 3 TIERE)

Versuchsgruppe 19.05.15 → 100 KBE	Rechtes Gelenk	Linkes Gelenk
Tier 1	1x	0x (Nicht erhalten)
Tier 2	1x	1x
Tier 3	1x	1x

TABELLE 11: ANZAHL DER SYNOVIA-AUSSTRICHPRÄPARATE (GRUPPE 07.07.15; 1000 KBE; 3 TIERE)

Versuchsgruppe 07.07.15 → 1000 KBE	Rechtes Gelenk	Linkes Gelenk
Tier 1	1x	1x
Tier 2	1x	1x
Tier 3	1x	1x

TABELLE 12: ANZAHL DER SYNOVIA-AUSSTRICHPRÄPARATE (GRUPPE 21.07.15; 1000 KBE; 2 TIERE)

Versuchsgruppe 21.07.15 → 1000 KBE	Rechtes Gelenk	Linkes Gelenk
Tier 1	2x	2x
Tier 2	2x	2x

TABELLE 13: ANZAHL DER SYNOVIA-AUSSTRICHPRÄPARATE (GRUPPE 13.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 13.04.16 → 0 KBE	Rechtes Gelenk	Linkes Gelenk
Tier 1	2x	2x
Tier 2	2x	2x
Tier 3	2x	2x
Tier 4	2x	2x

TABELLE 14: ANZAHL DER SYNOVIA-AUSSTRICHPRÄPARATE (GRUPPE 21.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 21.04.16 → 0 KBE	Rechtes Gelenk	Linkes Gelenk
Tier 1	2x	2x
Tier 2	2x	2x
Tier 3	2x	2x
Tier 4	2x	2x

2.1.4.2.4 Färbung der Synovia-Ausstriche mittels Pappenheimfärbung/May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die unfixierten, getrockneten Ausstriche wurden mit May-Grünwald-Lösung für 2 Minuten überschichtet und mit einer Petrischale im Abzug abgedeckt um unkontrolliertes Verdunsten zu vermeiden. Anschließend wurde das Präparat mit der identischen Menge frisch bereitetem, destilliertem Wasser überschichtet und für 1 weitere Minute abgedeckt. Nun wurde der Überschuss vorsichtig schräg abgekippt und mit Filterpapier aufgefangen. Im Anschluss wurden die Präparate mit der vorher verdünnten Giemsa-Stammlösung (0,3ml auf 10ml destilliertes Wasser) großzügig überschichtet und für 15 Minuten abgedeckt inkubiert. Danach wurden die Präparate einzeln durch mehrfaches, behutsames Tauchen in frischem, destilliertem Wasser in Küvetten vom Farbüberschuss befreit. Die Entwässerung erfolgte nun für 5 Sekunden in einem Ethanol-Aceton-Gemisch im Verhältnis 1:1. Auf die Aufhellung in Xylol wurde nach Testfärbungen verzichtet, da sich tendenziell eher Präparatanteile ablösen und

die Aufhellung weder notwendig war noch bedeutende Veränderungen zeigte (Abbildung 12).

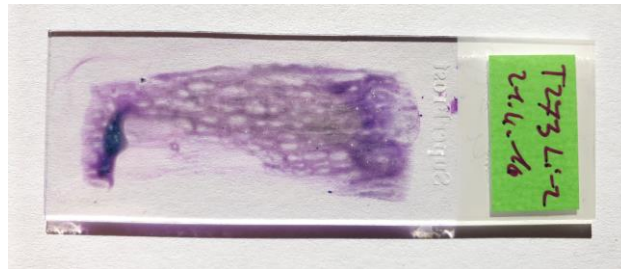


ABBILDUNG 12: BEISPIEL FÜR EIN SYNOVIAPRÄPARAT NACH MAY-GRÜNWARD-GIEMSA-FÄRBUNG

2.1.4.2.5. Erfassung der relevanten Zelltypen in den gefärbten Präparaten

Die insgesamt 301 Objektträger mit 1522 Gewebeschnitten sowie 51 Objektträger mit Synoviaausstrichen wurden in mehreren Objektträgerkästen archiviert (Abbildung 13).

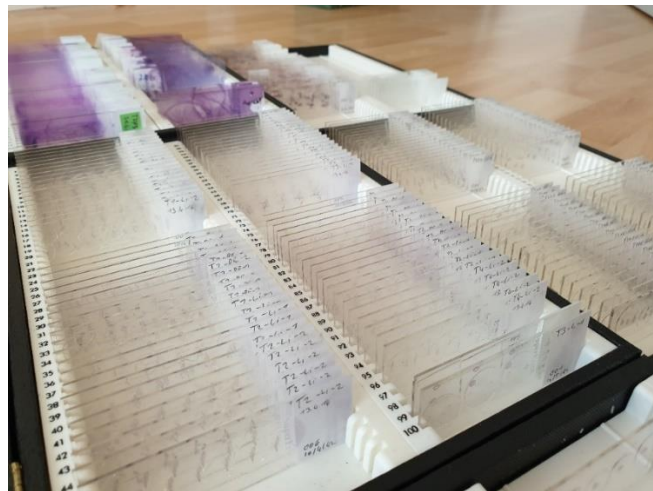


ABBILDUNG 13: OBJEKTRÄGERKÄSTEN MIT GEWEBE- UND SYNOVIAPRÄPARATEN

Die Präparate wurden mittels Mikroskop mit angeschlossener oder integrierter Kamera (Typenbezeichnung siehe Anhang 6.7) abfotografiert. Anschließend wurden digital Kontrastanpassungen mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.8 vorgenommen um die Auszählung der relevanten Zelltypen zu erleichtern.

Die Auswertung der Präparate erfolgte vollständig manuell. Jede relevante Zellpopulation wurde optisch identifiziert und einzeln mithilfe des Programms ImageJ –

Cellcounter markiert sowie als File abgespeichert um Doppelzählungen auszuschließen. Bei sehr geringer Zellanzahl auf dem Objektträger genügte eine manuelle Auszählung ohne Programm. Tabellarisch wurden die Ergebnisse in Microsoft Excel für jedes Tier, jede Schnittreihe und jedes Präparat protokolliert. Die Zellpopulationen wurden zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen untereinander jeweils prozentual gegeneinander ausgewertet.

2.2 Statistische Methoden

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse sollte festgestellt werden, welchen Einfluss eine Implantatbeschichtung mit Ca(OH)_2 auf die initiale Einheilphase von intentionell infizierten bzw. nicht infizierten Implantaten sowie auf das umliegende Gewebe hat. Darüber hinaus sollte nachgewiesen werden, ob und inwieweit sich die antibakteriellen Eigenschaften, die in der In vitro Untersuchung beobachtet worden sind, auch In vivo reproduzieren lassen.

Da Neutrophile Granulozyten bei Entzündungen jeder Art – speziell bei bakteriellen Infektionen - zu den besonders schnell auftretenden Zellpopulationen gehören, können sie als Qualifizierungsgröße für die Stärke einer bakteriellen Entzündung sowie einer abakteriellen Einheilreaktion dienen. Zur Auswertung wurden deshalb die unterschiedlichen Leukozytenzellpopulationen für jedes Implantationsgebiet und für jedes Tier jeder Versuchsgruppe zusammengefasst, ausgewertet und in ihren prozentualen Anteilen erfasst. Schwerpunktmäßig wurde dabei der prozentuale Anteil der Neutrophilen Granulozyten betrachtet.

Dazu wurden Messpaare auf Unterschiedlichkeit hin untersucht. Das passende statistische Verfahren für solche Daten ist der Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben, auch „Gepaarter t-Test“ oder „Abhängiger t-Test“ genannt [176].

Der Faktor Beschichtung soll entsprechend der dargestellten Überlegungen zu einer Reduzierung der Neutrophilen Granulozyten führen und als repräsentativer Wert für die Abschwächung der Entzündungsreaktion, als Zeichen besserer Osseointegration sowie antimikrobieller Potenz dienen, sodass die entsprechende Alternativhypothese als einseitig gerichtet klassifiziert werden kann. Null- und Alternativhypothese werden folgendermaßen definiert:

$$\text{Nullhypothese } H_0 : \mu = \mu_0$$

$$\text{Alternativhypothese } H_1 : \mu < \mu_0$$

Als Signifikanzniveau wird durchgängig $\alpha = 0,05$ (5%) gesetzt.

Die Labortiere sind für alle Versuchsgruppen zufällig ausgewählt und zugewiesen worden. Somit ist die Voraussetzung einer zufälligen Stichprobe der Messwertpaare für das t-Test-Verfahren gegeben.

Voraussetzung für den t-Test ist die Normalverteilung der Stichproben-Daten. Überprüft wurde die Normalverteilung primär mit einem Microsoft Excel-Tool, bereitgestellt durch das Institut für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg, basierend auf dem Kolmogorow-Test. Zusätzlich wurde dies mittels IBM SPSS zur Kontrolle bestätigt sowie weiter ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Absolute Häufigkeit der erfassten Zelltypen

Obwohl die Eröffnung der Gelenke und die Entnahme der Proben einem festen, standardisierten Ablauf folgten, zeigten sich in den Präparaten je nach Entnahmebereich unterschiedlich stark durch Leukozyten besetzte Bereiche. Nicht zu vernachlässigen ist weiterhin die Tatsache, dass die Versuchstiere sich zwar sehr ähneln und identischen Versuchsbedingungen unterlagen, sie jedoch allesamt lebendige Individuen sind und sich diese Individualität auch in den im Labor erzeugten In vivo Ergebnissen widerspiegeln kann.

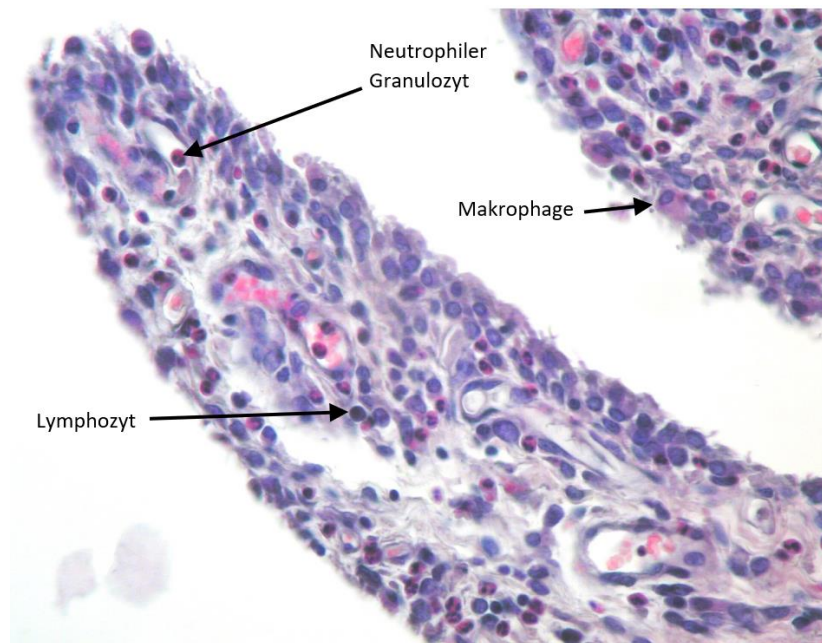


ABBILDUNG 14: BEISPIEL FÜR EINEN GEWEBE-PRÄPARATSNITT UNTER DEM MIKROSKOP

Bei den Gewebepräparaten (Abbildung 14) konnten insgesamt 10.851 Zellen ausgewertet werden. Dabei wurde versucht, die einzelnen Zelltypen so gut wie möglich zu differenzieren. Da Monozyten die Vorläuferzellen von Makrophagen sind, per Definition eigentlich nur im Blut vorkommen und sich nach Migration ins Gewebe zu Makrophagen differenzieren, wurde versucht, diese voneinander zu unterscheiden. Für die statistische Auswertung wurden sie jedoch zu einer Gruppe zusammengefasst. Die

absolute Häufigkeit der erfassten Zelltypen in den jeweiligen Gewebepräparatschnitten zeigen die Tabellen 15 bis 18. Für 100 KBE wurden keine Gewebeproben entnommen.

TABELLE 15: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN GEWEBEPRÄPARAT (GRUPPE 07.07.15; 1000 KBE; 3 TIERE)

Versuchsgruppe 07.07.15 1000 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	2309	1874	51	22	51	232	79
Tier 1 li	173	10	2	1	22	117	21
Tier 2 re	121	41	0	0	14	47	19
Tier 2 li	727	345	43	24	49	220	46
Tier 3 re	293	46	5	1	34	142	65
Tier 3 li	887	504	64	22	22	240	35

TABELLE 16: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN GEWEBEPRÄPARAT (GRUPPE 21.07.15; 1000 KBE; 2 TIERE)

Versuchsgruppe 21.07.15 → 1000 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	1394	1165	39	11	22	132	25
Tier 1 li	785	414	51	20	40	231	29
Tier 2 re	578	444	16	5	15	77	21
Tier 2 li	895	482	63	22	62	245	21

TABELLE 17: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN GEWEBEPRÄPARAT (GRUPPE 13.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 13.04.16 0 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	284	46	3	1	25	134	75
Tier 1 li	101	1	0	0	5	75	20
Tier 2 re	265	19	2	0	24	134	86
Tier 2 li	265	1	3	2	41	133	0
Tier 3 re	157	17	1	0	16	86	37
Tier 3 li	192	9	3	2	20	105	53
Tier 4 re Fettgewebe	30	1	0	0	0	22	7
Tier 4 li Fettgewebe	217	12	3	4	19	145	34

TABELLE 18: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN GEWEBEPRÄPARAT (GRUPPE 21.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 21.04.16 0 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	187	65	1	2	18	67	34
Tier 1 li	158	2	0	1	13	96	46
Tier 2 re	138	26	1	1	6	89	15
Tier 2 li	87	3	2	0	5	62	15
Tier 3 re	141	35	3	1	6	85	11
Tier 3 li	147	5	5	1	9	105	22
Tier 4 re	144	13	1	0	12	86	32
Tier 4 li	176	6	4	3	11	131	21

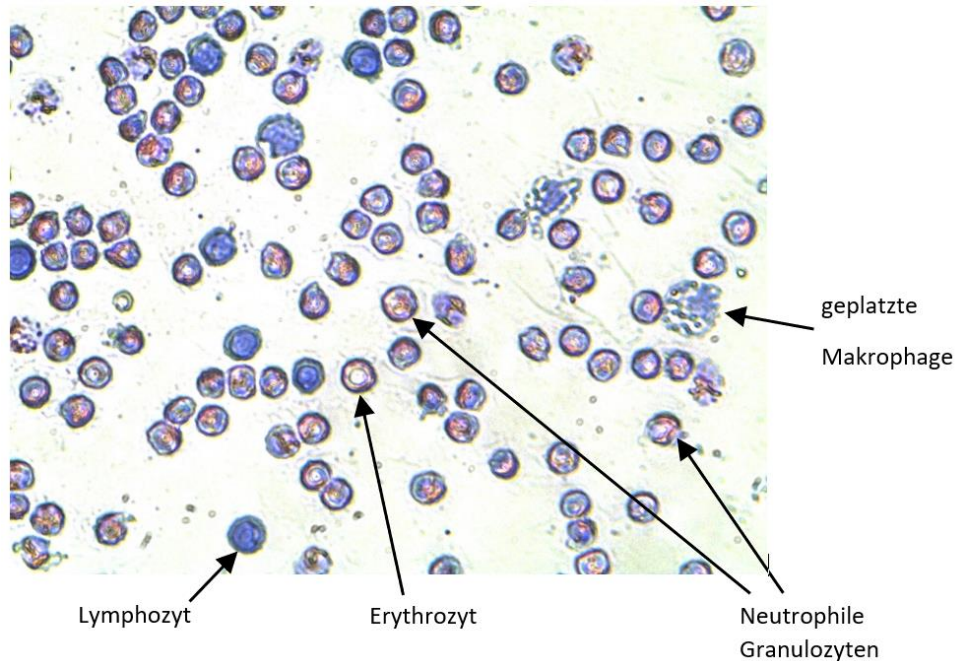


ABBILDUNG 15: SYNOVIA-AUSSTRICH UNTER DEM MIKROSKOP

Abbildung 15 zeigt einen Synovia-Ausstrich mit Lymphozyten (blau), Neutrophilen Granulozyten (rosabläulich mit pleomorphen Kernen) sowie vereinzelt Erythrozyten (ringförmig, fast ungefärbt).

Bei den Synovia-Präparaten konnten 17.823 Zellen ausgewertet werden, welche sich entsprechend den Tabellen 19 bis 23 auf die Präparate verteilen. Bei dem Präparat „Synovia, 100 KBE, Tier 1 li“ konnten nach der Färbung keinen Zellen nachgewiesen werden.

TABELLE 19: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN SYNOVIAPRÄPARAT (GRUPPE 19.05.15; 1000 KBE; 3 TIERE)

Versuchsgruppe 19.05.15 100 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	208	156	3	11	6	30	2
Tier 1 li	X	x	x	x	x	x	x

Tier 2 re	1532	1436	20	17	18	40	1
Tier 2 li	505	418	19	8	15	43	2
Tier 3 re	244	214	12	0	3	15	0
Tier 3 li	541	427	41	8	26	19	20

TABELLE 20: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN SYNOVIAPRÄPARAT (GRUPPE 07.07.15; 1000 KBE; 3 TIERE)

Versuchsgruppe 07.07.15 1000 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	1025	852	8	24	21	112	8
Tier 1 li	93	84	3	0	0	4	2
Tier 2 re	420	330	1	14	6	67	1
Tier 2 li	384	267	5	9	7	94	2
Tier 3 re	417	309	1	5	16	82	4
Tier 3 li	521	435	24	4	22	29	7

TABELLE 21: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN SYNOVIAPRÄPARAT (GRUPPE 21.07.15; 1000 KBE; 2 TIERE)

Versuchsgruppe 21.07.15 1000 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	2094	1836	29	6	33	136	53
Tier 1 li	3308	2847	46	31	154	186	44
Tier 2 re	3945	3524	79	15	57	206	64
Tier 2 li	1008	886	23	4	15	60	20

TABELLE 22: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN SYNOVIAPRÄPARAT (GRUPPE 13.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 13.04.16 0 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	91	24	0	1	6	58	2
Tier 1 li	33	3	1	0	4	25	0
Tier 2 re	77	8	1	0	3	62	3
Tier 2 li	113	8	6	0	3	95	1
Tier 3 re	178	49	3	4	3	117	2
Tier 3 li	91	7	3	2	8	69	2
Tier 4 re	128	25	2	1	12	84	4
Tier 4 li	19	0	0	3	5	11	0

TABELLE 23: ABSOLUTE HÄUFIGKEIT DER JEWEILIGEN ZELLTYPEN IM UNTERSUCHTEN SYNOVIAPRÄPARAT (GRUPPE 21.04.16; 0 KBE; 4 TIERE)

Versuchsgruppe 21.04.16 0 KBE	Gesamtzahl der Zellen	Davon Neutrophile	Davon Eosinophile	Davon Basophile	Davon Monozyten	Davon Lymphozyten	Davon Makrophagen
Tier 1 re	136	11	1	2	9	110	3
Tier 1 li	74	9	3	1	9	52	0
Tier 2 re	94	18	0	0	5	67	4
Tier 2 li	110	6	1	1	18	78	6
Tier 3 re	135	7	1	0	17	106	4
Tier 3 li	142	5	1	1	26	101	8
Tier 4 re	81	4	0	0	14	63	0
Tier 4 li	76	4	0	2	23	42	5

3.2 Relative Häufigkeit der erfassten Zelltypen

Die Auswertung der relativen Häufigkeit auftretender Zelltypen sowie die visuelle Analyse der jeweiligen KBE-Gruppen zeigen teils deutliche Unterschiede hinsichtlich des Faktors „Beschichtung“ auf. Aufgrund der statistischen Auswertungen (siehe 3.3) werden bereits an dieser Stelle Aussagen bezüglich signifikanter Unterschiede beschrieben.

3.2.1 Relative Häufigkeit und visuelle Analyse der Gewebeproben

Tabelle 24 zeigt die relative Häufigkeit der untersuchten Zelltypen pro Tier in den entnommenen Gewebeproben. Zur Verdeutlichung ist die Spalte *Beschichtung* angezeigt (0=unbeschichtet; 1=beschichtet). Die Tabelle ist zeitlich nach dem Datum der Probenentnahme geordnet, die anschließende Analyse ist nach aufsteigender Anzahl der KBE geordnet.

TABELLE 24: RELATIVE HÄUFIGKEIT DER ERFASSTEN ZELLTYPEN IM ÜBERBLICK (GEWEBEPROBEN)

Datum	Tier	Gruppe	Beschichtung	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Basophile	Monozyten	Macrophagen
07.07.2015	T1 re	1000 KBE	0	81,1607%	10,05%	2,21%	0,95%	2,21%	3,42%
07.07.2015	T1 li	1000 KBE	1	5,7803%	67,63%	1,16%	0,58%	12,72%	12,14%
07.07.2015	T2 re	1000 KBE	0	33,8843%	38,84%	0,00%	0,00%	11,57%	15,70%
07.07.2015	T2 li	1000 KBE	1	47,4553%	30,26%	5,91%	3,30%	6,74%	6,33%
07.07.2015	T3 re	1000 KBE	0	15,6997%	48,46%	1,71%	0,34%	11,60%	22,18%
07.07.2015	T3 li	1000 KBE	1	56,8207%	27,06%	7,22%	2,48%	2,48%	3,95%
21.07.2015	T1 re	1000 KBE	0	83,5725%	9,47%	2,80%	0,79%	1,58%	1,79%
21.07.2015	T1 li	1000 KBE	1	52,7389%	29,43%	6,50%	2,55%	5,10%	3,69%
21.07.2015	T2 re	1000 KBE	0	76,8166%	13,32%	2,77%	0,87%	2,60%	3,63%
21.07.2015	T2 li	1000 KBE	1	53,8547%	27,37%	7,04%	2,46%	6,93%	2,35%

13.04.2016	T1 re	0 KBE	0	16,1972%	47,18%	1,06%	0,35%	8,80%	26,41%
13.04.2016	T1 li	0 KBE	1	0,9901%	74,26%	0,00%	0,00%	4,95%	19,80%
13.04.2016	T2 re	0 KBE	0	7,1698%	50,57%	0,75%	0,00%	9,06%	32,45%
13.04.2016	T2 li	0 KBE	1	0,3774%	50,19%	1,13%	0,75%	15,47%	32,08%
13.04.2016	T3 re	0 KBE	0	10,8280%	54,78%	0,64%	0,00%	10,19%	23,57%
13.04.2016	T3 li	0 KBE	1	4,6875%	54,69%	1,56%	1,04%	10,42%	27,60%
13.04.2016	T4 re	0 KBE	0	3,3333%	73,33%	0,00%	0,00%	0,00%	23,33%
13.04.2016	T4 li	0 KBE	1	5,5300%	66,82%	1,38%	1,84%	8,76%	15,67%
21.04.2016	T5 re	0 KBE	0	34,7594%	35,83%	0,53%	1,07%	9,63%	18,18%
21.04.2016	T5 li	0 KBE	1	1,2658%	60,76%	0,00%	0,63%	8,23%	29,11%
21.04.2016	T6 re	0 KBE	0	18,8406%	64,49%	0,72%	0,72%	4,35%	10,87%
21.04.2016	T6 li	0 KBE	1	3,4483%	71,26%	2,30%	0,00%	5,75%	17,24%
21.04.2016	T7 re	0 KBE	0	24,8227%	60,28%	2,13%	0,71%	4,26%	7,80%
21.04.2016	T7 li	0 KBE	1	3,4014%	71,43%	3,40%	0,68%	6,12%	14,97%
21.04.2016	T8 re	0 KBE	0	9,0278%	59,72%	0,69%	0,00%	8,33%	22,22%
21.04.2016	T8 li	0 KBE	1	3,4091%	74,43%	2,27%	1,70%	6,25%	11,93%

Visuelle Analyse der 0 KBE Gewebeproben

In den ausplattierten Zweitproben der Gruppe mit 0 KBE konnte keinerlei bakterielle Kontamination nachgewiesen werden. Dies kann als Indiz für sehr sorgfältige und saubere Laborarbeit gewertet werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Versuchsergebnisse nicht durch ungewollte Fremdkontamination beeinflusst wurden.

Abbildung 16 visualisiert die individuellen Messdaten der Neutrophilen pro Versuchstier. Aufgrund der häufig sehr geringen Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten auf den einzelnen Präparaten (häufig nur 1 oder 2 Leukozyten pro Bild, woraus sich diskrete Extremwerte von 0% oder 100% ergaben) ist eine visuelle Darstellung der Standardabweichung pro Entnahmestelle nicht sinnvoll. Bis auf Tier 4 zeigt jedes andere Messpaar für sich einen deutlichen Unterschied der prozentualen Anteile von

Neutrophilen zwischen unbeschichtetem und beschichtetem Implantat. Insgesamt zeigt sich der Unterschied als signifikant.

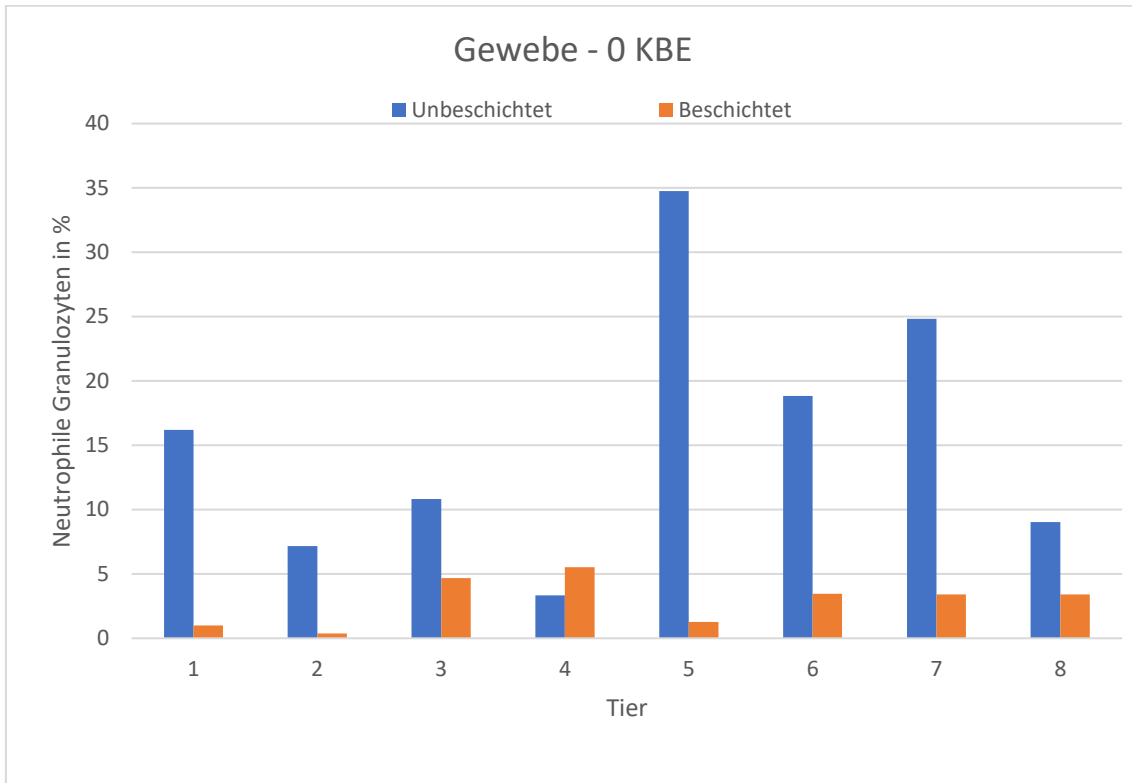


ABBILDUNG 16: PROZENTUALE ANTEILE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (GEWEBE; 0 KBE)

Im Netzdiagramm (Vergleich der Flächenverhältnisse; Abbildung 17) zeigt sich die prozentual deutlich höhere Anzahl der Neutrophilen Granulozyten beim unbeschichteten Implantat besonders anschaulich.

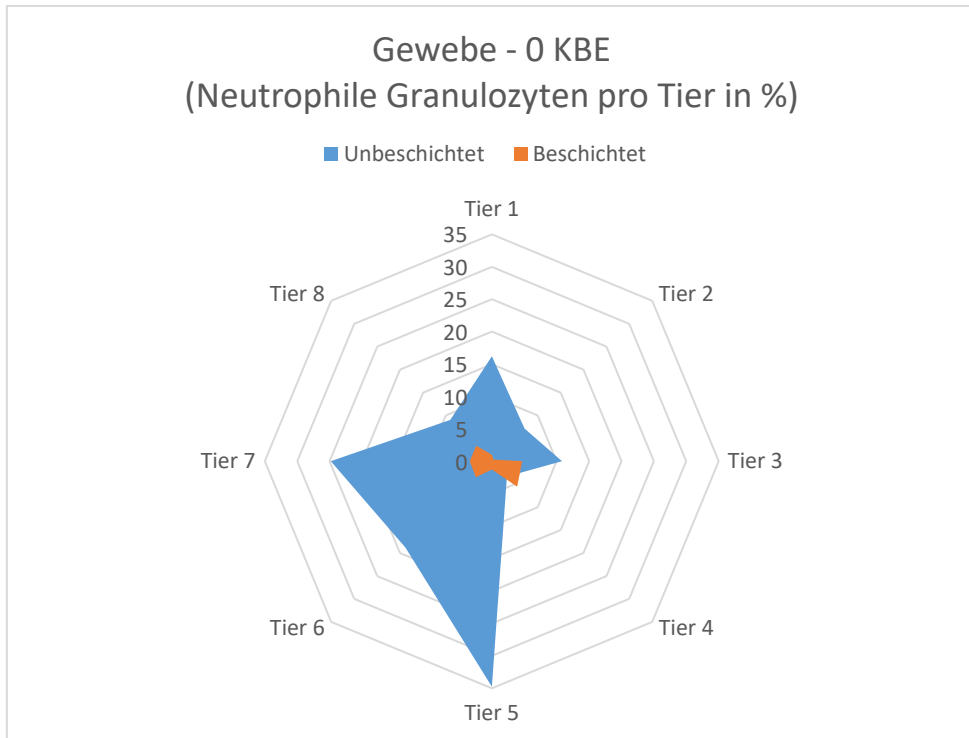


ABBILDUNG 17: NETZDIAGRAMM (GEWEBE; 0 KBE)

Der Boxplot (Abbildung 18) zeigt die Verteilung der zusammengefassten Messdaten über Tiere 1 bis 8 der 0 KBE-Gewebe-Versuchsgruppe, sowie den Median und den Mittelwert der erfassten Ergebnisse. Der signifikant niedrigere Anteil Neutrophiler Granulozyten der beschichteten Implantate ist auch hier deutlich erkennbar.

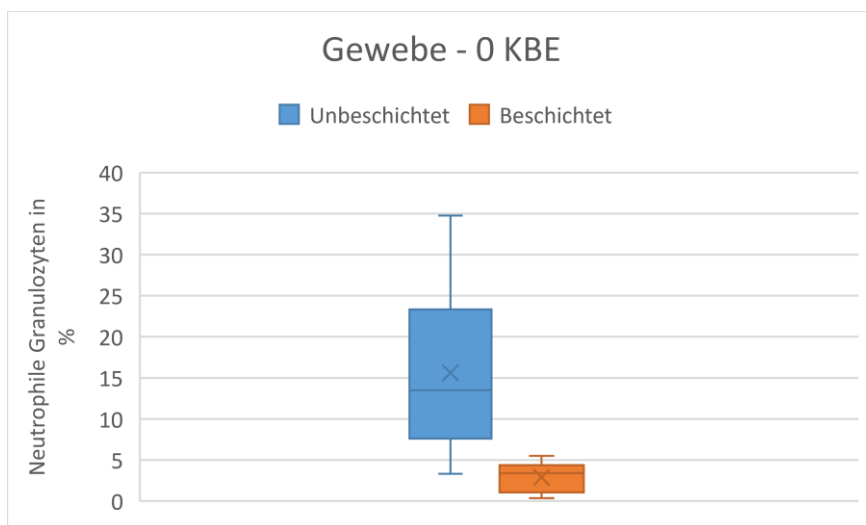


ABBILDUNG 18: BOXPLOT (GEWEBE; 0 KBE)

Die visuelle Analyse zeigt bereits den signifikanten Unterschied hinsichtlich des Faktors Beschichtung und führt zur Ablehnung der Nullhypothese (siehe 2.2). Die Beschichtung mit Ca(OH)_2 führt zu einer signifikanten Reduktion Neutrophiler Granulozyten.

Visuelle Analyse der 1000 KBE Gewebeproben

Abbildung 19 visualisiert die individuellen Messdaten der Neutrophilen pro Versuchstier. Aufgrund der höheren Zellzahl pro Präparat und Foto macht es bei dieser Versuchsgruppe Sinn, zusätzlich die Standardabweichung visuell darzustellen. Bei insgesamt 3 Tieren der Versuchsgruppe zeigte sich ein zum Teil deutlich geringerer Anteil Neutrophiler Granulozyten auf der beschichteten Implantatseite, bei Tier 2 und 3 war der Anteil auf der beschichteten Seite wiederum deutlich erhöht. Die Ergebnisse für diese Gruppe lassen daher keine gesicherte Aussage über die Wirksamkeit der Beschichtung bei einer Keimlast von 1000 KBE zu.

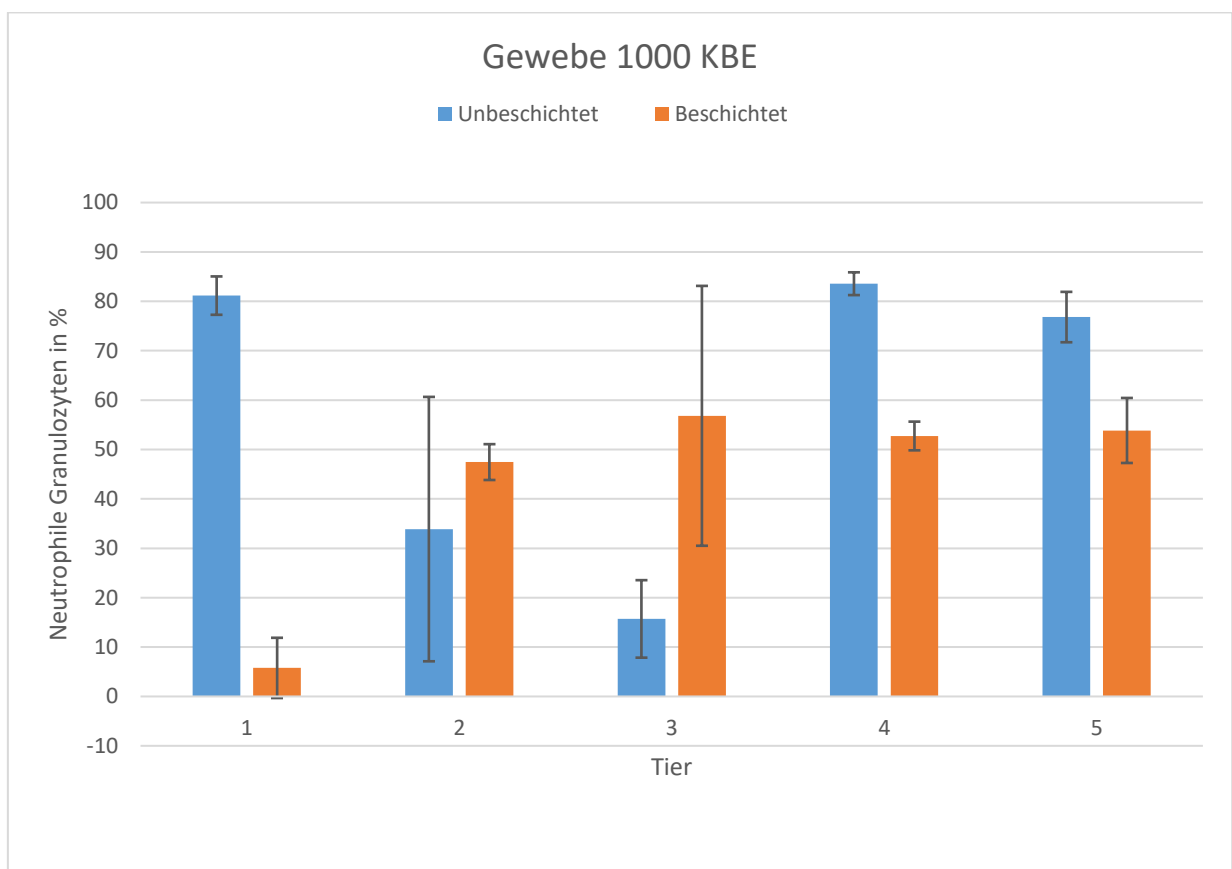


ABBILDUNG 19: PROZENTUALE ANTEILE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (GEWEBE; 1000 KBE)

Im Netzdiagramm (Abbildung 20) zeigen sich diese diffusen Ergebnisse ebenfalls. Die orange Fläche suggeriert einen deutlich niedrigeren Anteil Neutrophiler Granulozyten bei den beschichteten Implantaten als bei den unbeschichteten Implantaten. Dieser Unterschied lässt sich rechnerisch nicht bestätigen, es liegt kein signifikanter Unterschied vor.

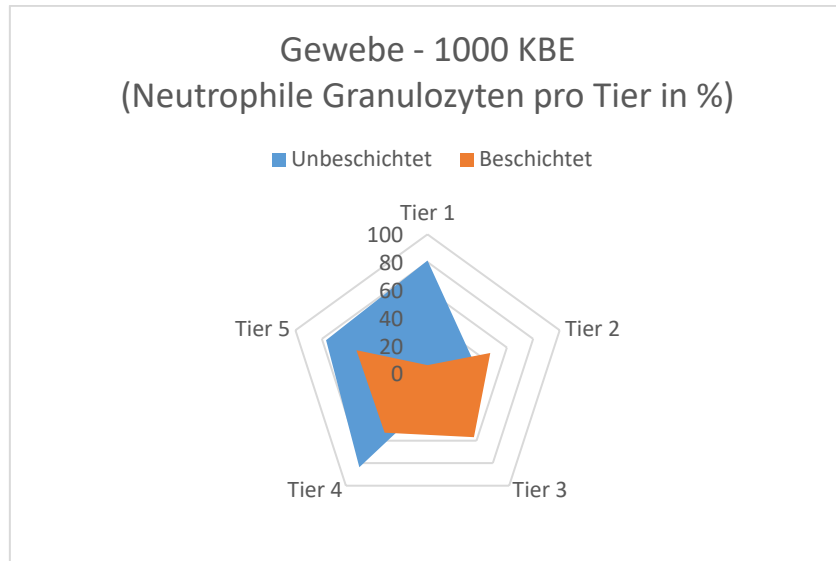


ABBILDUNG 20: NETZDIAGRAMM (GEWEBE; 1000 KBE)

Der Boxplot (Abbildung 21) zeigt die Verteilung der Messdaten über alle Tiere der Versuchsgruppe, sowie den Median und den Mittelwert der erfassten Ergebnisse. Rein visuell betrachtet scheint auch hier die Beschichtung zu einem deutlichen Unterschied zu führen. Dieser kann rechnerisch nicht nachgewiesen werden, es liegt kein signifikanter Unterschied vor.

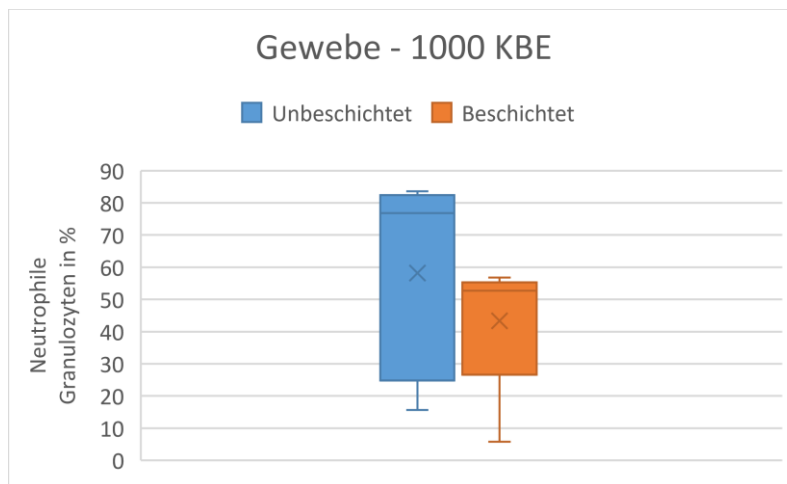


ABBILDUNG 21: BOXPLOT (GEWEBE; 1000 KBE)

Die visuelle Analyse zeigt insgesamt diffuse Ergebnisse hinsichtlich des Faktors Beschichtung und lässt nun keine klare Aussage mehr über die Wirksamkeit zu.

3.2.2 Relative Häufigkeit und visuelle Analyse der Synovia-Proben

Die Tabelle 25 zeigt die relative Häufigkeit der untersuchten Zelltypen pro Tier in den entnommenen Synoviaprobe. Zur Verdeutlichung ist die Spalte *Beschichtung* angezeigt (0=unbeschichtet; 1=beschichtet). Die Tabelle ist zeitlich nach dem Datum der Probenentnahme geordnet, die anschließende Analyse ist nach aufsteigender Anzahl der KBE geordnet.

TABELLE 25: RELATIVE HÄUFIGKEIT DER ERFASTEN ZELLTYPEN IM ÜBERBLICK (SYNOVIAPROBEN)

Datum	Tier	Gruppe	Beschichtung	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Basophile	Monozyten	Macrophagen
19.05.2015	1 re	100 KBE	0	75,00%	14,42%	1,44%	5,29%	2,88%	0,96%
19.05.2015	2 re	100 KBE	0	93,73%	2,61%	1,31%	1,11%	1,17%	0,07%
19.05.2015	2 li	100 KBE	1	82,77%	8,51%	3,76%	1,58%	2,97%	0,40%
19.05.2015	3 re	100 KBE	0	87,70%	6,15%	4,92%	0,00%	1,23%	0,00%
19.05.2015	3 li	100 KBE	1	78,93%	3,51%	7,58%	1,48%	4,81%	3,70%
07.07.2015	T1 re	1000 KBE	0	83,12%	10,93%	0,78%	2,34%	2,05%	0,78%
07.07.2015	T1 li	1000 KBE	1	90,32%	4,30%	3,23%	0,00%	0,00%	2,15%
07.07.2015	T2 re	1000 KBE	0	78,57%	15,95%	0,24%	3,33%	1,43%	0,24%
07.07.2015	T2 li	1000 KBE	1	69,53%	24,48%	1,30%	2,34%	1,82%	0,52%
07.07.2015	T3 re	1000 KBE	0	74,10%	19,66%	0,24%	1,20%	3,84%	0,96%
07.07.2015	T3 li	1000 KBE	1	83,49%	5,57%	4,61%	0,77%	4,22%	1,34%
21.07.2015	T1 re	1000 KBE	0	87,68%	6,49%	1,38%	0,29%	1,58%	2,53%
21.07.2015	T1 li	1000 KBE	1	86,06%	5,62%	1,39%	0,94%	4,66%	1,33%
21.07.2015	T2 re	1000 KBE	0	89,33%	5,22%	2,00%	0,38%	1,44%	1,62%
21.07.2015	T2 li	1000 KBE	1	87,90%	5,95%	2,28%	0,40%	1,49%	1,98%
13.04.2016	T1 re	0 KBE	0	26,37%	63,74%	0,00%	1,10%	6,59%	2,20%

13.04.2016	T1 li	0 KBE	1	9,09%	75,76%	3,03%	0,00%	12,12%	0,00%
13.04.2016	T2 re	0 KBE	0	10,39%	80,52%	1,30%	0,00%	3,90%	3,90%
13.04.2016	T2 li	0 KBE	1	7,08%	84,07%	5,31%	0,00%	2,65%	0,88%
13.04.2016	T3 re	0 KBE	0	27,53%	65,73%	1,69%	2,25%	1,69%	1,12%
13.04.2016	T3 li	0 KBE	1	7,69%	75,82%	3,30%	2,20%	8,79%	2,20%
13.04.2016	T4 re	0 KBE	0	19,53%	65,63%	1,56%	0,78%	9,38%	3,13%
13.04.2016	T4 li	0 KBE	1	0,00%	57,89%	0,00%	15,79%	26,32%	0,00%
21.04.2016	T5 re	0 KBE	0	8,09%	80,88%	0,74%	1,47%	6,62%	2,21%
21.04.2016	T5 li	0 KBE	1	12,16%	70,27%	4,05%	1,35%	12,16%	0,00%
21.04.2016	T6 re	0 KBE	0	19,15%	71,28%	0,00%	0,00%	5,32%	4,26%
21.04.2016	T6 li	0 KBE	1	5,45%	70,91%	0,91%	0,91%	16,36%	5,45%
21.04.2016	T7 re	0 KBE	0	5,19%	78,52%	0,74%	0,00%	12,59%	2,96%
21.04.2016	T7 li	0 KBE	1	3,52%	71,13%	0,70%	0,70%	18,31%	5,63%
21.04.2016	T8 re	0 KBE	0	4,94%	77,78%	0,00%	0,00%	17,28%	0,00%
21.04.2016	T8 li	0 KBE	1	5,26%	55,26%	0,00%	2,63%	30,26%	6,58%

Visuelle Analyse der 0 KBE Synovialproben

Abbildung 22 visualisiert die individuellen Messdaten der Neutrophilen pro Versuchstier. Aufgrund der häufig sehr geringen Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten auf den einzelnen Präparaten (häufig nur 1 oder 2 Leukozyten pro Bild, woraus sich diskrete Extremwerte von 0% oder 100% ergaben) ist eine visuelle Darstellung der Standardabweichung pro Entnahmestelle nicht sinnvoll. Bis auf die Tiere 5 und 8 zeigen alle Messpaare einen deutlichen Unterschied im prozentualen Anteil der Neutrophilen zwischen unbeschichteten und beschichteten Implantaten.

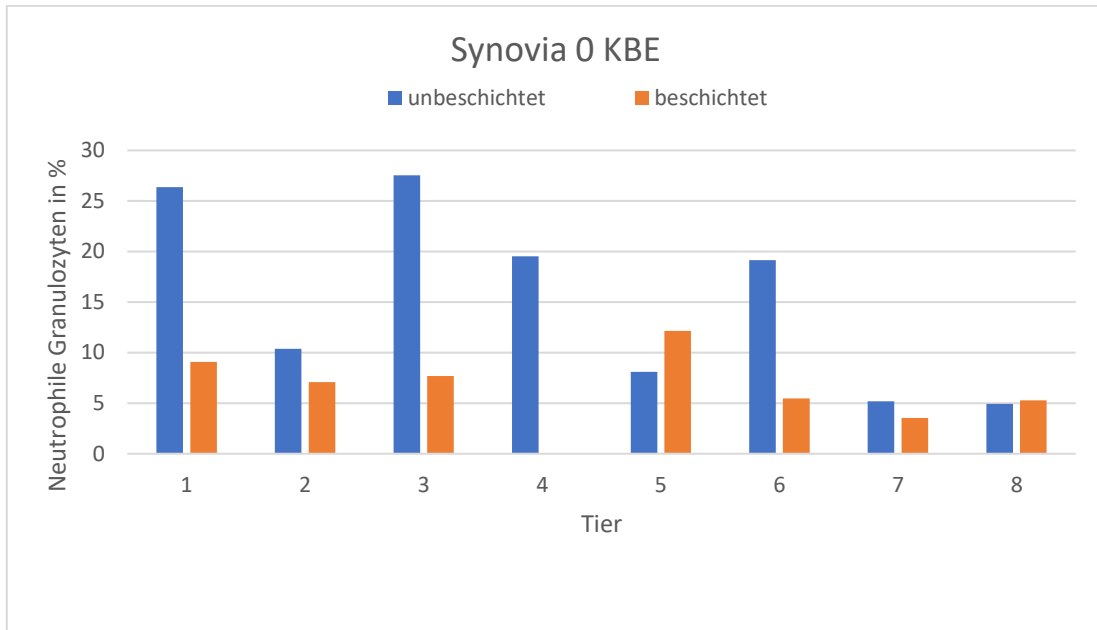


ABBILDUNG 22: PROZENTUALE ANTEILE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (SYNOVIA; 0 KBE)

Im Netzdiagramm (Abbildung 23) zeigt sich die prozentual deutlich höhere Anzahl der Neutrophilen Granulozyten beim unbeschichteten Implantat durch die stark unterschiedlich großen Farbflächen besonders anschaulich.

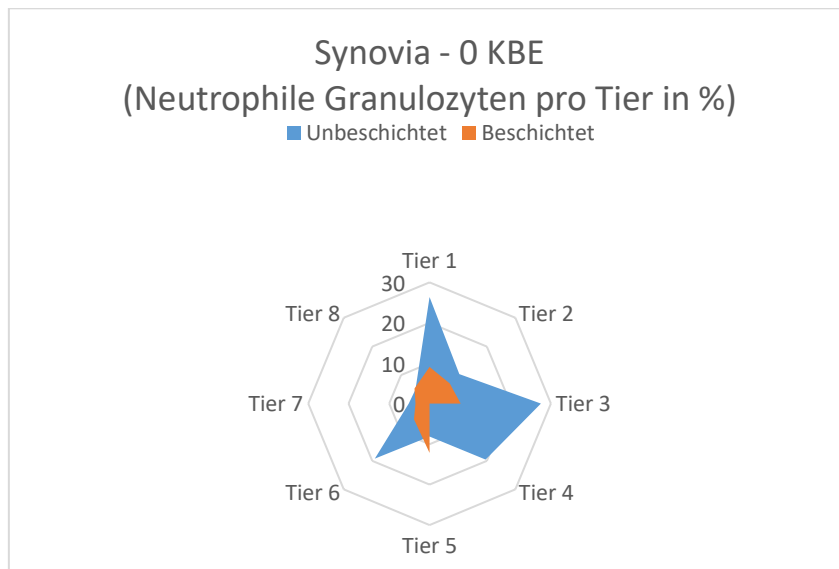


ABBILDUNG 23: NETZDIAGRAMM (SYNOVIA; 0 KBE)

Der Boxplot (Abbildung 24) zeigt die Verteilung der Messdaten über die Tiere 1 bis 8 der Versuchsgruppe, sowie den Median und den Mittelwert der erfassten Ergebnisse. Der

Unterschied in den Verteilungen zwischen unbeschichteter und beschichteter Implantatseite ist signifikant.

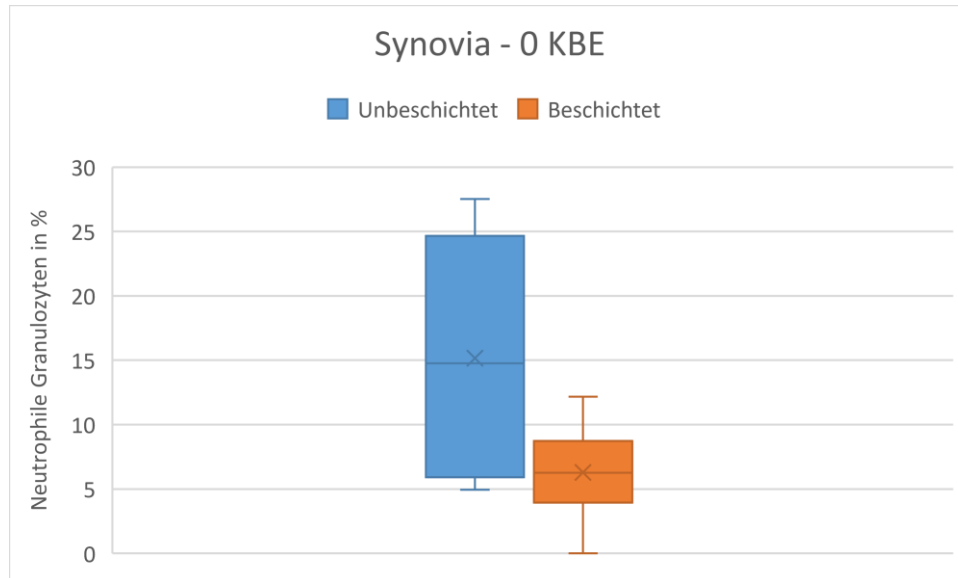


ABBILDUNG 24: BOXPLOT (SYNOVIA; 0 KBE)

Insgesamt zeigt die visuelle Analyse auch für diese Versuchsgruppe einen klaren Unterschied hinsichtlich des Faktors Beschichtung und führt zur Ablehnung der Nullhypothese. Die Beschichtung mit Ca(OH)_2 führt zu einer signifikanten Reduktion Neutrophiler Granulozyten.

Visuelle Analyse der 100 KBE Synovialproben

Abbildung 25 visualisiert die Messdaten für den prozentualen Anteil Neutrophiler Granulozyten pro Versuchstier. Aufgrund der höheren Zellzahl pro Präparat und Foto macht es bei dieser Versuchsgruppe Sinn, zusätzlich die Standardabweichung visuell darzustellen.

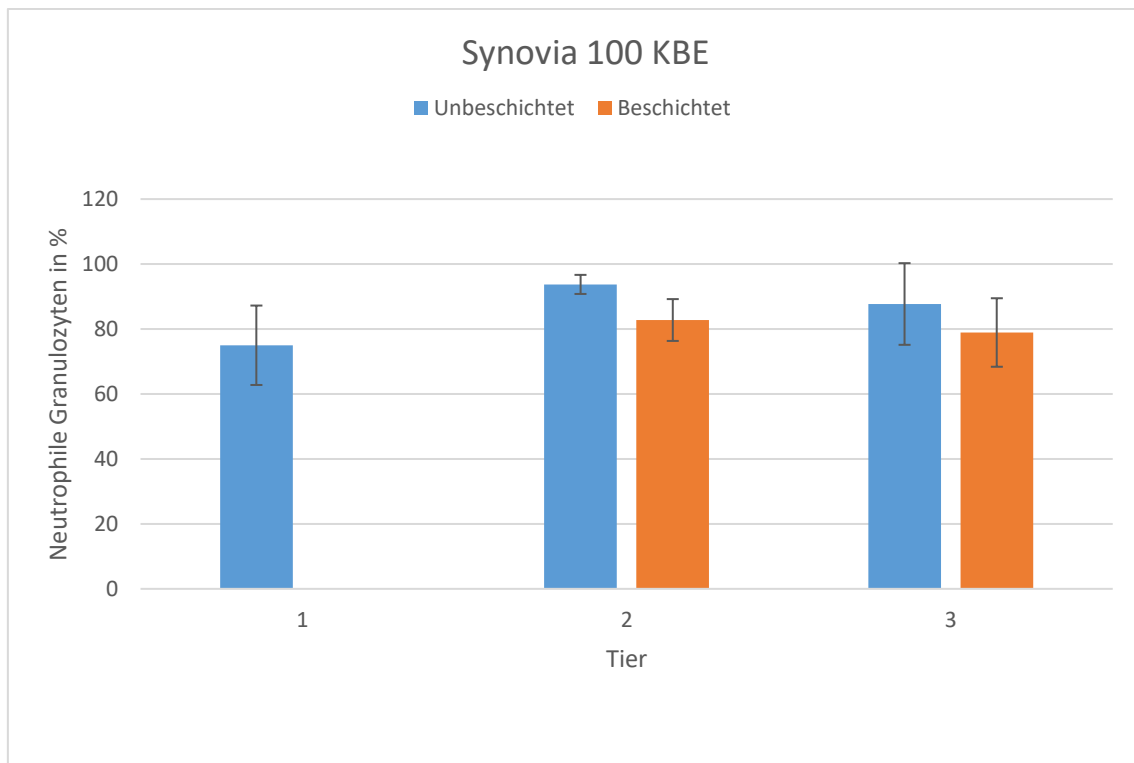


ABBILDUNG 25: PROZENTUALE ANTEILE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (SYNOVIA; 0 KBE)

Bei zwei von drei Versuchstieren zeigte sich ein geringerer Anteil Neutrophiler Granulozyten auf der beschichteten Implantatseite. Bei Tier 1 konnte kein auswertbares Präparat gewonnen werden.

Ein Netzdiagramm ist aufgrund der wenigen Versuchstiere nicht darstellbar.

Der Boxplot (Abbildung 26) zeigt die Verteilung der Messdaten über alle Tiere der Versuchsgruppe sowie den Median und den Mittelwert der erfassten Ergebnisse. Der Unterschied in der prozentualen Verteilung Neutrophiler Granulozyten bei beschichteter und unbeschichteter Implantatseite ist signifikant.

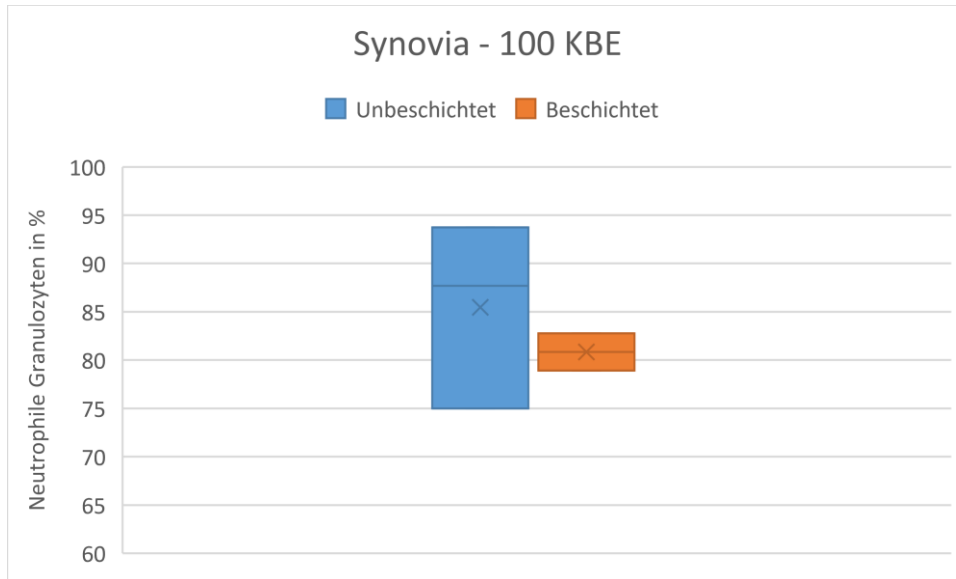


ABBILDUNG 26: BOXPLOT (SYNOVIA; 100 KBE)

In der visuellen Analyse fällt bereits der Unterschied beim Faktor Beschichtung auf. Auch bei der 100 KBE-Gruppe liegt ein signifikanter Unterschied vor. Die Beschichtung mit Ca(OH)_2 führt zu einer signifikanten Reduktion Neutrophiler Granulozyten.

Visuelle Analyse der 1000 KBE Synoviaprobe

Abbildung 27 visualisiert die individuellen Messdaten der Neutrophilen pro Versuchstier. Aufgrund der höheren Zellzahl pro Präparat und Foto macht es bei dieser Versuchsgruppe Sinn, zusätzlich die Standardabweichung visuell darzustellen.

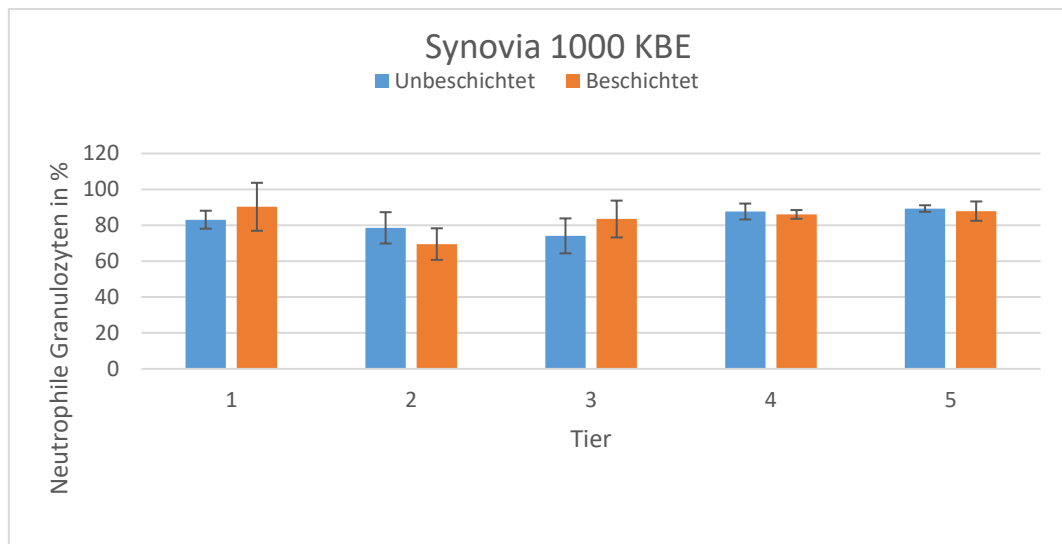


ABBILDUNG 27: PROZENTUALE ANTEILE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (SYNOVIA; 1000 KBE)

Bei insgesamt 3 Tieren der Versuchsgruppe zeigte sich ein leicht geringerer Anteil Neutrophiler Granulozyten auf der beschichteten Implantatseite, bei Tier 1 und 3 war der Anteil auf der beschichteten Seite wiederum erhöht. Die Ergebnisse für diese Gruppe lassen daher keine gesicherte Aussage über die Wirksamkeit der Beschichtung bei einer Keimlast von 1000 KBE zu.

Auch im Netzdiagramm (Abbildung 28) zeigt sich die Homogenität der Messwerte, eine eindeutige Aussage über die Wirkung der Beschichtung ist nicht erkennbar. Da die Formen der beschichteten und unbeschichteten Gruppen im Netzdiagramm nahezu formkongruent sind, wurde zu Gunsten einer einfacheren Differenzierung eine Liniendarstellung anstatt einer Flächendarstellung gewählt.

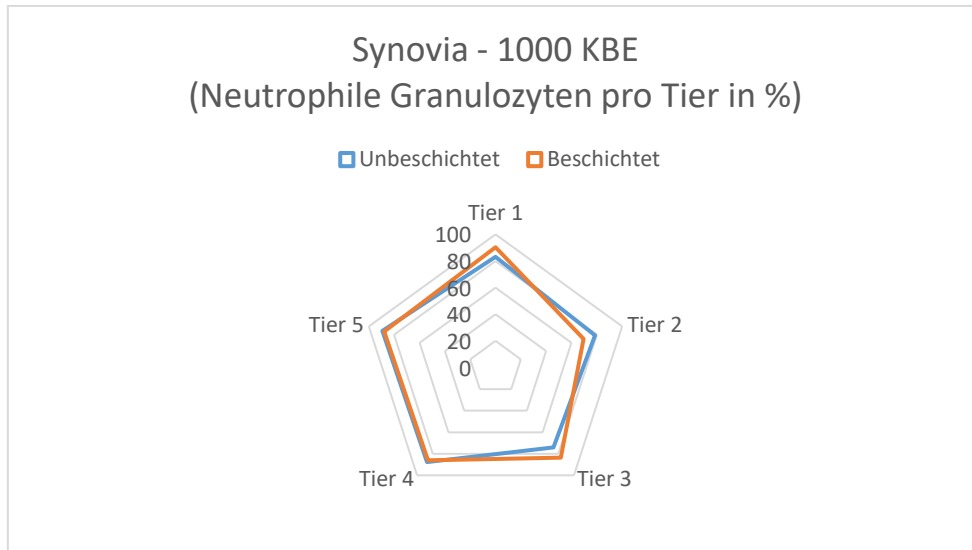


ABBILDUNG 28: NETZDIAGRAMM (SYNOVIA; 1000 KBE)

Der Boxplot (Abbildung 29) zeigt die Verteilung der Messdaten über alle Tiere der Versuchsgruppe, sowie den Median und den Mittelwert der erfassten Ergebnisse. Der Unterschied in der prozentualen Verteilung Neutrophiler Granulozyten zwischen unbeschichteter und beschichteter Implantatseite ist nicht signifikant.

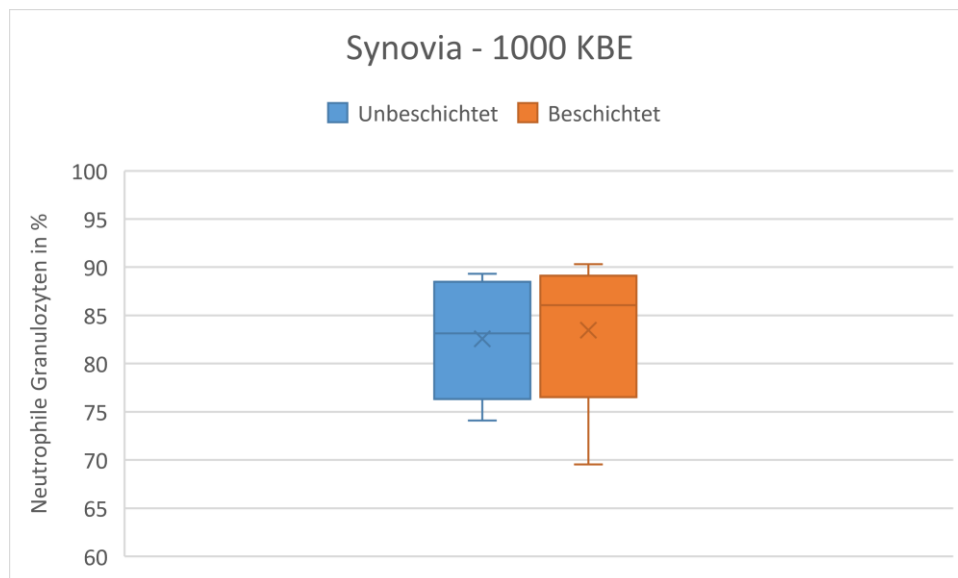


ABBILDUNG 29: BOXPLOT (SYNOVIA; 1000 KBE)

Auch für die Proben der Synoviagruppe mit 1000 KBE zeigt die visuelle Analyse insgesamt keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich des Faktors Beschichtung und lässt keine klare Aussage über die Wirksamkeit zu.

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Nachweisverfahren Normalverteilung (Gewebe- und Synoviaprobe; via Excel)

Zunächst wurden die Proben mit einem auf dem Kolmogorow-Test basierenden Microsoft Excel Tool auf Normalverteilung überprüft. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 26):

TABELLE 26: TEST AUF NORMALVERTEILUNG NACH KOLMOGOROV (EXCEL)

Typ	KBE	Beschichtung	Test	Fälle n
Synovia	0	unbeschichtet	bestanden	8
Synovia	0	beschichtet	bestanden	8
Synovia	100	unbeschichtet	bestanden	3
Synovia	100	beschichtet	bestanden	2
Synovia	1000	unbeschichtet	bestanden	5
Synovia	1000	beschichtet	bestanden	5
Gewebe	0	unbeschichtet	bestanden	8
Gewebe	0	beschichtet	bestanden	8
Gewebe	1000	unbeschichtet	bestanden	5
Gewebe	1000	beschichtet	bestanden	5

Alle Gruppen haben den Kolmogorov-Test bestanden, auf sie kann der t-Test folglich angewendet werden. Die anschließende detaillierte statistische Auswertung der einzelnen Gruppen erfolgte ebenso mit Excel. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch SPSS verifiziert.

3.3.2 Detaillierte statistische Auswertung der 0 KBE Gruppe

3.3.2.1 Gewebe 0 KBE

Die Deskriptive Analyse der Gewebedaten der Gruppe KBE 0 stellt sich im Vergleich wie folgt dar (Berechnung in Excel, mit SPSS abgeglichen; Tabelle 27):

TABELLE 27: DESKRIPTIVE ANALYSE (GEWEB; 0 KBE)

<i>KBE 0</i>	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	15,62	2,89
Standardfehler	3,66	0,65
Median	13,51	3,41
Standardabweichung	10,35	1,84
Stichprobenvarianz	107,21	3,37
Kurtosis	0,22	-1,31
Schiefte	0,85	-0,07
Wertebereich	31,43	5,15
Minimum	3,33	0,38
Maximum	34,76	5,53
Summe	124,98	23,11
Anzahl	8	8
k-größter Wert(1)	34,76	5,53
k-kleinsten Wert(1)	3,33	0,38
Konfidenzniveau(95,0%)	8,66	1,54

Die Alternativhypothese wird durch die deutliche Verringerung des Mittelwertes (=prozentualer Anteil der Neutrophilen Granulozyten) plausibel, insbesondere da auch die Standardabweichung (und damit die Varianz) bei den beschichteten Implantaten deutlich geringer ausfällt.

Die t-Test-Voraussetzungen sind in 3.3.1 überprüft. Tabelle 28 stammt aus dem Datenanalyse-Addon von Excel, die Ergebnisse sind mit SPSS abgeglichen.

TABELLE 28: ZWEISTICHPROBEN T-TEST BEI ABHÄNGIGEN STICHPROBEN (PAARVERGLEICHSTEST, GEWEBE; 0 KBE; EXCEL)

	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	15,62235	2,8887
Varianz	107,2144202	3,37201297
Beobachtungen	8	8
Pearson Korrelation	-0,367543403	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	7	
t-Statistik	3,227028852	
P(T<=t) einseitig	0,007255676	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,894578605	
P(T<=t) zweiseitig	0,014511351	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,364624252	

Die errechnete Prüfgröße liegt mit gerundet 3,23 deutlich über dem einseitigen kritischen Wert von 1,89. Der t-Test ist signifikant, die Nullhypothese gilt als abgelehnt, die Alternativhypothese wird dadurch angenommen, das heißt der Faktor Beschichtung führt zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen Granulozyten.

TABELLE 29: T-TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (GEWEBE; 0 KBE; SPSS)

	Gepaarte Differenzen						T	df	Sig. (2-seitig)
	Mittelwert	Std.- Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz					
				Untere	Obere				
Paaren unbeschichtet 1 - beschichtet	12,73	11,16	3,95	3,40	22,06	3,227	7	,015	

Der durch SPSS errechnete Signifikanzwert (siehe Tabelle 29) liegt mit 0,015 (zweiseitig) deutlich unter dem α -Wert von 0,05 und belegt statistisch die Mittelwertsunterschiedlichkeit. Da dieser Wert wegen der einseitig gerichteten Alternativhypothese noch halbiert werden muss, ergibt sich der einseitig gerichtete Signifikanzwert von gerundet 0,0075. Die Nullhypothese wird auch hier abgelehnt, die Alternativhypothese angenommen. Der Unterschied der Mittelwerte ist statistisch signifikant.

Man kann den Effekt der Beschichtung mittels Ca(OH)₂ mit dem Effektgrößenmaß nach Cohen (Abbildung 30) quantifizieren, dem Cohens d. Es wird hier in der aktuellen Form als gepoolte Standardabweichung manuell in Excel berechnet (Tabelle 30):

$$d = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\delta}$$

$$d = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\frac{\sum(x_1 - \mu_1)^2 + \sum(x_2 - \mu_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

ABBILDUNG 30: ORIGINALFORMEL VON COHEN; SOWIE ERWEITERTE FORMEL MIT GEPOOLTER STANDARDABWEICHUNG [177, 178]

TABELLE 30: EFFEKTGRÖßENMAß COHENS D (GEWEBE; 0 KBE)

Gewebe 0 KBE						
i	x1i unbeschichtet	xi - AM1	(x1i - AM1) ²	x2i beschichtet	x2i -AM2	(x2i -AM2) ²
1	16,1972	0,57485	0,330452522	0,9901	-1,8986	3,60468196
2	7,1698	-8,45255	71,4456015	0,3774	-2,5113	6,30662769
3	10,828	-4,79435	22,98579192	4,6875	1,7988	3,23568144
4	3,3333	-12,28905	151,0207499	5,53	2,6413	6,97646569
5	34,7594	19,13705	366,2266827	1,2658	-1,6229	2,63380441
6	18,8406	3,21825	10,35713306	3,4483	0,5596	0,31315216
7	24,8227	9,20035	84,64644012	3,4014	0,5127	0,26286129
8	9,0278	-6,59455	43,4880897	3,4091	0,5204	0,27081616
Mittelwert (AM1)	15,62235					
Summe 1			750,5009414			
Mittelwert (AM2)				2,8887		
Summe2						23,6040908

Wendet man die oben dargestellte Formel zur Berechnung des Effektgrößenmaßes auf die Werte in der Tabelle an, ergibt sich ein Cohens d-Wert von gerundet 1,713. Verglichen mit Effektgrößen nach Cohen ist der hier errechnete Effekt durch die

Beschichtung als sehr groß einzuordnen (Tabelle 31). Die Bedeutung und Gültigkeit dieser Effektgröße gilt unabhängig vom t-Test.

TABELLE 31: INTERPRETATION VON D NACH COHEN [177]

kleiner Effekt	d = 0,2
mittlerer Effekt	d = 0,5
großer Effekt	d = 0,8

Darüber hinaus wurde als zusätzlicher Entzündungsmarker der NLR-Wert (Neutrophilen-Lymphozyten-Relation) erfasst. Mit diesem aktuell in der Erforschung befindlichen Wert könnten beginnende Protheseninfektionen möglicherweise bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert oder eine zu frühe Revisionschirurgie verhindert werden [179, 180].

Die Ermittlung der NLR-Werte (Tabelle 32) ergab für nahezu alle Gewebeproben mit 0 KBE ein günstiges Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis. Mit einer Ausnahme lagen bei den linksseitig entnommenen Proben (=Beschichtung) proportional weniger Neutrophile Granulozyten und dafür mehr Lymphozyten vor als bei den rechtsseitig entnommenen Proben. Dies spiegelt sich in den jeweils geringeren NLR-Werten wider.

TABELLE 32: NLR-WERTE (GEWEBE; 0 KBE)

Versuchsgruppe	Tier	Implantat	NLR-Wert	NLR(li) < NLR(re)
13.04.2016 → Gewebe → 0 KBE	Tier 1	unbeschichtet (rechts)	0,343	✓
		beschichtet (links)	0,133	
	Tier 2	unbeschichtet (rechts)	0,142	✓
		beschichtet (links)	0,008	
	Tier 3	unbeschichtet (rechts)	0,198	✓
		beschichtet (links)	0,086	
	Tier 4 *	unbeschichtet (rechts)	0,045	✗
		beschichtet (links)	0,083	
21.04.2016 → Gewebe → 0 KBE	Tier 5	unbeschichtet (rechts)	0,970	✓
		beschichtet (links)	0,021	
	Tier 6	unbeschichtet (rechts)	0,292	✓
		beschichtet (links)	0,048	
	Tier 7	unbeschichtet (rechts)	0,412	✓
		beschichtet (links)	0,048	
	Tier 8	unbeschichtet (rechts)	0,151	✓
		beschichtet (links)	0,046	

* Präparat 4 besteht nur aus Fettgewebe, daher Abweichungen von übrigen Präparaten

3.3.2.2 Synovia 0 KBE

Die Deskriptive Analyse (Tabelle 33) der Synoviadaten der Gruppe KBE 0 stellt sich wie folgt dar:

TABELLE 33: DESKRIPTIVE ANALYSE (SYNOVIA; 0 KBE)

<i>Synovia KBE 0</i>	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	15,15	6,28
Standardfehler	3,25	1,29
Median	14,77	6,27
Standardabweichung	9,18	3,66
Stichprobenvarianz	0,0084	0,0013
Kurtosis	-1,83	0,5861
Schiefte	0,23	-0,16
Wertebereich	22,59	12,16
Minimum	4,94	0,00
Maximum	27,53	12,16
Summe	121,18	50,26
Anzahl	8	8
k-größter Wert(1)	27,53	12,16
k-kleinsten Wert(1)	4,94	0
Konfidenzniveau(95,0%)	7,68	3,06

Deskriptiv kann auch hier, analog zu den Gewebedaten, gesagt werden, dass ein Effekt durch die Beschichtung offensichtlich gegeben ist, die Mittelwerte und die Abweichungen sind deutlich verringert.

Die t-Test-Voraussetzungen sind in Kapitel 3.3.1 überprüft. Tabelle 34 stammt aus dem Datenanalyse-Addon von Excel, die Ergebnisse sind mit SPSS abgeglichen.

TABELLE 34: ZWEISTICHPROBEN T-TEST BEI ABHÄNGIGEN STICHPROBEN (PAARVERGLEICHSTEST; SYNOVIA; 0 KBE; EXCEL)

	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	15,147901	6,282982
Varianz	0,843544	0,134143
Beobachtungen	8	8
Pearson Korrelation	0,04563393	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	7	
t-Statistik	2,57660663	
P(T<=t) einseitig	0,01832657	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,89457861	
P(T<=t) zweiseitig	0,03665315	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,36462425	

Die errechnete Prüfgröße liegt mit gerundet 2,58 deutlich über dem einseitigen kritischen Wert von 1,89. Der t-Test ist signifikant, die Nullhypothese gilt als abgelehnt, die Alternativhypothese wird auch bei Synovia 0 KBE angenommen.

Ergänzend der t-Test mit der Ausgabe des Signifikanzwertes in SPSS (Tabelle 35):

TABELLE 35: TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (SYNOVIA; 0 KBE; SPSS)

	Mittelwert	Std.- Abweichung	Gepaarte Differenzen		T	df	Sig. (2- seitig)	
			Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paaren unbeschichtet 1 - beschichtet	8,86	9,73	3,44	0,72	17,00	2,577	7	,037

Der durch SPSS errechnete Signifikanzwert liegt mit 0,037 (zweiseitig) deutlich unter dem α -Wert von 0,05 und belegt statistisch die Mittelwertsunterschiedlichkeit. Da dieser Wert wegen der einseitig gerichteten Alternativhypothese noch halbiert werden

muss, ergibt sich der einseitig gerichtete Signifikanzwert von gerundet 0,0185. Die Nullhypothese wird auch hier abgelehnt, die Alternativhypothese angenommen.

Der Unterschied der Mittelwerte ist statistisch signifikant. Die Beschichtung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ führt zu einer signifikanten Reduktion Neutrophiler Granulozyten.

Auch für diese Gruppe wird Cohens Effektgröße d berechnet (Tabelle 36):

TABELLE 36: EFFEKTGRÖßENMAß COHENS D (SYNOVIA; 0 KBE)

Synovia 0 KBE						
i	x1i unbeschichtet	xi - AM1	(x1i - AM1) ²	x2i beschichtet	x2i -AM2	(x2i -AM2) ²
1	26,3736	11,2257	126,0163405	9,0909	2,807925	7,88444281
2	10,3896	-4,7583	22,64141889	7,0796	0,796625	0,63461139
3	27,5281	12,3802	153,269352	7,6923	1,409325	1,98619696
4	19,5313	4,3834	19,21419556	0,0000	-6,282975	39,4757749
5	8,0882	-7,0597	49,83936409	12,1622	5,879225	34,5652866
6	19,1489	4,001	16,008001	5,4545	-0,828475	0,68637083
7	5,1852	-9,9627	99,25539129	3,5211	-2,761875	7,62795352
8	4,9383	-10,2096	104,2359322	5,2632	-1,019775	1,03994105
Mittelwert (AM1)	15,1479					
Summe 1			590,4799955			
Mittelwert (AM2)				6,282975		
Summe2						93,900578

Eingesetzt in die zuvor genannte Formel für das Effektmaß ergibt es für Cohens d einen Wert in Höhe von gerundet 1,27. Der Effekt durch die Beschichtung kann folglich als sehr groß angesehen werden.

Die Ermittlung der NLR-Werte (Tabelle 37) ergab auch für einen Großteil der Synoviaprobe mit 0 KBE ein günstiges bzw. verbessertes Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis. Mit zwei Ausnahmen lagen bei den linksseitig entnommenen Proben (=Beschichtung) proportional weniger Neutrophile Granulozyten und dafür mehr Lymphozyten vor als bei den rechtsseitig entnommenen Proben. Diese Ergebnisse lassen auf eine abgemilderte Entzündungsreaktion bzw. bessere Einheilung bei den beschichteten Implantaten schließen.

TABELLE 37: NLR-WERTE (SYNOVIA; 0 KBE)

Versuchsgruppe	Tier	Implantat	NLR-Wert	NLR(li) < NLR(re)
13.04.2016 → Synovia → 0 KBE	Tier 1	unbeschichtet (rechts)	0,414	✓
		beschichtet (links)	0,120	
	Tier 2	unbeschichtet (rechts)	0,129	✓
		beschichtet (links)	0,084	
	Tier 3	unbeschichtet (rechts)	0,419	✓
		beschichtet (links)	0,101	
	Tier 4	unbeschichtet (rechts)	0,298	✓
		beschichtet (links)	0,000	
21.04.2016 → Synovia → 0 KBE	Tier 5	unbeschichtet (rechts)	0,100	X
		beschichtet (links)	0,173	
	Tier 6	unbeschichtet (rechts)	0,269	✓
		beschichtet (links)	0,077	
	Tier 7	unbeschichtet (rechts)	0,066	✓
		beschichtet (links)	0,050	
	Tier 8	unbeschichtet (rechts)	0,063	X
		beschichtet (links)	0,095	

3.3.3 Detaillierte statistische Auswertung der 100 KBE Gruppe (Synovia)

Die Deskriptive Analyse (Tabelle 38) der Synoviadaten der Gruppe KBE 100 stellt sich im Vergleich wie folgt dar (Berechnung in Excel, mit SPSS abgeglichen):

TABELLE 38: DESKRIPTIVE ANALYSE (SYNOVIA; 100 KBE)

<i>Synovia KBE 100</i>	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	90,72	80,85
Standardfehler	3,01	1,92
Median	90,72	80,85
Standardabweichung	4,26	2,72
Stichprobenvarianz	0,001817299	0,000738957
Kurtosis	---	---
Schiefe	---	---
Wertebereich	6,03	3,84
Minimum	87,70	78,93
Maximum	93,73	82,77
Summe	181,44	161,70
Anzahl	2	2
k-größter Wert(1)	93,73	82,77
k-kleinsten Wert(1)	87,70	78,93
Konfidenzniveau(95,0%)	38,30	24,42

Deskriptiv zeigen sich auch bei den Synoviaproben mit 100 KBE grundsätzlich verringerte Mittelwerte und Abweichungen im Vergleich zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Implantat. Es kann also weiterhin von einem Effekt der Beschichtung ausgegangen werden, auch wenn sich die Unterschiede nicht als so groß wie bei der Versuchsgruppe mit 0 KBE darstellen.

Abgesichert wird der Effekt durch den t-Test. Tabelle 39 stammt aus dem Datenanalyse-Addon von Excel, die Ergebnisse sind mit SPSS abgeglichen:

TABELLE 39: ZWEISTICHPROBEN T-TEST BEI ABHÄNGIGEN STICHPROBEN (PAARVERGLEICHSTEST; SYNOVIA; 100 KBE; EXCEL)

	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	90,7192997	80,85009425
Varianz	18,173	7,38957
Beobachtungen		2
Pearson Korrelation		1
Hypothetische Differenz der Mittelwerte		0
Freiheitsgrade (df)		1
t-Statistik	9,03608945	
P(T<=t) einseitig	0,03508375	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	6,31375151	
P(T<=t) zweiseitig	0,07016749	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	12,7062047	

Der t-Test gilt mit gerundet 9,04 zu 6,31 als signifikant bestanden. Der Mittelwertsunterschied ist auch bei Synovia mit 100 KBE signifikant.

TABELLE 40: T-TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (SYNOVIA; 100 KBE; SPSS)

		Gepaarte Differenzen			
		95% Konfidenzintervall der Differenz			
		Obere	T	df	Sig. (2-seitig)
Paaren 1	unbeschichtet - beschichtet	23,74691%	9,036	1	,070

Der durch SPSS errechnete Signifikanzwert liegt bei 0,070 (zweiseitig; siehe Tabelle 40). Da dieser Wert wegen der einseitig gerichteten Alternativhypothese noch halbiert werden muss, ergibt sich der einseitig gerichtete Signifikanzwert von gerundet 0,035 und belegt die Mittelwertsunterschiedlichkeit. Die Nullhypothese wird folglich auch hier abgelehnt, die Alternativhypothese angenommen. Der Unterschied der Mittelwerte ist

statistisch signifikant. Die Beschichtung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ führt zu einer signifikanten Reduktion Neutrophiler Granulozyten.

Die Berechnung der Effektstärke nach Cohen zeigt Tabelle 41:

TABELLE 41: EFFEKTGRÖßENMAß COHENS D (SYNOVIA; 100 KBE)

Synovia 100 KBE						
i	x1i unbeschichtet	xi - AM1	(x1i - AM1) ²	x2i beschichtet	x2i -AM2	(x2i -AM2) ²
1	93,73	3,015	9,090225	82,77	1,92	3,6864
2	87,7	-3,015	9,090225	78,93	-1,92	3,6864
Mittelwert (AM1)	90,715					
Summe 1			18,18045			
Mittelwert (AM2)				80,85		
Summe2						7,3728

Nach Berechnung der Werte nach genannter Formel liegt die Effektgröße bei dieser Versuchsgruppe bei 2,76. Dies ist nach Cohen als großer Effekt zu werten.

Die Ermittlung der NLR-Werte (siehe Tabelle 42) ergibt für die Synoviaprobe mit 100 KBE aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Proben kein eindeutiges Bild. Da bei einem Versuchstier keine Synoviaprobe verfügbar war und die beiden verbliebenen Proben unterschiedliche Ergebnisse lieferten, ist hier keine Aussage über eine eindeutige Tendenz zur Verhältnisänderung Neutrophiler Granulozyten zu Lymphozyten möglich. Die Analyse der NLR-Werte liefert für die 100 KBE Gruppe hinsichtlich des Faktors Beschichtung keine klaren Ergebnisse.

TABELLE 42: NLR-WERTE (SYNOVIA; 100 KBE)

Versuchsgruppe	Tier	Implantat	NLR-Wert	NLR(li) < NLR(re)
19.05.2015 → Synovia → 100 KBE	Tier 1	unbeschichtet (rechts)	5,200	Nicht bestimmbar
		beschichtet (links)	Fehlend	
	Tier 2	unbeschichtet (rechts)	35,900	✓
		beschichtet (links)	9,721	
	Tier 3	unbeschichtet (rechts)	14,267	✗
		beschichtet (links)	22,474	

3.3.4 Detaillierte statistische Auswertung der 1000 KBE Gruppe

3.3.4.1 Gewebe 1000 KBE

Die Deskriptive Analyse (Tabelle 43) der Gewebedaten der Gruppe KBE 1000 stellt sich im Vergleich wie folgt dar (Berechnung in Excel, mit SPSS abgeglichen):

TABELLE 43: DESKRIPTIVE ANALYSE (GEWEBE; 1000 KBE)

<i>Gewebe KBE 1000</i>	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	58,23	43,33
Standardfehler	13,99	9,51
Median	76,82	52,74
Standardabweichung	31,29	21,26
Stichprobenvarianz	978,77	452,07
Kurtosis	-2,22	4,49
Schiefe	-0,77	-2,10
Wertebereich	67,87	51,04
Minimum	15,70	5,78
Maximum	83,57	56,82
Summe	291,13	216,65
Anzahl	5	5
k-größter Wert(1)	83,57	56,82
k-kleinsten Wert(1)	15,70	5,78
Konfidenzniveau(95,0%)	38,85	26,40

Betrachtet man rein die Mittelwerte und die Abweichungen in der deskriptiven Analyse der Gewebeprobe mit 1000 KBE, scheint ein Effekt der Beschichtung vermeintlich vorhanden zu sein.

Klarheit bringt an dieser Stelle der t-Test, dessen Voraussetzungen in 3.3.1 überprüft worden sind. Tabelle 44 stammt aus dem Datenanalyse-Addon von Excel, die Ergebnisse sind mit SPSS abgeglichen (Tabelle 45).

TABELLE 44: ZWEISTICHPROBEN T-TEST BEI ABHÄNGIGEN STICHPROBEN (PAARVERGLEICHSTEST; GEWEBE; 1000 KBE; EXCEL)

	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	58,22676	43,32998
Varianz	978,7651206	452,073441
Beobachtungen	5	5
Pearson Korrelation	-0,413858937	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	0,748321992	
P(T<=t) einseitig	0,247932893	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,131846786	
P(T<=t) zweiseitig	0,495865786	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776445105	

Tatsächlich liegt die rechnerisch ermittelte Prüfgröße mit gerundet 0,75 deutlich unter dem einseitigen kritischen Wert von 2,13. Der t-Test ist demnach nicht signifikant, die Nullhypothese muss als angenommen gelten und die Alternativhypothese wird dadurch abgelehnt. Von einem Effekt der Beschichtung kann folglich – entgegen der Aussage, die nach der deskriptiven Analyse anzunehmen war – nicht ausgegangen werden. Das heißt der Faktor Beschichtung führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen Granulozyten. Es kann bei einer Konzentration von 1000 KBE kein klarer Unterschied mehr zwischen den Versuchsgruppen ausgemacht werden.

TABELLE 45: T-TEST BEI GEPAARTEN STICHPROBEN (GEWEBE; 1000 KBE; SPSS)

SPSS t-Test bei gepaarten Stichproben^a

		Gepaarte Differenzen			
		95% Konfidenzintervall der Differenz			
		Untere	Obere	T	df
Paaren 1	unbeschichtet - beschichtet	-40,3736682	70,1672282	,748	4

Sig. (2-seitig)

Paaren 1	unbeschichtet – beschichtet	,496
----------	-----------------------------	------

Auch SPSS liefert mit einer ermittelten Prüfgröße von 0,748 ein identisches Ergebnis wie Excel. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

Die Berechnung der Effektstärke nach Cohen zeigt Tabelle 46:

TABELLE 46: EFFEKTGRÖßENMAß COHENS D (GEWEBE; 1000 KBE)

Gewebe 1000 KBE						
i	x1i unbeschichtet	xi - AM1	(x1i - AM1) ²	x2i beschichtet	x2i - AM2	(x2i - AM2) ²
1	81,1607	22,93394	525,9656039	5,7803	-37,54968	1409,97847
2	33,8843	24,34246	592,5553589	47,4553	4,12532	17,0182651
3	15,6997	42,52706	1808,550832	56,8207	13,49072	181,999526
4	83,5725	25,34574	642,4065361	52,7389	9,40892	88,5277756
5	76,8166	18,58984	345,5821512	53,8547	10,52472	110,769731
Mittelwert (AM1)	58,22676					
Summe 1			3915,060482			
Mittelwert (AM2)				43,32998		
Summe2						1808,29377

Die Effektgröße nach Cohen liegt nach Berechnung unter Verwendung der Tabellenwerte bei gerundet 0,56, was als mittlerer Effekt gilt.

Die Ermittlung der NLR-Werte ergibt für die Gewebeproben mit 1000 KBE folgende Ergebnisse (Tabelle 47):

TABELLE 47: NLR-WERTE (GEWEBE; 1000 KBE)

Versuchsgruppe	Tier	Implantat	NLR-Wert	NLR(li) < NLR(re)
07.07.2015 → Gewebe → 1000 KBE	Tier 1	unbeschichtet (rechts)	8,078	✓
		beschichtet (links)	0,085	✓
	Tier 2	unbeschichtet (rechts)	0,872	X
		beschichtet (links)	1,568	X
	Tier 3	unbeschichtet (rechts)	0,324	X
		beschichtet (links)	2,100	X
21.07.2015 → Gewebe → 1000 KBE	Tier 4	unbeschichtet (rechts)	8,826	✓
		beschichtet (links)	1,792	✓
	Tier 5	unbeschichtet (rechts)	5,766	✓
		beschichtet (links)	1,967	✓

In drei von fünf Fällen liegt ein verbessertes Verhältnis von Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten für die beschichteten Implantate vor.

3.3.4.2 Synovia 1000 KBE

Die Deskriptive Analyse der Synoviadaten der Gruppe KBE 1000 stellt sich im Vergleich wie folgt dar (Berechnung in Excel, mit SPSS abgeglichen; Tabelle 48):

TABELLE 48: DESKRIPTIVE ANALYSE (SYNOVIA; 1000 KBE)

<i>Synovia KBE 1000</i>	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	82,56	83,46
Standardfehler	2,83	3,66
Median	83,12	86,06
Standardabweichung	6,32	8,18
Stichprobenvarianz	0,003994958	0,006689322
Kurtosis	-1,609	3,259
Schiefe	-0,371	-1,733
Wertebereich	15,23	20,79
Minimum	74,10	69,53
Maximum	89,33	90,32
Summe	412,80	417,31
Anzahl	5	5
k-größter Wert(1)	89,33	90,32
k-kleinsten Wert(1)	74,10	69,53
Konfidenzniveau(95,0%)	7,85	10,16

Für die Synoviaproben mit 1000 KBE zeigt sich, dass sowohl Mittelwert als auch Abweichungen auf der beschichteten Implantatseite im Vergleich zur unbeschichteten Seite erhöht sind. Von einem Effekt der Beschichtung kann der deskriptiven Analyse zufolge also nicht mehr ausgegangen werden.

Die t-Test-Voraussetzungen sind in 3.3.1 überprüft. Die Tabelle 49 stammt aus dem Datenanalyse-Addon von Excel, die Ergebnisse sind mit SPSS abgeglichen.

TABELLE 49: ZWEISTICHPROBEN T-TEST BEI ABHÄNGIGEN STICHPROBEN (PAARVERGLEICHSTEST; SYNOVIA; 1000 KBE; EXCEL)

	<i>unbeschichtet</i>	<i>beschichtet</i>
Mittelwert	0,82560289	0,83461605
Varianz	0,00399496	0,00668932
Beobachtungen	5	5
Pearson Korrelation	0,49565322	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	-0,270293	
P(T<=t) einseitig	0,40015384	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,13184679	
P(T<=t) zweiseitig	0,80030767	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,77644511	

Die Prüfgröße im t-Test liegt bei errechneten -0,27 (gerundet) und liegt weit unterhalb des kritischen einseitigen Wertes von 2,13 (gerundet), damit wird der Test nicht signifikant. Aufgrund der Eindeutigkeit des Ergebnisses konnte auf eine Verifizierung durch SPSS verzichtet werden.

Die Berechnung der Effektstärke nach Cohen zeigt Tabelle 50:

TABELLE 50: EFFEKTGRÖßENMAß COHENS D (SYNOVIA; 1000 KBE)

Synovia 1000 KBE						
n	x1i unbeschichtet	xi - AM1	(x1i - AM1) ²	x2i beschichtet	x2i -AM2	(x2i -AM2) ²
1	83,12	0,56	0,3136	90,32	6,86	47,0596
2	78,57	-3,99	15,9201	69,53	-13,93	194,0449
3	74,1	-8,46	71,5716	83,49	0,03	0,0009
4	87,68	5,12	26,2144	86,06	2,6	6,76
5	89,33	6,77	45,8329	87,9	4,44	19,7136
Mittelwert (AM1)	82,56					
Summe 1			159,8526			
Mittelwert (AM2)				83,46		
Summe2						267,579

Die Effektgröße nach Cohen liegt bei gerundet -0,12. Das negative Vorzeichen zeigt an, dass hier die Beschichtung überhaupt keinen intendierten Effekt mehr hat.

Die Ermittlung der NLR-Werte (Tabelle 51) ergibt für die Synoviaprobe mit 1000 KBE ein den Gewebeprobe sehr ähnliches Ergebnis. Nur in zwei von fünf Fällen liegt ein verbessertes Verhältnis von Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten für die beschichteten Implantate vor. Von einem klaren Unterschied durch den Faktor Beschichtung kann bei der NLR-Analyse nicht ausgegangen werden.

TABELLE 51: NLR-WERTE (SYNOVIA; 1000 KBE)

Versuchsgruppe	Tier	Implantat	NLR-Wert	NLR(li) < NLR(re)
07.07.2015 → Synovia → 1000 KBE	Tier 1	unbeschichtet (rechts)	7,607	X
		beschichtet (links)	21,000	
	Tier 2	unbeschichtet (rechts)	4,925	✓
		beschichtet (links)	2,840	
	Tier 3	unbeschichtet (rechts)	3,768	X
		beschichtet (links)	15,000	
21.07.2015 → Synovia → 1000 KBE	Tier 4	unbeschichtet (rechts)	13,500	X
		beschichtet (links)	15,300	
	Tier 5	unbeschichtet (rechts)	17,107	✓
		beschichtet (links)	14,767	

3.3.5 Statistik - Tabellarische Zusammenfassung

Nach der ausführlichen statistischen Analyse ergibt sich ein klares Bild darüber, für welche Versuchsgruppen die Nullhypothese als abgelehnt und die Alternativhypothese als angenommen gelten kann, das heißt für welche Versuchsgruppen eine Beschichtung mit Ca(OH)_2 zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen Granulozyten geführt hat (Tabelle 52). Die entsprechenden Versuchsgruppen sind in Tabelle 52 grün hervorgehoben.

TABELLE 52: ERGEBNISSE DES T-TESTS (BESTANDENE TESTS SIND GRÜN HERVORGEHOBEN)

Test	KBE	Tiere n	Paare n	t-Test Sig. einseitig	Cohens d
Gewebe	0	16	8	0,007	1,713
Gewebe	1000	10	5	0,248	0,56
Synovia	0	16	8	0,018	1,27
Synovia	100	5	2	0,035	2,76
Synovia	1000	10	5	0,400	-0,12

Tabelle 53 zeigt darüber hinaus das mittlere prozentuale Aufkommen von Neutrophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Versuchsgruppen, unterteilt in linksseitig und rechtsseitig entnommene Proben. Jene Versuchsgruppen, bei denen der intendierte, signifikante Unterschied zu beobachten war, sind dabei grün hinterlegt. Bei den rot hinterlegten Versuchsgruppen war keine signifikante Wirkung nachweisbar.

TABELLE 53: PROZENTUALE MITTELWERTE DER NEUTROPHILEN-ANZAHL

Testgruppe	unbeschichtetes Implantat (rechts)	beschichtetes Implantat (links)
Gewebe 0 KBE	15,62	2,89
Gewebe 1000 KBE	58,23	43,33
Synovia 0 KBE	15,15	6,28
Synovia 100 KBE	90,72	80,85
Synovia 1000 KBE	82,56	83,46

Zuletzt seien in Tabelle 54 auch die Ergebnisse der ermittelten NLR-Werte im Überblick dargestellt. Interessant sind dabei vor allem jene Proben, die linksseitig einen proportional höheren Anteil an Lymphozyten aufweisen als rechtsseitig, und damit Vermutungen über die Wirksamkeit der getesteten Beschichtung zulassen.

TABELLE 54: ABSOLUTE UND PROZENTUALE ANZAHL DER NLR-WERTE [NLR(LI) < NLR(RE)]

Versuchsgruppe	Anzahl der NLR-Werte [NLR(li) < NLR(re)]	Prozentualer Anteil NLR- Werte [NLR(li) < NLR(re)]
Gewebe 0 KBE	7 von 8 Werte	87,5
Gewebe 1000 KBE	3 von 5 Werte	60,0
Synovia 0 KBE	6 von 8 Werte	75,0
Synovia 100 KBE	1 von 2 Werte	50,0
Synovia 1000 KBE	2 von 5 Werte	40,0

4. Diskussion

Das Ziel der Studie war die Erprobung der Ca(OH)_2 -Beschichtung In vivo unter dem Aspekt, ob und inwieweit die antibakteriellen und somit auch antiinflammatorischen bzw. entzündungsmoderierenden Eigenschaften der Ca(OH)_2 -Beschichtung eine sinnvolle und effektive Ergänzung zu den bisher erfolgreich eingesetzten CaP-Beschichtungen mit bewiesenen, guten proosseointegrativen Eigenschaften bei lasttragenden Implantaten sein können.

4.1 Die Versuchsgruppen 0 KBE und 100 KBE

Bei der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile der Neutrophilen Granulozyten konnte für die Gewebeproben der 0 KBE Gruppe sowie für die Synoviaprobe der 0 KBE und 100 KBE Gruppe eine statistisch signifikante Differenz/Wirkung nachgewiesen werden. Für diese Gruppen konnte die Alternativhypothese (die Beschichtung der Implantate mit Ca(OH)_2 führt zu einer Reduktion der Entzündungsparameter, speziell der Neutrophilen Granulozyten) somit als angenommen bestätigt werden (zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wurden keine Gewebeproben der 100 KBE-Gruppe entnommen). Für die Versuche bedeutet dies, dass die Beschichtung der Implantate mit Ca(OH)_2 einen eindeutig nachweisbaren Effekt auf den Verlauf der Entzündungsreaktion hatte und die Ergebnisse der In vitro Untersuchung damit als verifiziert gelten können. Für die Gruppen Gewebe 0 KBE, Synovia 0 KBE sowie Synovia 100 KBE konnte bei den Proben der beschichteten linken Seite prozentual ein signifikant geringerer Anteil Neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden als auf der unbeschichteten rechten Seite. Bei Synoviaprobe der 0 KBE Gruppe konnten zwischen den beschichteten und unbeschichteten Implantaten eine Differenz von bis zu 19,84% beobachtet werden, bei Synovia 100 KBE ergab sich ein Wert von 10,96%. Bei den Gewebeproben der 0 KBE-Gruppe wurden sogar Wertunterschiede von bis zu 33,49% nachgewiesen.

Die statistische Analyse wird weiterhin durch die erfassten NLR-Werte, die das Verhältnis von Neutrophilen und Lymphozyten beschreibt, gestützt. Mit diesem Wert

könnten beginnende Protheseninfektionen möglicherweise bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert und eine vermeintliche Revisionschirurgie verhindert werden. In entsprechenden Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass der CRP-Wert in Blutproben als herkömmlicher Entzündungsmarker auch bei unproblematischen Verläufen zum Teil bis zu drei Wochen nach der Operation ungewöhnlich stark erhöht war. Der NLR-Wert hingegen normalisierte sich postoperativ wesentlich schneller [179, 180]. Ein günstiges Ergebnis liegt vor, wenn das Verhältnis von Neutrophilen und Lymphozyten sich zu Gunsten der Lymphozyten verschiebt, d.h. der effektive NLR-Wert über den beobachteten Zeitraum kleiner wird. In der vorliegenden Studie wurden die Werte nicht über einen Zeitraum hinweg erfasst, sondern vergleichend die Werte zwischen beschichteter und unbeschichteter Implantatseite zum gleichen Zeitpunkt erfasst. Auch wenn es sich bei den untersuchten Proben nicht um Blut- sondern um Gewebe- und Synoviaprobe handelt, könnte der NLR-Wert dennoch Rückschlüsse auf das lokale Entzündungsgeschehen zulassen und die statistischen Auswertungen somit gegebenenfalls unterstützen.

Von den 8 erfassten Gewebe-NLR-Wertpaaren zwischen linkem und rechtem Implantat konnte bei 7 Wertpaaren (87,5%) ein proportional höherer Anteil Lymphozyten auf der beschichteten Seite als auf der unbeschichteten Seite nachgewiesen werden. Bei den Synovia-Proben konnten bei 6 von 8 Wertpaaren (75,0%) ein „besseres“ Verhältnis von Neutrophilen und Lymphozyten für die beschichteten Implantate nachgewiesen werden. Der NLR-Wert könnte damit die angenommene Alternativhypothese (der Faktor Beschichtung mit Ca(OH)_2 führt zu einer Reduzierung der Neutrophilen Granulozyten) als ergänzender Entzündungsmarker zusätzlich untermauern, da die Verhältnisänderung zu Gunsten der Lymphozyten als Frühmarker für einen besser moderierten Entzündungsverlauf sowie schnelleren Einheilprozess auf der jeweils linken mit beschichteten Implantaten versehenen Seite spricht.

Bei den Synoviaprobe der 100 KBE Gruppe fällt der Effekt der Beschichtung mit einer Differenz von 10,96% bzw. 8,77% zwischen dem unbeschichteten und dem

beschichteten Implantat zwar etwas geringer als bei 0 KBE Gruppen, wurde jedoch ebenfalls als signifikant bestätigt. Der NLR-Wert lässt für diese Gruppe keine Aussage zu, was im Wesentlichen auf die zu geringe Probenanzahl von nur 2 erfassbaren Wertpaaren zurückzuführen ist, wobei zu erwähnen ist, dass eine Probe ebenfalls einen verbesserten NLR-Wert zeigt, die andere jedoch nicht.

Die geringere Anzahl Neutrophiler Granulozyten auf der linken Seite lässt daher auf eine besser moderierte Entzündungsreaktion und damit auch auf eine schnellere Einheilung und bessere Osseointegration als auf der rechten Seite schließen. Die initiale Gewebereizung und oberflächliche Nekrose, wie sie in der Zahnmedizin bei histologisch aufbereiteten Zähnen nach direkter Pulpaüberkappung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zu beobachten ist [181], scheint hier keine relevante Rolle im intraartikulären Gewebe zu spielen und ließ sich nicht in den histologischen Schnitten nachweisen. Aufgrund der Nähe zum Implantat wäre dies höchstens in der initialen Einheilphase in früh gewonnenen Knochenpräparaten eventuell nachweisbar. Nachdem die Probenentnahme jedoch zu einem Zeitpunkt stattfand, an dem In vitro bereits keinerlei Aktivität von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ selbst mehr anzunehmen ist [14], bleibt weiterhin ungeklärt, ob in den ersten 1-3 Tagen die zelluläre Antwort auf die beschichteten Implantate andere Ergebnisse liefern würde.

In den In vitro Versuchen zeigte sich wie oben erwähnt, dass die Zellaktivität von Osteoblasten auf $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Vergleich zu reinen Titanimplantaten am 7. Tag am höchsten war [14]. Da die Versuchstiere zur Probenentnahme genau nach 7 Tagen euthanasiert wurden, könnte diese erhöhte Zellaktivität ebenfalls ein Grund für die stark verringerte Zahl an Neutrophilen Granulozyten bei den beschichteten Implantaten sein, da hier bereits Umbauvorgänge der Osteoblasten/Osteoklasten überwiegen und es sich bereits um einen weiter fortgeschrittenen Zeitpunkt der Einheilphase handeln könnte.

Bei einzelnen Proben, darunter eine Gewebeprobe (0 KBE Tier 4) und zwei Synoviaprobe (0 KBE Tier 5 und 8), wurden dagegen prozentual mehr Neutrophile auf der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -beschichteten Seite festgestellt. Da für die genannten Gruppen grundsätzlich eine signifikante Wirksamkeit bestätigt wurde, könnten die

Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen auf die biologische und physiologische Individualität der Tiere, etwa deren individuelle Reaktion auf den operativen Eingriff, zurückzuführen sein. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine anderweitige Kontamination der Versuchstiere kann durch den erbrachten bakteriellen Nachweis via Agar-Anzucht ausgeschlossen werden.

Während bei der 1000 KBE Versuchsgruppe vom 07.07.15 bei drei Versuchstieren bereits 4510 Zellen in den Gewebeproben erfasst wurden, konnten bei den vier Tieren der 0 KBE Gruppe vom 21.04.16 lediglich 1178 Zellen bei etwa identischer Anzahl der Präparate ausgezählt werden. Dieser Unterschied liegt sehr wahrscheinlich an der intensiveren Infektion der 1000 KBE Gruppe und der damit einhergehenden und zu erwartenden, stärkeren Entzündung. Dennoch ist die Zellanzahl der Versuchsgruppen mit 0 KBE, sowohl bei Gewebe- als auch Synoviaprobe, bemerkenswert gering, insbesondere unter dem Aspekt, dass auch diese Gruppen einer Operation und damit einer einhergehenden, abakteriellen Entzündungsreaktion ausgesetzt wurden.

4.2 Die Versuchsgruppe 1000 KBE

Für die Versuchsgruppen mit 1000 KBE zeigte die statistische Auswertung dagegen keine Signifikanz (bezogen auf $P=0,05$) und sowohl für die Gewebe- als auch für die Synovia-Proben durchwachsene Ergebnisse.

Die Gewebeproben der Tiere mit 1000 KBE wiesen zum Teil extreme Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Neutrophilen Granulozyten auf. Die Wertpaare schwankten dabei zwischen 81,16% (unbeschichtet) und 5,78% (beschichtet) bzw. 15,70% (unbeschichtet) und 56,82% (beschichtet). Bei derartigen Schwankungen ist keine eindeutige Wirksamkeit der Ca(OH)_2 -Beschichtung geschweige denn eine Signifikanz nachweisbar. Auch die Analyse der NLR-Werte lässt keine unterstützende Aussage zu, da von 5 verfügbaren Wertpaaren nur 3 Werte (60%) einen proportional höheren Anteil Lymphozyten auf der beschichteten Implantatseite nachwiesen.

Bei den Synoviaprobe n der 1000 KBE Versuchsgruppe stellen sich die Ergebnisse ähnlich dar. Im Unterschied zu den Gewebeprobe n, die sich vor allem durch sehr große Schwankungen in den Anteilen der Neutrophilen auszeichneten, wiesen die Synoviaprobe n kaum prozentuale Unterschiede auf. Während bei dem Versuchstier mit den geringsten Unterschieden lediglich eine Differenz von 1,43% zwischen dem unbeschichteten (89,33%) und dem beschichteten (87,90%) Implantat feststellbar war, betrug die größte erfasste Differenz zwischen unbeschichtetem (74,10%) und beschichtetem (83,49%) Implantat nur 9,39%. Der NLR-Wert wies in dieser Gruppe nur für 2 von 5 Wertpaaren (40%) ein verbessertes Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten auf der linken im Vergleich zur rechten Seite nach.

Der Effekt der bakteriellen Infektion scheint hier deutlich größer zu sein als der Effekt der entzündungsmoderierenden Ca(OH)_2 -Beschichtung, welche bei den Gruppen mit 0 KBE und 100 KBE noch deutlich zum tragen kam. Bei einer Infektion mit 1000 KBE scheint die körpereigene Immunabwehr mit der Bekämpfung der Bakterien so stark ausgelastet zu sein, dass die Einheilung zum Zeitpunkt der Untersuchung eher nebensächlich ist.

Insbesondere im Vergleich zu den Ergebnissen der 0 KBE Gruppe sind positive Effekte der Ca(OH)_2 -Beschichtung in der 1000 KBE Gruppe daher kaum nachweisbar bis uneinheitlich. Als Ursache für diese Ergebnisse sind einige Faktoren, gegebenenfalls auch ein Zusammenspiel mehrerer ungünstiger Faktoren, denkbar.

Höhe der Keimbelastung und Menge des Ca(OH)_2

Nachdem für die 0 KBE und 100 KBE Gruppe eine signifikante entzündungsmoderierende Wirkung nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Keimbelastung bei 1000 KBE schlicht zu hoch ist, um eine signifikante Wirkung der Beschichtung nachweisen zu können. Dies könnte durch die verhältnismäßig kleine Beschichtungsfläche (42 mm²) des Implantats und die dadurch für die Dicke der Beschichtung limitierte Menge an Ca(OH)_2 auf dem Implantat bedingt sein. Die Folge wäre, dass das Ca(OH)_2 seine Wirkung zwar grundsätzlich entfaltet, bei einer zu großen

Keimbelastung von 1000 KBE jedoch keine relevanten bzw. zuverlässigen Effekte mehr bewirken kann. Bei zu hoher bakterieller Kontamination reicht die abtötende Wirkung über den pH-Wert bzw. OH-Radikale demnach nicht für eine entsprechende Menge an Mikroorganismen aus. Bei einem geplanten operativen Eingriff mit steril vorbereitetem Umfeld ist von einer so hohen lokalen Kontamination nicht auszugehen.

Wirkdauer und Abbaukinetik

Weiterhin wäre ein Zusammenhang mit dem Abbau bzw. der Umwandlung von Ca(OH)_2 denkbar. In den In vitro Versuchen wurde im XRD-Diffraktogramm bereits nachgewiesen, dass die Calciumhydroxid-Peaks in physiologischer Lösung nach spätestens 3 Tagen nach Einbringung vollständig abgebaut und dafür die Bildung von Hydroxylapatit beinahe vollständig abgeschlossen waren [14].

Wenn dieser Vorgang im In vivo Versuch gleichermaßen schnell oder gegebenenfalls sogar noch schneller vonstatten geht, könnte die Wirkdauer von Ca(OH)_2 schlicht zu kurz sein, um die Keimbelastung von 1000 KBE effektiv zu reduzieren und die Entzündung somit zu hemmen.

Gewebeinvasivität und Ausbreitungsverhalten von S. aureus

Zudem ist auch die Gewebeinvasivität von *S. aureus* [68, 182] ein nicht zu unterschätzender Faktor für die reduzierte Wirksamkeit der Ca(OH)_2 -Beschichtung. Bei einer Keimbelastung von 1000 KBE ist davon auszugehen, dass eine nicht irrelevante Menge *S. aureus* den Knochen und das umliegende Gewebe bereits infiltriert hat, bevor die Beschichtung ihre volle Wirkung entfalten kann. Weiterhin führt der Clumping-Faktor von *S. aureus* zu einer schnellen Bindung an Fibrinogen, welches in verletztem Gewebe mit Blutung reichlich vorhanden ist [183]. Zusammen mit der Koagulase von *S. aureus* kommt es nun zu einer raschen Bildung eines Fibrin-Schutzwalls um die Bakterien. Mittels Staphylokinase kann zu einem späteren Zeitpunkt der Fibrinwall aufgelöst und eine weitere Verbreitung von *S. aureus* ermöglicht werden [68]. Je mehr Zeit seit der Implantation vergeht, desto geringer wird die Wirksamkeit von Ca(OH)_2

aufgrund der Abbauprozesse, wobei davon auszugehen ist, dass der Umbauprozess nach etwa 3 Tagen komplett abgeschlossen und die antibakterielle Wirkung nicht mehr aktiv sein dürfte. Jene Keime, die nach dieser Zeit nicht mehr von der Wirkung von Ca(OH)_2 betroffen sind, könnten sich anschließend weiter in das umliegende Gewebe und somit auch wieder in Richtung des Implantats ausbreiten. Zwar ist davon auszugehen, dass sowohl die Ca(OH)_2 -Beschichtung als auch die körpereigene Abwehr einen Teil der Keime zu eliminieren vermag. Allerdings könnte die lokal hohe Konzentration von 1000 KBE am Einbringungsort für einen kleinen Organismus, wie die in der Studie verwendeten Kaninchen, und die verwendete Implantatgröße und -oberfläche schlicht zu hoch gewesen sein.

Eingeschränkte, körpereigene Abwehrmöglichkeiten am Infektionsort

Ein weiterer limitierender Faktor könnte die reduzierte Erreichbarkeit für Abwehrzellen am Infektionsort aufgrund verringerter Durchblutung nach Osteotomie und die somit verminderte, körpereigene Abwehr sein [184]. Das Implantat selbst als Fremdkörper im Organismus könnte in gewisser Weise eine Barriere für die körpereigene Abwehr darstellen. Dies ist grundsätzlich bei allen Versuchsgruppen der Fall, jedoch dürfte dieser Effekt bei einer generellen Überforderung der Wirtsabwehr in Implantatnähe bei einer hohen Kontamination, besonders in der 1000 KBE Gruppe, das Infektionsgeschehen deutlicher beeinflussen.

Geometrische Eigenschaften des Implantats

Auch die geometrische Form der verwendeten Implantate könnte ein Grund für die reduzierte Wirkung der Beschichtung bei zunehmender Keimbelastung sein. Wie bereits erwähnt, erhöht jedes körperfremde Material die Infektionsgefahr massiv bis um den Faktor 10.000. Es wurde nachgewiesen, dass für eine Infektion beim Menschen bereits 100-300 Keime als suffizient gelten [23-25]. Unter Berücksichtigung der Größen- und Gewichtsrelation ist davon auszugehen, dass bei New Zealand White Kaninchen bereits eine geringere Anzahl an pathogenen Keimen für eine Infektion ausreicht [36].

Weiterhin wäre denkbar, dass eine gewisse Schutzfunktion bereits abgestorbener Bakterien in Implantatnähe wie eine Diffusionsbarriere wirkt (Abbildung 31).

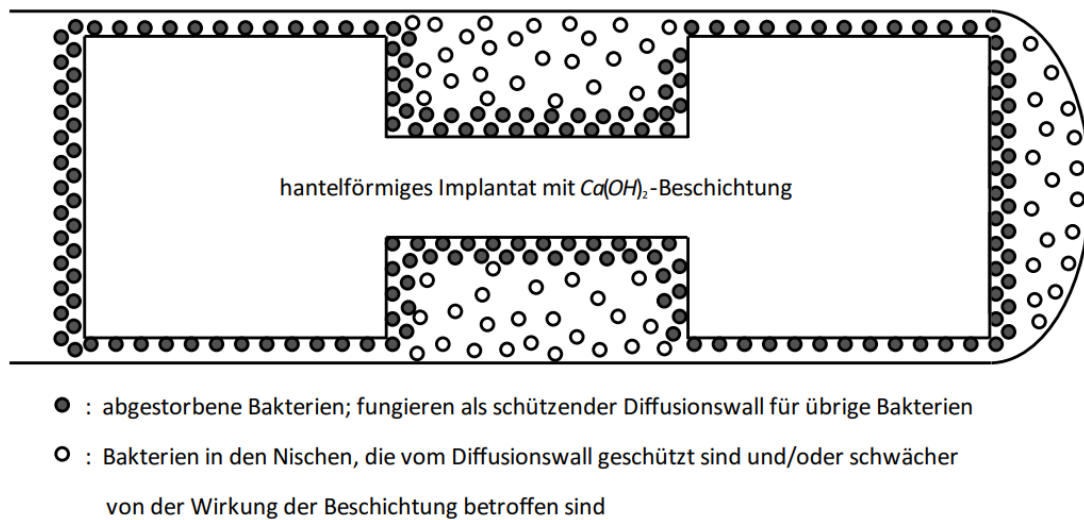


ABBILDUNG 31: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES HANTELFÖRMIGEN IMPLANTATS MIT BAKTERIELLER BESIEDELUNG

Der Innenbereich der hantelförmigen Implantate könnte sich somit trotz der aufgrund der geometrischen Form vermeintlich höheren Menge an Ca(OH)_2 -Beschichtung als Schutzniche für Bakterien erweisen, welche nach vollständigem Abbau oder Reaktion von Ca(OH)_2 den Implantatbereich reinfizieren können.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnte eine eindeutige Wirkung der Ca(OH)_2 -Beschichtung auf das Entzündungsgeschehen unter vorliegenden Bedingungen, in diesem Falle einer Keimbelastung von 0 KBE bzw. 100 KBE, bewiesen werden. Das macht Ca(OH)_2 als Implantatbeschichtung zu einem insgesamt vielversprechenden Ansatz, der der weiteren Erforschung würdig ist. Da vor allem die Anzahl der eingebrachten Keime enormen Einfluss auf die effektive Wirkung der Beschichtung zu haben schien, lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen der Untersuchung einige Ansatzpunkte für die weitere Forschung ableiten.

In der vorliegenden Untersuchung wurden zwar Synovia-Proben aus der 100 KBE Gruppe entnommen, allerdings keine Gewebeprobe. Um die Wirksamkeit der Beschichtung bei

dieser Keimbelastung auch im Gewebe zu bestätigen, macht es Sinn, die Versuche unter identischen Bedingungen zu wiederholen und die entsprechenden Gewebeproben zu entnehmen.

Im Zuge einer erneuten Versuchsdurchführung könnte zudem die eingebrachte Bakterienzahl variiert und in kleineren Abständen gestaffelt werden. Nachdem für 100 KBE eine signifikante Wirkung und für 1000 KBE keine eindeutige Wirkung nachgewiesen werden konnte, ist vor allem der Bereich zwischen diesen Werten von Interesse. So könnte eine Staffelung in 30er-, 50er- oder 100er-Schritten sinnvoll sein um einen exakteren Schwellenwert für die Wirksamkeit der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beschichtung zu ermitteln. Auf diese Weise könnte präziser vorhergesagt werden, bei welcher Höhe der Keimbelastung noch eine effektive Wirksamkeit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zu erwarten ist.

In Kombination mit einer verfeinerten Staffelung der Keimbelastung wäre auch eine Variation der Beschichtungsdicke und damit auch der Menge des eingebrachten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ denkbar. Da $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nicht leitend ist und die Menge des elektrochemisch abgeschiedenen $\text{Ca}(\text{OH})_2$ durch das verwendete Beschichtungsverfahren damit limitiert ist, stellt dies jedoch eine Herausforderung dar [14]. Um die Dicke der Beschichtung bei gleichbleibender Qualität zu erhöhen, bedarf es der Erforschung alternativer oder ergänzender Beschichtungsmethoden.

Auch eine Veränderung der geometrischen Form des Implantats, etwa einer glatteren Form mit weniger Ansatzpunkten für die bakterielle Besiedelung oder Nischenbildung, könnte dabei in Betracht gezogen werden. Um das Wirksamkeitsspektrum der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beschichtung zu erforschen, wäre auch eine In vitro Erprobung mit einer größeren Bakterienvielfalt abseits von *S. aureus* möglich.

In der aktuellen Studie wurde der NLR-Wert als zusätzlicher Marker für Entzündungsreaktionen im Gewebe herangezogen. Insbesondere für die als signifikant wirksam bestätigten 0 KBE Gewebe- und Synoviagruppen zeigten die NLR-Werte eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Signifikanztests. Bei einer erneuten

Versuchsdurchführung unter identischen Bedingungen wäre eine Nutzung des NLR-Wertes des Blutes als versuchsbegleitender Parameter zur Überwachung des Gesundheitszustandes und der Entzündungsreaktionen denkbar. In diesem Falle wären sowohl präoperative Werte als auch postoperative Werte einfach und kostengünstig erfassbar, was diesem relativ neu in der Erforschung befindlichen Ansatz noch mehr Aussagekraft verleihen könnte. Yu et al. zeigten, dass bei periprothetischen Infektionen der NLR-Wert eine höhere diagnostische Wertigkeit aufweist als der CRP-Wert [185]. Weitere Studien stützen diese Ergebnisse auch in anderen medizinischen Bereichen, speziell auch im Bereich Hüftgelenksfrakturen und kardiovaskulärer Erkrankungen [179, 180, 186-191].

Der NLR-Wert des Gewebes und der Synovia könnte in einer künftigen Studie zwar nicht versuchsbegleitend, aber zumindest während der Implantation und nach der Euthanasie erfasst werden und damit für ein aussagekräftigeres Ergebnis sorgen als ein lediglich zu einem der Zeitpunkte erfasster Wert. Sollte sich darüber hinaus zeigen, dass die NLR-Werte im Blut mit den NLR-Werten im Gewebe oder der Synovia eindeutig korrelieren, wäre dies ein weiterer Hinweis auf die Wertigkeit des Blut-NLR als postoperativer Marker, welcher routinemäßig miterfasst werden könnte.

Nicht zuletzt könnte auch eine kombinierte Anwendung von Ca(OH)_2 und anderen Implantatbeschichtungen erprobt werden um deren Vorteile zu verknüpfen.

4.4 Calciumhydroxid als aussichtsreiche Implantatbeschichtung

Mit Rückblick auf die geforderten Eigenschaften einer optimalen Beschichtung kann man feststellen, dass Ca(OH)_2 bereits viele davon aufweist. Unter dem Aspekt der Anwendungssicherheit konnten weder systemische noch lokal toxische Eigenschaften nachgewiesen werden. Bezüglich der Gewebe- und Knochenverträglichkeit konnten sogar explizit positive Wirkungen festgestellt werden. So konnten in der vorliegenden Studie bei keinem der untersuchten Präparate nekrotisch veränderte Bereiche festgestellt wurden. Da Ca(OH)_2 nach kurzer Zeit rückstandslos abgebaut und in

körpereigenes Hydroxylapatit umgewandelt wird, sind auch negative Langzeiteffekte auf das Gewebe ausgeschlossen.

In vitro zeigten sich keine negativen Effekte bzw. Zytotoxizität auf humane Osteoblasten. Die Wirkung auf planktonische Bakterien und Biofilm auf verschiedenen Oberflächen konnte anhand von *S. epidermidis* und *K. pneumoniae* nachgewiesen werden. Die Beschichtung führte für *S. epidermidis* zu einer Reduktion von etwa 50%, respektive 80% bei *K. pneumoniae* [14]. Aufgrund des simplen und unspezifischen Wirkmechanismus der Ca(OH)_2 -Beschichtung ist davon auszugehen, dass die Beschichtung grundsätzlich gegen ein sehr großes Bakterienspektrum wirksam ist. Dies wird durch die zahnärztliche Praxis bestätigt, in der Ca(OH)_2 als alleinige, temporäre, desinfizierende Wurzelkanaleinlage seit langem erfolgreich eingesetzt wird [151, 152]. Im endodontischen Biofilm befinden sich nachgewiesenermaßen über 400 unterschiedliche Keime [192], weshalb bei Ca(OH)_2 von einem sehr großen Wirkspektrum ausgegangen werden kann. Eine Anregung zur Resistenzbildung, wie es bei klassischen Antibiotika der Fall ist, ist aufgrund des sehr unspezifischen Wirkmechanismus durch starke Alkalisierung sowie Hydroxyl-Radikalbildung eher unwahrscheinlich [149, 152].

Die Effektivität der Ca(OH)_2 -Beschichtung konnte in der vorliegenden Einzelfallstudie grundsätzlich nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Recherche waren bislang keine Multicenter-Studien oder randomisierten Studien mit identischen oder ähnlichen Parametern bekannt.

Im Bereich der Anwendung und der Wirtschaftlichkeit zeigen sich weitere Stärken der Beschichtung. Da sie auf nahezu allen Implantaten und Materialien eingesetzt werden könnte, die zur dauerhaften Knocheneinheilung vorgesehen sind oder aus verschiedenen Gründen nicht mehr revidiert werden sollen, etwa Osetosyntheseplatten bei älteren Patienten, ist sie vielseitig einsetzbar. Ihre hohe Resistenz gegenüber adäquater mechanischer Belastung sowie die einfache Lagerung und Stabilität bei der Sterilisation zeigen die Zuverlässigkeit und Einfachheit von Ca(OH)_2 als Beschichtung in der Anwendung [14].

Da für die Herstellung der Ca(OH)₂-Beschichtungen weder seltene oder teure Materialien benötigt werden und auch der Herstellungsprozess einfach und gut reproduzierbar ist, kann ein konstanter Qualitätsstandard bei verhältnismäßig sehr geringen Kosten gewährleistet werden. Auch von Seiten des Gesetzgebers sind keine rechtlichen Einschränkungen oder Bedenken zu erwarten, da weder die Materialien noch Gerätschaften oder Chemikalien, die zur Herstellung benötigt werden, relevanten Beschränkungen unterliegen. Die nachfolgende Tabelle 55 verdeutlicht nochmals die zuvor ausgeführten Vorteile der Ca(OH)₂-Beschichtung.

TABELLE 55: BEWERTUNG DER CA(OH)₂-BESCHICHTUNG; FARBlich HERVORGEHOBEN SIND GÜNSTIGE UND BESTÄTIGTE EIGENSCHAFTEN (GRÜN), NOCH UNZUREICHEND (GELB) ODER NICHT ERFORSCHTE KRITERIEN (ROT)

Sicherheit	Keine systemische Toxizität	Keine lokale Toxizität	Keine negativen Effekte auf die Gewebe- und Knochenheilung	Keine unerwünschten Langzeiteffekte
Aktivität In vitro	Keine Zyto-/Gentoxizität	Wirksamkeit gegen planktonische Bakterien und Biofilm auf verschiedenen Oberflächen	Weites Bakterienspektrum wird abgedeckt	Keine Induktion von Resistenzen wie klassische Antibiotika
Effektivität	In vivo bewiesene Effektivität	Einzelfall-Studien belegen Wirkung	Multicenter Studien beweisen Wirkung	Randomisierte Studien beweisen Wirkung
Anwendung	Einfache Handhabung	Vielseitigkeit	Resistenz gegenüber temporärer Belastung z.B. Press-fit Einbringung	Einfache Lagerung
Wirtschaftlichkeit	Akzeptable Kosten	Große, einfache Verfügbarkeit	Einfache Herstellung	Unproblematisch hinsichtlich Gesetzgebung

Bezüglich der Anwendungssicherheit, der Effektivität in Einzelfallstudien, der Handhabung und der Wirtschaftlichkeit zeigt die $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beschichtung durchweg vielversprechende Vorteile. Die Effektivität in randomisierten Studien und Multicenter-Studien muss in weiterer Erforschung noch nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Periprothetische Infektionen stellen für Patient und Gesundheitssystem eine extreme Belastung sozialer, psychischer sowie finanzieller Art dar. Eine möglichst gute Implantationschirurgie vorausgesetzt, stellt die Oberflächenbeschaffenheit von Implantaten eine wesentliche Komponente für den Gesamtimplantationserfolg dar. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wird seit Jahren erfolgreich besonders in der Zahnmedizin zur Anregung der Hartschichtbildung oder aufgrund seiner guten desinfizierenden Wirkung in Wurzelkanälen eingesetzt. Die elektrochemische Beschichtung von Implantaten mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hat In vitro bereits gute Ergebnisse bezüglich der Zellverträglichkeit sowie antibakterieller Wirkung gezeigt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die bereits In vitro gewonnenen Erkenntnisse durch In vivo Versuche am Tier zu verifizieren. Für die In vivo Untersuchung wurden New Zealand White Kaninchen in drei Gruppen eingeteilt. Pro Tier wurden jeweils zwei Femurkondylen-Implantate gesetzt, wobei linksseitig die mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ beschichtete und rechtsseitig die unbeschichtete Implantatvariante gesetzt wurde. Während der Implantation wurde eine Versuchsgruppe mit 1000 KBE, eine weitere mit 100 KBE *S. aureus* um beide Implantate künstlich infiziert, um eine intraoperative Kontamination zu simulieren. Die dritte Gruppe wurde nicht künstlich kontaminiert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und Proben der Synovia und des Gewebes auf beiden Seiten entnommen. Die Synovia wurde ausgestrichen und mittels Pappenheimfärbung zur Differenzierung der Zellen gefärbt. Die Gewebestücke wurden in Formalin fixiert und nach entsprechender Lagerung in Paraffin gegossen. Die Dünnschnitte wurden mittels Hämalaun-Eosin Doppelfärbung aufbereitet. Die Zelltypen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und ausgewertet.

Die Reduktion der Entzündungsstärke bzw. das Vermögen bakterieller Abwehr der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beschichtung wurde auch anhand des prozentualen Anteils der Neutrophilen Granulozyten im Verhältnis zu den restlichen Leukozyten, insbesondere Lymphozyten, charakterisiert.

In den Gewebe- sowie Synoviaprobe n der 0 KBE Gruppe konnte für die beschichteten Implantate eine signifikante ($p \leq 0,05$) Reduktion der Neutrophilenanteile im Vergleich zu den unbeschichteten Implantaten nachgewiesen werden (Gewebe 0 KBE: $p=0,0075$; Synovia 0 KBE: $p=0,0185$). Dies spricht neben einer guten Gewebeverträglichkeit und Osseointegrationsfähigkeit auch für eine gute antiinflammatorische Wirkung durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$. In der 100 KBE Gruppe ist der Effekt zwar reduziert, jedoch immer noch signifikant nachweisbar ($p=0,035$). Hier zeigt sich zusätzlich der antibakterielle Effekt der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Beschichtung. Die 1000 KBE Gruppe zeigt in ihrer Gesamtheit keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr. Aufgrund der Gesamtmenge der inokulierten Bakterien scheint die Beschichtung nicht mehr in ausreichendem Maße in der Lage zu sein, der künstlichen Kontamination zuverlässig entgegen zu wirken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der In vitro Untersuchung durch die In vivo Versuche in den Bereichen 0-100 KBE grundsätzlich als gestützt gelten können. Die Zuverlässigkeit der Wirkung durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nimmt jedoch mit steigender KBE-Zahl ab, sodass weitere Testreihen sinnvoll sind. Durch eine Versuchswiederholung mit geringerer Keimbelastung könnte ein Schwellenwert für eine signifikant nachzuweisende Effektstärke besser eingegrenzt werden. Auch die Variation zuvor genannter Versuchsparameter könnte weiteren Aufschluss über das Anwendungsspektrum von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bringen.

Für eine Implantationschirurgie, die zukünftig einen Verzicht auf klassische Antibiotika und somit auch eine Vermeidung von Resistenzbildungen anstrebt, birgt $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als Implantatbeschichtung somit insgesamt großes Potential.

6. Literaturverzeichnis

1. Nikolopoulos, T.P., D. Dyar, S. Archbold, and G.M. O'Donoghue, *Development of spoken language grammar following cochlear implantation in prelingually deaf children*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **130**(5): p. 629-33.
2. Niparko, J.K., E.A. Tobey, D.J. Thal, L.S. Eisenberg, N.Y. Wang, A.L. Quittner, N.E. Fink, and C.D.I. Team, *Spoken language development in children following cochlear implantation*. JAMA, 2010. **303**(15): p. 1498-506.
3. Cleland, J.G., J.C. Daubert, E. Erdmann, N. Freemantle, D. Gras, L. Kappenberger, L. Tavazzi, and I. Cardiac Resynchronization-Heart Failure Study, *The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure*. N Engl J Med, 2005. **352**(15): p. 1539-49.
4. Moskowitz, R.W., *The burden of osteoarthritis: clinical and quality-of-life issues*. Am J Manag Care, 2009. **15**(8 Suppl): p. S223-9.
5. Xie, F., B. Kovic, X. Jin, X. He, M. Wang, and C. Silvestre, *Economic and Humanistic Burden of Osteoarthritis: A Systematic Review of Large Sample Studies*. Pharmacoeconomics, 2016. **34**(11): p. 1087-1100.
6. Fillion, M., D. Aubazac, M. Bessadet, M. Allegre, and E. Nicolas, *The impact of implant treatment on oral health related quality of life in a private dental practice: a prospective cohort study*. Health Qual Life Outcomes, 2013. **11**: p. 197.
7. Wolfart, S., D. Moll, R.D. Hilgers, M. Wolfart, and M. Kern, *Implant placement under existing removable dental prostheses and its effect on oral health-related quality of life*. Clin Oral Implants Res, 2013. **24**(12): p. 1354-9.
8. Kaur, P., S. Singh, A. Mathur, D.K. Makkar, V.P. Aggarwal, M. Batra, A. Sharma, and N. Goyal, *Impact of Dental Disorders and its Influence on Self Esteem Levels among Adolescents*. J Clin Diagn Res, 2017. **11**(4): p. Zc05-zc08.
9. Grecu, A.G., R. Balazsi, D. Dudea, A. Mesaroş, M. Strîmbu, and D.L. Dumitraşcu, *Oral health related quality of life and self-esteem in a general population*. Med Pharm Rep, 2019. **92**(Suppl No 3): p. S65-s72.
10. Strub, J.R.K., Matthias / Türp, Jens Christoph / Witkowski, Siegbert / Heydecke, Guido / Wolfart, Stefan, *Curriculum Prothetik I-III*. Vol. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. 2011, Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH. 1224.
11. Kurtz, S.M., E. Lau, H. Watson, J.K. Schmier, and J. Parvizi, *Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States*. J Arthroplasty, 2012. **27**(8 Suppl): p. 61-5 e1.
12. Kapadia, B.H., S. Banerjee, J.J. Cherian, K.J. Bozic, and M.A. Mont, *The Economic Impact of Periprosthetic Infections After Total Hip Arthroplasty at a Specialized Tertiary-Care Center*. J Arthroplasty, 2016. **31**(7): p. 1422-6.
13. Kapadia, B.H., M.J. McElroy, K. Issa, A.J. Johnson, K.J. Bozic, and M.A. Mont, *The economic impact of periprosthetic infections following total knee arthroplasty at a specialized tertiary-care center*. J Arthroplasty, 2014. **29**(5): p. 929-32.
14. Moseke, C., W. Braun, and A. Ewald, *Electrochemically Deposited Ca(OH)₂ Coatings as a Bactericidal and Osteointegrative Modification of Ti Implants*. Advanced Engineering Materials, 2009. **11**(3): p. B1-B6.
15. Lentino, J.R., *Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(9): p. 1157-61.

16. Dale, H., G. Hallan, G. Hallan, B. Espehaug, L.I. Havelin, and L.B. Engesaeter, *Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty*. Acta Orthop, 2009. **80**(6): p. 639-45.
17. Darouiche, R.O., *Treatment of infections associated with surgical implants*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1422-9.
18. Song, Z., L. Borgwardt, N. Høiby, H. Wu, T.S. Sørensen, and A. Borgwardt, *Prosthesis Infections after Orthopedic Joint Replacement: The Possible Role of Bacterial Biofilms*. Orthop Rev (Pavia), 2013. **5**(2).
19. Kurtz, S., K. Ong, E. Lau, F. Mowat, and M. Halpern, *Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030*. JBJS, 2007. **89**(4): p. 780-785.
20. Benito, N., M. Franco, A. Ribera, A. Soriano, D. Rodriguez-Pardo, L. Sorlí, G. Fresco, M. Fernández-Sampedro, M. Dolores Del Toro, L. Guío, E. Sánchez-Rivas, A. Bahamonde, M. Riera, J. Esteban, J.M. Baraia-Etxaburu, J. Martínez-Alvarez, A. Jover-Sáenz, C. Dueñas, A. Ramos, B. Sobrino, G. Euba, L. Morata, C. Pigrau, P. Coll, I. Mur, and J. Ariza, *Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(8): p. 732.e1-8.
21. Ventola, C.L., *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats*. P t, 2015. **40**(4): p. 277-83.
22. Zmistowski, B., J.A. Karam, J.B. Durinka, D.S. Casper, and J. Parvizi, *Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality*. J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(24): p. 2177-84.
23. Nowakowska, J., R. Landmann, and N. Khanna, *Foreign Body Infection Models to Study Host-Pathogen Response and Antimicrobial Tolerance of Bacterial Biofilm*. Antibiotics (Basel), 2014. **3**(3): p. 378-97.
24. Elek, S.D. and P.E. Conen, *The Virulence of Staphylococcus pyogenes for Man. A Study of the Problems of Wound Infection*. Br J Exp Pathol, 1957. **38**(6): p. 573-86.
25. Zimmerli, W., F.A. Waldvogel, P. Vaudaux, and U.E. Nydegger, *Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model*. J Infect Dis, 1982. **146**(4): p. 487-97.
26. Yang, Z., H. Liu, X. Xie, Z. Tan, T. Qin, and P. Kang, *The influence of diabetes mellitus on the post-operative outcome of elective primary total knee replacement: a systematic review and meta-analysis*. Bone Joint J, 2014. **96-B**(12): p. 1637-43.
27. Procter, L.D., D.L. Davenport, A.C. Bernard, and J.B. Zwischenberger, *General surgical operative duration is associated with increased risk-adjusted infectious complication rates and length of hospital stay*. J Am Coll Surg, 2010. **210**(1): p. 60-5 e1-2.
28. An, Y.H. and R.J. Friedman, *Prevention of sepsis in total joint arthroplasty*. J Hosp Infect, 1996. **33**(2): p. 93-108.
29. Humphreys, H., *Surgical site infection, ultraclean ventilated operating theatres and prosthetic joint surgery: where now?* J Hosp Infect, 2012. **81**(2): p. 71-2.
30. Gastmeier, P., A.C. Breier, and C. Brandt, *Influence of laminar airflow on prosthetic joint infections: a systematic review*. J Hosp Infect, 2012. **81**(2): p. 73-8.
31. Illingworth, K.D., W.M. Mihalko, J. Parvizi, T. Sculco, B. McArthur, Y. el Bitar, and K.J. Saleh, *How to minimize infection and thereby maximize patient outcomes in total joint arthroplasty: a multicenter approach: AAOS exhibit selection*. J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(8): p. e50.
32. Bratzler, D.W., P.M. Houck, and W. Surgical Infection Prevention Guideline Writers, *Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project*. Am J Surg, 2005. **189**(4): p. 395-404.

33. Spagnolo, A.M., G. Ottria, D. Amicizia, F. Perdelli, and M.L. Cristina, *Operating theatre quality and prevention of surgical site infections*. J Prev Med Hyg, 2013. **54**(3): p. 131-7.
34. Hickok, N.J., I.M. Shapiro, and A.F. Chen, *The Impact of Incorporating Antimicrobials into Implant Surfaces*. J Dent Res, 2018. **97**(1): p. 14-22.
35. Gristina, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
36. Tande, A.J. and R. Patel, *Prosthetic joint infection*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 302-45.
37. Sauer, K., A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, and D.G. Davies, *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol, 2002. **184**(4): p. 1140-54.
38. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **322**: p. 207-28.
39. Monroe, D., *Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms*. PLoS Biol, 2007. **5**(11): p. e307.
40. Briandet, R., J. Herry, and M. Bellon-Fontaine, *Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2001. **21**(4): p. 299-310.
41. Takahashi, H., T. Suda, Y. Tanaka, and B. Kimura, *Cellular hydrophobicity of Listeria monocytogenes involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride*. Lett Appl Microbiol, 2010. **50**(6): p. 618-25.
42. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.
43. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 165-99.
44. Reading, N.C. and V. Sperandio, *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **254**(1): p. 1-11.
45. Winzer, K. and P. Williams, *Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria*. Int J Med Microbiol, 2001. **291**(2): p. 131-43.
46. Alav, I., J.M. Sutton, and K.M. Rahman, *Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018. **73**(8): p. 2003-2020.
47. Toyofuku, M., N. Nomura, T. Fujii, N. Takaya, H. Maseda, I. Sawada, T. Nakajima, and H. Uchiyama, *Quorum sensing regulates denitrification in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. J Bacteriol, 2007. **189**(13): p. 4969-72.
48. Kolenbrander, P.E. and J. London, *Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence*. J Bacteriol, 1993. **175**(11): p. 3247-52.
49. Kolenbrander, P.E., R.N. Andersen, D.S. Blehert, P.G. Eglund, J.S. Foster, and R.J. Palmer, Jr., *Communication among oral bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(3): p. 486-505, table of contents.
50. Archer, N.K., M.J. Mazaitis, J.W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, and M.E. Shirtliff, *Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease*. Virulence, 2011. **2**(5): p. 445-59.
51. Costerton, J.W., *Introduction to biofilm*. Int J Antimicrob Agents, 1999. **11**(3-4): p. 217-21; discussion 237-9.
52. Ishida, H., Y. Ishida, Y. Kurosaka, T. Otani, K. Sato, and H. Kobayashi, *In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1641-5.
53. Shigeta, M., G. Tanaka, H. Komatsuzawa, M. Sugai, H. Suginaka, and T. Usui, *Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms: a simple method*. Chemotherapy, 1997. **43**(5): p. 340-5.

54. Stewart, P.S., *Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(11): p. 2517-22.
55. Hoyle, B.D., J. Alcantara, and J.W. Costerton, *Pseudomonas aeruginosa biofilm as a diffusion barrier to piperacillin*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(9): p. 2054-6.
56. Dunne, W.M., Jr., E.O. Mason, Jr., and S.L. Kaplan, *Diffusion of rifampin and vancomycin through a Staphylococcus epidermidis biofilm*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(12): p. 2522-6.
57. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, and H.M. Lappin-Scott, *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
58. Werner, E., F. Roe, A. Bugnicourt, M.J. Franklin, A. Heydorn, S. Molin, B. Pitts, and P.S. Stewart, *Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(10): p. 6188-96.
59. Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang, and K. Lewis, *Persister cells and tolerance to antimicrobials*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **230**(1): p. 13-8.
60. Dellas, C., *Kurzlehrbuch Pharmakologie*. Kurzlehrbuch Pharmakologie. Vol. 1. Auflage. 2014, München: Elsevier GmbH - Urban & Fischer Verlag
61. Malloy, A.M. and J.M. Campos, *Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update*. Pediatr Infect Dis J, 2011. **30**(12): p. 1092-3.
62. Matsumura, Y., M. Tanaka, M. Yamamoto, M. Nagao, K. Machida, Y. Ito, S. Takakura, K. Ogawa, A. Yoshizawa, Y. Fujimoto, S. Okamoto, S. Uemoto, and S. Ichiyama, *High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae during outbreaks in liver transplantation units*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **45**(1): p. 33-40.
63. Ibrahimagic, A., B. Bedenic, F. Kamberovic, and S. Uzunovic, *High prevalence of CTX-M-15 and first report of CTX-M-3, CTX-M-22, CTX-M-28 and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings*. J Infect Chemother, 2015. **21**(5): p. 363-9.
64. Brook, I., *The role of beta-lactamase-producing-bacteria in mixed infections*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 202.
65. Driffield, K., K. Miller, J.M. Bostock, A.J. O'Neill, and I. Chopra, *Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(5): p. 1053-6.
66. Molin, S. and T. Tolker-Nielsen, *Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(3): p. 255-61.
67. Boles, B.R. and P.K. Singh, *Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12503-8.
68. Groß, U., *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2 ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 513.
69. Holtmann, H., *Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene*. 3. Auflage ed. 2014, München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München. 149.
70. Romano, C.L., S. Scarponi, E. Gallazzi, D. Romano, and L. Drago, *Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama*, in *J Orthop Surg Res*. 2015. p. 157.
71. Long, M. and H.J. Rack, *Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective*. Biomaterials, 1998. **19**(18): p. 1621-39.

72. Raines, A.L., R. Olivares-Navarrete, M. Wieland, D.L. Cochran, Z. Schwartz, and B.D. Boyan, *Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy*. *Biomaterials*, 2010. **31**(18): p. 4909-17.
73. Niinomi, M., *Mechanical properties of biomedical titanium alloys*. *Materials Science and Engineering: A*, 1998. **243**(1-2): p. 231-236.
74. Gallo, J., M. Holinka, and C.S. Moucha, *Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(8): p. 13849-80.
75. Curti, P.S., M.R. De Moura, E. Radovanovic, A.F. Rubira, E.C. Muniz, and R.A. Moliterno, *Surface modification of polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(N-isopropylacrylamide)*. *J Mater Sci Mater Med*, 2002. **13**(12): p. 1175-80.
76. Follmann, H.D., A.F. Martins, A.P. Gerola, T.A. Burgo, C.V. Nakamura, A.F. Rubira, and E.C. Muniz, *Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(11): p. 3711-22.
77. Rodrigues, L., I.M. Banat, J. Teixeira, and R. Oliveira, *Biosurfactants: potential applications in medicine*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(4): p. 609-18.
78. Rivardo, F., R.J. Turner, G. Allegrone, H. Ceri, and M.G. Martinotti, *Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009. **83**(3): p. 541-53.
79. Shida, T., H. Koseki, I. Yoda, H. Horiuchi, H. Sakoda, and M. Osaki, *Adherence ability of Staphylococcus epidermidis on prosthetic biomaterials: an in vitro study*. *Int J Nanomedicine*, 2013. **8**: p. 3955-61.
80. Singh, A.V., V. Vyas, R. Patil, V. Sharma, P.E. Scopelliti, G. Bongiorno, A. Podesta, C. Lenardi, W.N. Gade, and P. Milani, *Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25029.
81. De Bruyn, H., V. Christiaens, R. Doornewaard, M. Jacobsson, J. Cosyn, W. Jacquet, and S. Vervaeke, *Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss*. *Periodontol 2000*, 2017. **73**(1): p. 218-227.
82. Bixler, G.D. and B. Bhushan, *Bioinspired rice leaf and butterfly wing surface structures combining shark skin and lotus effects*. *Soft Matter*, 2012. **8**(44): p. 11271-11284.
83. Drelich, J. and E. Chibowski, *Superhydrophilic and superwetting surfaces: definition and mechanisms of control*. *Langmuir*, 2010. **26**(24): p. 18621-3.
84. Koch, K., B. Bhushan, Y.C. Jung, and W. Barthlott, *Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion*. *Soft Matter*, 2009. **5**(7): p. 1386-1393.
85. Zheng, Y., H. Bai, Z. Huang, X. Tian, F.Q. Nie, Y. Zhao, J. Zhai, and L. Jiang, *Directional water collection on wetted spider silk*. *Nature*, 2010. **463**(7281): p. 640-3.
86. Privett, B.J., J. Youn, S.A. Hong, J. Lee, J. Han, J.H. Shin, and M.H. Schoenfish, *Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces*. *Langmuir*, 2011. **27**(15): p. 9597-601.
87. Moazzam, P., A. Razmjou, M. Golabi, D. Shokri, and A. Landarani-Isfahani, *Investigating the BSA protein adsorption and bacterial adhesion of Al-alloy surfaces after creating a hierarchical (micro/nano) superhydrophobic structure*. *J Biomed Mater Res A*, 2016. **104**(9): p. 2220-33.
88. Song, W., D.D. Veiga, C.A. Custódio, and J.F. Mano, *Bioinspired Degradable Substrates with Extreme Wettability Properties*. *Advanced Materials*, 2009. **21**(18): p. 1830-1834.
89. Sousa, C., D. Rodrigues, R. Oliveira, W. Song, J.F. Mano, and J. Azeredo, *Superhydrophobic poly(L-lactic acid) surface as potential bacterial colonization substrate*. *AMB Express*, 2011. **1**: p. 34.

90. Hu, C., S. Liu, B. Li, H. Yang, C. Fan, and W. Cui, *Micro-/nanometer rough structure of a superhydrophobic biodegradable coating by electrospraying for initial anti-bioadhesion*. *Adv Healthc Mater*, 2013. **2**(10): p. 1314-21.
91. Boswald, M., S. Lugauer, A. Regenfus, G.G. Braun, P. Martus, C. Geis, J. Scharf, T. Bechert, J. Greil, and J.P. Guggenbichler, *Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter*. *Infection*, 1999. **27 Suppl 1**: p. S56-60.
92. Saint, S., D.L. Veenstra, S.D. Sullivan, C. Chenoweth, and A.M. Fendrick, *The potential clinical and economic benefits of silver alloy urinary catheters in preventing urinary tract infection*. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(17): p. 2670-5.
93. Parikh, D.V., T. Fink, K. Rajasekharan, N.D. Sachinvala, A.P.S. Sawhney, T.A. Calamari, and A.D. Parikh, *Antimicrobial Silver/Sodium Carboxymethyl Cotton Dressings for Burn Wounds*. *Textile Research Journal*, 2005. **75**(2): p. 134-138.
94. Monteiro, D.R., L.F. Gorup, A.S. Takamiya, A.C. Ruvollo-Filho, E.R. de Camargo, and D.B. Barbosa, *The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver*. *Int J Antimicrob Agents*, 2009. **34**(2): p. 103-10.
95. Ewald, A., S.K. Gluckermann, R. Thull, and U. Gbureck, *Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium*. *Biomed Eng Online*, 2006. **5**: p. 22.
96. Gao, A., R. Hang, X. Huang, L. Zhao, X. Zhang, L. Wang, B. Tang, S. Ma, and P.K. Chu, *The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts*. *Biomaterials*, 2014. **35**(13): p. 4223-35.
97. Ueno, M., H. Miyamoto, M. Tsukamoto, S. Eto, I. Noda, T. Shobuike, T. Kobatake, M. Sonohata, and M. Mawatari, *Silver-Containing Hydroxyapatite Coating Reduces Biofilm Formation by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus In Vitro and In Vivo*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 8070597.
98. Yonekura, Y., H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Ando, I. Noda, M. Mawatari, and T. Hotokebuchi, *Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia*. *J Bone Joint Surg Br*, 2011. **93**(5): p. 644-9.
99. Yue, C., R. Kuijjer, H.J. Kaper, H.C. van der Mei, and H.J. Busscher, *Simultaneous interaction of bacteria and tissue cells with photocatalytically activated, anodized titanium surfaces*. *Biomaterials*, 2014. **35**(9): p. 2580-7.
100. Uboldi, C., P. Urban, D. Gilliland, E. Bajak, E. Valsami-Jones, J. Ponti, and F. Rossi, *Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts*. *Toxicol In Vitro*, 2016. **31**: p. 137-45.
101. Tsou, H.K., M.H. Chi, Y.W. Hung, C.J. Chung, and J.L. He, *In Vivo Osseointegration Performance of Titanium Dioxide Coating Modified Polyetheretherketone Using Arc Ion Plating for Spinal Implant Application*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 328943.
102. Haenle, M., A. Fritsche, C. Zietz, R. Bader, F. Heidenau, W. Mittelmeier, and H. Gollwitzer, *An extended spectrum bactericidal titanium dioxide (TiO₂) coating for metallic implants: in vitro effectiveness against MRSA and mechanical properties*. *J Mater Sci Mater Med*, 2011. **22**(2): p. 381-7.
103. Chai, H., L. Guo, X. Wang, Y. Fu, J. Guan, L. Tan, L. Ren, and K. Yang, *Antibacterial effect of 317L stainless steel contained copper in prevention of implant-related infection in vitro and in vivo*. *J Mater Sci Mater Med*, 2011. **22**(11): p. 2525-35.
104. Huo, K., X. Zhang, H. Wang, L. Zhao, X. Liu, and P.K. Chu, *Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays*. *Biomaterials*, 2013. **34**(13): p. 3467-78.

105. Elizabeth, E., G. Baranwal, A.G. Krishnan, D. Menon, and M. Nair, *ZnO nanoparticle incorporated nanostructured metallic titanium for increased mesenchymal stem cell response and antibacterial activity*. *Nanotechnology*, 2014. **25**(11): p. 115101.
106. Hans, M., A. Erbe, S. Mathews, Y. Chen, M. Solioz, and F. Mucklich, *Role of copper oxides in contact killing of bacteria*. *Langmuir*, 2013. **29**(52): p. 16160-6.
107. Hu, H., W. Zhang, Y. Qiao, X. Jiang, X. Liu, and C. Ding, *Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium*. *Acta Biomater*, 2012. **8**(2): p. 904-15.
108. Holinka, J., M. Pilz, B. Kubista, E. Presterl, and R. Windhager, *Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth*. *Bone Joint J*, 2013. **95-b**(5): p. 678-82.
109. Liu, W., N.H. Golshan, X. Deng, D.J. Hickey, K. Zeimer, H. Li, and T.J. Webster, *Selenium nanoparticles incorporated into titania nanotubes inhibit bacterial growth and macrophage proliferation*. *Nanoscale*, 2016. **8**(34): p. 15783-94.
110. Perla, V. and T.J. Webster, *Better osteoblast adhesion on nanoparticulate selenium- A promising orthopedic implant material*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. **75**(2): p. 356-64.
111. Sidhwa, F. and K.M. Itani, *Skin preparation before surgery: options and evidence*. *Surg Infect (Larchmt)*, 2015. **16**(1): p. 14-23.
112. Vermeulen, H., S.J. Westerbos, and D.T. Ubbink, *Benefit and harm of iodine in wound care: a systematic review*. *J Hosp Infect*, 2010. **76**(3): p. 191-9.
113. Tsuchiya, H., T. Shirai, H. Nishida, H. Murakami, T. Kabata, N. Yamamoto, K. Watanabe, and J. Nakase, *Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine*. *J Orthop Sci*, 2012. **17**(5): p. 595-604.
114. Shirai, T., H. Tsuchiya, H. Nishida, N. Yamamoto, K. Watanabe, J. Nakase, R. Terauchi, Y. Arai, H. Fujiwara, and T. Kubo, *Antimicrobial megaprotheses supported with iodine*. *J Biomater Appl*, 2014. **29**(4): p. 617-23.
115. Kabata, T., T. Maeda, Y. Kajino, K. Hasegawa, D. Inoue, T. Yamamoto, T. Takagi, T. Ohmori, and H. Tsuchiya, *Iodine-Supported Hip Implants: Short Term Clinical Results*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 368124.
116. Hickok, N.J. and I.M. Shapiro, *Immobilized antibiotics to prevent orthopedic implant infections*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(12): p. 1165-76.
117. Adams, C.S., V. Antoci, Jr., G. Harrison, P. Patal, T.A. Freeman, I.M. Shapiro, J. Parvizi, N.J. Hickok, S. Radin, and P. Ducheyne, *Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis*. *J Orthop Res*, 2009. **27**(6): p. 701-9.
118. Antoci, V., Jr., C.S. Adams, N.J. Hickok, I.M. Shapiro, and J. Parvizi, *Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection: preliminary study*. *Clin Orthop Relat Res*, 2007. **461**: p. 88-95.
119. Zhang, L., J. Yan, Z. Yin, C. Tang, Y. Guo, D. Li, B. Wei, Y. Xu, Q. Gu, and L. Wang, *Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 3027-36.
120. Varisco, M., N. Khanna, P.S. Brunetto, and K.M. Fromm, *New antimicrobial and biocompatible implant coating with synergic silver-vancomycin conjugate action*. *ChemMedChem*, 2014. **9**(6): p. 1221-30.
121. Jose, B., V. Antoci, Jr., A.R. Zeiger, E. Wickstrom, and N.J. Hickok, *Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills Staphylococcus aureus*. *Chem Biol*, 2005. **12**(9): p. 1041-8.
122. Chennell, P., E. Feschet-Chassot, T. Devers, K.O. Awitor, S. Descamps, and V. Sautou, *In vitro evaluation of TiO₂ nanotubes as cefuroxime carriers on orthopaedic implants for the prevention of periprosthetic joint infections*. *Int J Pharm*, 2013. **455**(1-2): p. 298-305.

123. Popat, K.C., M. Eltgroth, T.J. Latempa, C.A. Grimes, and T.A. Desai, *Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes*. *Biomaterials*, 2007. **28**(32): p. 4880-8.
124. Rabea, E.I., M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(6): p. 1457-65.
125. Martins, A.F., S.P. Facchi, H.D. Follmann, A.G. Pereira, A.F. Rubira, and E.C. Muniz, *Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: a review*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(11): p. 20800-32.
126. Seong, H.S., H.S. Whang, and S.W. Ko, *Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chito-oligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000. **76**(14): p. 2009-2015.
127. Kim, Y.H., C.W. Nam, J.W. Choi, and J. Jang, *Durable antimicrobial treatment of cotton fabrics using N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride and polycarboxylic acids*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003. **88**(6): p. 1567-1572.
128. Tan, H., R. Ma, C. Lin, Z. Liu, and T. Tang, *Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(1): p. 1854-69.
129. Chen, F., Y. Gao, X. Chen, Z. Yu, and X. Li, *Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(9): p. 17477.
130. Brackman, G., P. Cos, L. Maes, H.J. Nelis, and T. Coenye, *Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(6): p. 2655-61.
131. Rutherford, S.T. and B.L. Bassler, *Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012. **2**(11).
132. Grandclement, C., M. Tannieres, S. Morera, Y. Dessaux, and D. Faure, *Quorum quenching: role in nature and applied developments*. *FEMS Microbiol Rev*, 2016. **40**(1): p. 86-116.
133. Chan, K.G., Y.C. Liu, and C.Y. Chang, *Inhibiting N-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching Pseudomonas quinolone quorum sensing to attenuate virulence*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 1173.
134. Rice, S.A., D. McDougald, N. Kumar, and S. Kjelleberg, *The use of quorum-sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm-associated infections*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005. **6**(2): p. 178-84.
135. Ren, D., J.J. Sims, and T.K. Wood, *Inhibition of biofilm formation and swarming of Escherichia coli by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone*. *Environ Microbiol*, 2001. **3**(11): p. 731-6.
136. Sharafutdinov, I.S., E.Y. Trizna, D.R. Baidamshina, M.N. Ryzhikova, R.R. Sibgatullina, A.M. Khabibrakhmanova, L.Z. Latypova, A.R. Kurbangalieva, E.V. Rozhina, M. Klinger-Strobel, R.F. Fakhrullin, M.W. Pletz, M.I. Bogachev, A.R. Kayumov, and O. Makarewicz, *Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2(5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and -Susceptible Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 2246.
137. Thallinger, B., E.N. Prasetyo, G.S. Nyanhongo, and G.M. Guebitz, *Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms*. *Biotechnol J*, 2013. **8**(1): p. 97-109.
138. Eby, D.M., H.R. Luckarift, and G.R. Johnson, *Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical instruments*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2009. **1**(7): p. 1553-60.

139. Li, B., B. Jiang, M.J. Dietz, E.S. Smith, N.B. Clovis, and K.M. Krishna Rao, *Evaluation of local MCP-1 and IL-12 nanocoatings for infection prevention in open fractures()*. J Orthop Res, 2010. **28**(1).
140. Li, B. and A.L. McKeague, *Emerging Ideas: Interleukin-12 Nanocoatings Prevent Open Fracture-associated Infections*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(11): p. 3262-5.
141. Boyce, B.M., B.A. Lindsey, N.B. Clovis, S. Smith, G.R. Hobbs, D.F. Hubbard, S.E. Emery, J.B. Barnett, and B. Li, *Additive Effects of Exogenous IL-12 Supplementation and Antibiotic Treatment in Infection Prophylaxis()*. J Orthop Res, 2012. **30**(2): p. 196-202.
142. Karlsson, H.L., P. Cronholm, J. Gustafsson, and L. Moller, *Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(9): p. 1726-32.
143. Kawashita, M., M. Nakao, M. Minoda, H.M. Kim, T. Beppu, T. Miyamoto, T. Kokubo, and T. Nakamura, *Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid*. Biomaterials, 2003. **24**(14): p. 2477-84.
144. Lin, X., K. de Groot, D. Wang, Q. Hu, D. Wismeijer, and Y. Liu, *A review paper on biomimetic calcium phosphate coatings*. Open Biomed Eng J, 2015. **9**: p. 56-64.
145. Peter Gängler, T.H., Brita Willershausen, Norbert Schwenzer, Michael Ehrenfeld, *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie 3. unveränderte Auflage*. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart - New York. p. 233-235.
146. Halliwell, B., *Oxidants and human disease: some new concepts*. Faseb j, 1987. **1**(5): p. 358-64.
147. Siqueira, J.F., Jr. and H.P. Lopes, *Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review*. Int Endod J, 1999. **32**(5): p. 361-9.
148. Joachim Rassow, K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie 3. Auflage*. 2012, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 64-69.
149. Imlay, J.A. and S. Linn, *DNA damage and oxygen radical toxicity*. Science, 1988. **240**(4857): p. 1302-9.
150. Kinirons, M.J., V. Srinivasan, R.R. Welbury, and D. Finucane, *A study in two centres of variations in the time of apical barrier detection and barrier position in nonvital immature permanent incisors*. Int J Paediatr Dent, 2001. **11**(6): p. 447-51.
151. Mohammadi, Z. and P.M. Dummer, *Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology*. Int Endod J, 2011. **44**(8): p. 697-730.
152. Peter Gängler, T.H., Brita Willershausen, Norbert Schwenzer, Michael Ehrenfeld, *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie 3. unveränderte Auflage*. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart - New York. p. 94-96.
153. Yu, Z., P. Gauthier, Q.T. Tran, I. El-Ayachi, F.U. Bhatti, R. Bahabri, M. Al-Habib, and G.T. Huang, *Differential Properties of Human ALP+ Periodontal Ligament Stem Cells vs Their ALP- Counterparts*. J Stem Cell Res Ther, 2015. **5**(7).
154. Hessle, L., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane*. 2002. **99**(14): p. 9445-9.
155. Shohat, M., D.L. Rimoin, H.E. Gruber, and R.S. Lachman, *Perinatal lethal hypophosphatasia; clinical, radiologic and morphologic findings*. Pediatr Radiol, 1991. **21**(6): p. 421-7.
156. Liu, C., W. Wang, W. Shen, T. Chen, L. Hu, and Z. Chen, *Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite*. J Endod, 1997. **23**(8): p. 490-3.
157. Lawton, D.M., M.D. Lamaletie, and D.L. Gardner, *Biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: response of chondrocytes in a test system using low temperature scanning electron microscopy*. J Dent, 1989. **17**(1): p. 21-7.

158. Wilke, A., J. Orth, M. Lomb, R. Fuhrmann, H. Kienapfel, P. Griss, and R.P. Franke, *Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures*. J Biomed Mater Res, 1998. **40**(2): p. 301-6.
159. de Bruijn, J.D., Y.P. Bovell, and C.A. van Blitterswijk, *Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone*. Biomaterials, 1994. **15**(7): p. 543-50.
160. Chen, C.C., T.H. Huang, C.T. Kao, and S.J. Ding, *Electrochemical study of the in vitro degradation of plasma-sprayed hydroxyapatite/bioactive glass composite coatings after heat treatment*. Electrochimica Acta, 2004. **50**(4): p. 1023-1029.
161. Ellies, L.G., D.G. Nelson, and J.D. Featherstone, *Crystallographic changes in calcium phosphates during plasma-spraying*. Biomaterials, 1992. **13**(5): p. 313-6.
162. Wen, J., Y. Leng, J. Chen, and C. Zhang, *Chemical gradient in plasma-sprayed HA coatings*. Biomaterials, 2000. **21**(13): p. 1339-1343.
163. Bienengraber, V., T. Gerber, T. Trykova, G. Kundt, and K.O. Henkel, *Eine innovativ im Sol-Gel-Prozeß hergestellte, hochporöse Siliziumoxidkeramik zum Knochenersatz – In-vivo Langzeitergebnisse*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2004. **35**(4): p. 234-239.
164. Meredith, A.L., J.L. Prebble, and D.J. Shaw, *Impact of diet on incisor growth and attrition and the development of dental disease in pet rabbits*. J Small Anim Pract, 2015. **56**(6): p. 377-82.
165. Prebble, J.L., F.M. Langford, D.J. Shaw, and A.L. Meredith, *The effect of four different feeding regimes on rabbit behaviour*. Applied Animal Behaviour Science. **169**: p. 86-92.
166. Sinclair, M.D., *A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice*. Can Vet J, 2003. **44**(11): p. 885-97.
167. Khan, M., A. Tunio, A. Ahmad, K. A. B, M. Malhi, A. Khan, M. Qasim, A. Said, R.-U. Khan, and M. Khan, *Comparative study of isoflurane and ketamine anesthetics in Rabbits*. 2019. **8**: p. 1385-1397.
168. Davies, N.M. and N.M. Skjodt, *Clinical pharmacokinetics of meloxicam. A cyclooxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(2): p. 115-26.
169. Gates, B.J., T.T. Nguyen, S.M. Setter, and N.M. Davies, *Meloxicam: a reappraisal of pharmacokinetics, efficacy and safety*. Expert Opin Pharmacother, 2005. **6**(12): p. 2117-40.
170. Dr. Cynis, H., *Gewichtsreduktion im Versuch und dessen Bedeutung für das Wohlbefinden von Versuchstieren*, in *10. Fortbildungsveranstaltung der GV-SOLAS für Tierschutzbeauftragte und Behördenmitglieder 2017*: 12277 Berlin. p. 50-65.
171. Baumgartner, C., M. Bollerhey, J. Ebner, L. Laacke-Singer, T. Schuster, and W. Erhardt, *Effects of ketamine-xylazine intravenous bolus injection on cardiovascular function in rabbits*. Can J Vet Res, 2010. **74**(3): p. 200-8.
172. Ambrisko, T.D. and Y. Hikasa, *Neurohormonal and metabolic effects of medetomidine compared with xylazine in beagle dogs*. Can J Vet Res, 2002. **66**(1): p. 42-9.
173. Rothenberg, A.C., A.E. Wilson, J.P. Hayes, M.J. O'Malley, and B.A. Klatt, *Sonication of Arthroplasty Implants Improves Accuracy of Periprosthetic Joint Infection Cultures*. Clin Orthop Relat Res, 2017.
174. Trampuz, A., K.E. Piper, M.J. Jacobson, A.D. Hanssen, K.K. Unni, D.R. Osmon, J.N. Mandrekar, F.R. Cockerill, J.M. Steckelberg, J.F. Greenleaf, and R. Patel, *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection*. N Engl J Med, 2007. **357**(7): p. 654-63.
175. Maria Mulisch, U.W., *Romeis - Mikroskopische Technik*. Vol. 18. 2010: Springer Science & Business Media.

176. Bortz, J. and C. Schuster, *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 2010, Berlin: Springer-Verlag. 655.
177. Prof. Dr. Jürgen Bortz, P.D.C.S., *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7. Aufl. ed. 2010, Berlin: SpringerMedizin Springer-Verlag GmbH. 655.
178. Lakens, D., *Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs*. *Front Psychol*, 2013. **4**: p. 863.
179. Wasko, M.K., M. Struminski, K. Bobecka-Wesolowska, and J. Kowalczewski, *Neutrophil-to-lymphocyte ratio shows faster changing kinetics than C-reactive protein after total hip and knee arthroplasty*. *J Orthop Translat*, 2017. **10**: p. 36-41.
180. Yombi, J.C., P.E. Schwab, and E. Thienpont, *Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) distribution shows a better kinetic pattern than C-reactive protein distribution for the follow-up of early inflammation after total knee arthroplasty*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016. **24**(10): p. 3287-3292.
181. Schröder, U., *Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation*. *J Dent Res*, 1985. **64 Spec No**: p. 541-8.
182. Stelzner, K., A.C. Winkler, C. Liang, A. Boyny, C.P. Ade, T. Dandekar, M.J. Fraunholz, and T. Rudel, *Intracellular Staphylococcus aureus Perturbs the Host Cell Ca(2+) Homeostasis To Promote Cell Death*. *mBio*, 2020. **11**(6).
183. Fries, D., M. Bachler, and M. Hermann, *Fibrinogen (FI)*, in *Transfusionsassoziierte Pharmakotherapie*, G. Singbartl and K. Singbartl, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 171-184.
184. Kunze, K.G., H. Hofstetter, I. Posalaky, and B. Winkler, *Veränderungen der Knochendurchblutung nach Osteotomien und Osteosynthesen*. *Unfallchirurgie*, 1981. **7**(3): p. 169-180.
185. Yu, B.Z., J. Fu, W. Chai, L.B. Hao, and J.Y. Chen, *Neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor for diagnosis of early Periprosthetic joint infection*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020. **21**(1): p. 706.
186. Bath, J., J.B. Smith, R.L. Kruse, and T.R. Vogel, *Neutrophil-lymphocyte ratio predicts disease severity and outcome after lower extremity procedures*. *J Vasc Surg*, 2019.
187. Bolat, D., Y.K. Topcu, O. Aydogdu, S. Minareci, and C. Dincel, *Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a predictor of early penile prosthesis implant infection*. *Int Urol Nephrol*, 2017. **49**(6): p. 947-953.
188. Canbolat, N., M.I. Buget, N. Sivrikoz, D. Altun, and S. Kucukay, *[The relationship between neutrophil to lymphocyte ratio and postoperative pain in total knee and hip arthroplasty]*. *Rev Bras Anestesiol*, 2019. **69**(1): p. 42-47.
189. de Jager, C.P., P.T. van Wijk, R.B. Mathoera, J. de Jongh-Leuvenink, T. van der Poll, and P.C. Wever, *Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit*. *Crit Care*, 2010. **14**(5): p. R192.
190. Delcea, C., C.A. Buzea, and G.A. Dan, *The neutrophil to lymphocyte ratio in heart failure: a comprehensive review*. *Rom J Intern Med*, 2019. **57**(4): p. 296-314.
191. Forget, P., N. Moreau, H. Engel, O. Cornu, B. Boland, M. De Kock, and J.C. Yombi, *The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) after surgery for hip fracture (HF)*. *Arch Gerontol Geriatr*, 2015. **60**(2): p. 366-71.
192. Jhajharia, K., A. Parolia, K.V. Shetty, and L.K. Mehta, *Biofilm in endodontics: A review*. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2015. **5**(1): p. 1-12.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	Ammoniumdihydrogenphosphat
AB	Antibiotikum / Antibiotika
Ca / Ca^{2+}	Calcium / Calciumion
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Zitronensäure
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Calciumhydroxid
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Calciumhydroxylapatit
CaP	Calciumphosphat
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Calciumnitrat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
COX	Cyclooxygenase
DNA / DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EPS	Exopolysaccharide
EZM	Extrazellulärmatrix
H.E. Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HP	Heparin
OH^-	Hydroxyl / Hydroxylion
HA	Hydroxylapatit
IL	Interleukin
K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
KBE	Koloniebildende Einheit
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Relation

NSAR / NSAID	nichtsteroidales Antirheumatikum / non-steroidal anti-inflammatory drug
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
QS	Quorum Sensing
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
TMC	Trimethyl Chitosan
WCA	Water Contact Angle
XRD	X-Ray Defraction / Röntgenbeugung

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der fünf Stadien der Biofilmbildung nach D. Davis [39]	5
Abbildung 2: Einsatzmöglichkeiten von Oberflächenmodifikationen an verschiedenen Stellen eines Implantats [74].....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Implantats, Beschichtungsoberfläche ca. 42mm ²	28
Abbildung 4: Röntgenaufnahme nach Euthanasie zur Verdeutlichung der Implantatposition ..	29
Abbildung 5: Kniegelenk eines Versuchstieres nach Euthanasie und vor Gelenkeröffnung	32
Abbildung 6: Kniegelenk nach Eröffnung der oberflächlichen Naht	33
Abbildung 7: vollständig eröffnetes Kniegelenk, bereit zur Probenentnahme	33
Abbildung 8: Thermo Scientific Microm STP 120	35
Abbildung 9: Aufblock-Gerät Leica EG1150 H	36
Abbildung 10: Aufgeblocktes und beschriftetes Präparat	37
Abbildung 11: Beispiel für einen Gewebeschnitt nach H.E.-Färbung	44
Abbildung 12: Beispiel für ein Synoviapräparat nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung	47
Abbildung 13: Objektträgerkästen mit Gewebe- und Synoviapräparaten	47
Abbildung 14: Beispiel für einen Gewebe-Präparatschnitt unter dem Mikroskop.....	51
Abbildung 15: Synovia-Ausstrich unter dem Mikroskop.....	54
Abbildung 16: Prozentuale Anteile neutrophiler Granulozyten (Gewebe; 0 KBE).....	59
Abbildung 17: Netzdiagramm (Gewebe; 0 KBE).....	60
Abbildung 18: Boxplot (Gewebe; 0 KBE)	60
Abbildung 19: Prozentuale Anteile neutrophiler Granulozyten (Gewebe; 1000 KBE).....	62
Abbildung 20: Netzdiagramm (Gewebe; 1000 KBE).....	63
Abbildung 21: Boxplot (Gewebe; 1000 KBE)	63
Abbildung 22: Prozentuale Anteile neutrophiler Granulozyten (Synovia; 0 KBE).....	66
Abbildung 23: Netzdiagramm (Synovia; 0 KBE).....	66
Abbildung 24: Boxplot (Synovia; 0 KBE)	67
Abbildung 25: Prozentuale Anteile neutrophiler Granulozyten (Synovia; 0 KBE).....	68
Abbildung 26: Boxplot (Synovia; 100 KBE)	69
Abbildung 27: Prozentuale Anteile neutrophiler Granulozyten (Synovia; 1000 KBE)	70
Abbildung 28: Netzdiagramm (Synovia; 1000 KBE)	71
Abbildung 29: Boxplot (Synovia; 1000 KBE)	71
Abbildung 30: Originalformel von Cohen; sowie erweiterte Formel mit gepoolter Standardabweichung [177, 178]	75
Abbildung 31: Schematische Darstellung des hantelförmigen Implantats mit bakterieller Besiedelung	99

III Abbildungsnachweise

Abbildung 1

Bildlink mit Lizenz:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2071939/figure/pbio-0050307-g001/>

Creative Commons Attribution License; Image Credit: D. Davis

Aufgerufen am 05.05.2021

Keine Änderungen vorgenommen.

Abbildung 2

Bildlink mit Lizenz:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159828/figure/ijms-15-13849-f002/>

Creative Commons Attribution License 3.0; Image Credit: Gallo, Holinka, Moucha

Aufgerufen am 05.05.2021

Keine Änderungen vorgenommen.

Alle weiteren Abbildungen sind selbsterstellte Fotografien oder Schemazeichnungen, die während der Laborphase entstanden sind.

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anforderungen an eine 'optimale' antibakterielle Implantatbeschichtung nach Romano [70].....	12
Tabelle 2: Einteilung der Versuchstiere	27
Tabelle 3: Kriterien zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere in Anlehnung an Dr. Cynis [170]	30
Tabelle 4: Verwendetes Standardeinbettschema zur Paraffineinbettung	36
Tabelle 5: Anzahl der Präparatschnitte (Gruppe 19.05.15; 100 KBE; 3 Tiere)	39
Tabelle 6: Anzahl der Präparatschnitte (Gruppe 07.07.15; 1000 KBE; 3 Tiere)	39
Tabelle 7: Anzahl der Präparatschnitte (Gruppe 21.07.15; 1000 KBE; 2 Tiere)	39
Tabelle 8: Anzahl der Präparatschnitte (Gruppe 13.04.16; 0 KBE; 4 Tiere)	40
Tabelle 9: Anzahl der Präparatschnitte (Gruppe 21.04.16; 0 KBE; 4 Tiere)	41
Tabelle 10: Anzahl der Synovia-Ausstrichpräparate (Gruppe 19.05.15; 100 KBE; 3 Tiere).....	45
Tabelle 11: Anzahl der Synovia-Ausstrichpräparate (Gruppe 07.07.15; 1000 KBE; 3 Tiere).....	45
Tabelle 12: Anzahl der Synovia-Ausstrichpräparate (Gruppe 21.07.15; 1000 KBE; 2 Tiere).....	45
Tabelle 13: Anzahl der Synovia-Ausstrichpräparate (Gruppe 13.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	46
Tabelle 14: Anzahl der Synovia-Ausstrichpräparate (Gruppe 21.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	46
Tabelle 15: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Gewebepreparat (Gruppe 07.07.15; 1000 KBE; 3 Tiere).....	52
Tabelle 16: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Gewebepreparat (Gruppe 21.07.15; 1000 KBE; 2 Tiere).....	52
Tabelle 17: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Gewebepreparat (Gruppe 13.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	53
Tabelle 18: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Gewebepreparat (Gruppe 21.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	53
Tabelle 19: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Synoviapreparat (Gruppe 19.05.15; 1000 KBE; 3 Tiere).....	54
Tabelle 20: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Synoviapreparat (Gruppe 07.07.15; 1000 KBE; 3 Tiere).....	55
Tabelle 21: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Synoviapreparat (Gruppe 21.07.15; 1000 KBE; 2 Tiere).....	55
Tabelle 22: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Synoviapreparat (Gruppe 13.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	56
Tabelle 23: Absolute Häufigkeit der jeweiligen Zelltypen im untersuchten Synoviapreparat (Gruppe 21.04.16; 0 KBE; 4 Tiere).....	56
Tabelle 24: Relative Häufigkeit der erfassten Zelltypen im Überblick (Gewebeproben).....	57
Tabelle 25: Relative Häufigkeit der erfassten Zelltypen im Überblick (Synoviaprobe).....	64
Tabelle 26: Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov (Excel)	72
Tabelle 27: Deskriptive Analyse (Gewebe; 0 KBE).....	73
Tabelle 28: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest, Gewebe; 0 KBE; Excel)	74
Tabelle 29: T-Test bei gepaarten Stichproben (Gewebe; 0 KBE; SPSS).....	74
Tabelle 30: Effektgrößenmaß Cohens d (Gewebe; 0 KBE)	75
Tabelle 31: Interpretation von d nach Cohen [177]	76
Tabelle 32: NLR-Werte (Gewebe; 0 KBE)	76

Tabelle 33: Deskriptive Analyse (Synovia; 0 KBE)	77
Tabelle 34: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest; Synovia; 0 KBE; Excel)	78
Tabelle 35: Test bei gepaarten Stichproben (Synovia; 0 KBE; SPSS)	78
Tabelle 36: Effektgrößenmaß Cohens d (Synovia; 0 KBE)	79
Tabelle 37: NLR-Werte (Synovia; 0 KBE)	80
Tabelle 38: Deskriptive Analyse (Synovia; 100 KBE)	81
Tabelle 39: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest; Synovia; 100 KBE; Excel)	82
Tabelle 40: T-Test bei gepaarten Stichproben (Synovia; 100 KBE; SPSS)	82
Tabelle 41: Effektgrößenmaß Cohens d (Synovia; 100 KBE)	83
Tabelle 42: NLR-Werte (Synovia; 100 KBE)	83
Tabelle 43: Deskriptive Analyse (Gewebe; 1000 KBE)	84
Tabelle 44: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest; Gewebe; 1000 KBE; Excel)	85
Tabelle 45: t-Test bei gepaarten Stichproben (Gewebe; 1000 KBE; SPSS)	85
Tabelle 46: Effektgrößenmaß Cohens d (Gewebe; 1000 KBE)	86
Tabelle 47: NLR-Werte (Gewebe; 1000 KBE)	86
Tabelle 48: Deskriptive Analyse (Synovia; 1000 KBE)	87
Tabelle 49: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest; Synovia; 1000 KBE; Excel)	88
Tabelle 50: Effektgrößenmaß Cohens d (Synovia; 1000 KBE)	88
Tabelle 51: NLR-Werte (Synovia; 1000 KBE)	89
Tabelle 52: Ergebnisse des t-Tests (bestandene Tests sind grün hervorgehoben).....	90
Tabelle 53: Prozentuale Mittelwerte der Neutrophilen-Anzahl	90
Tabelle 54: Absolute und prozentuale Anzahl der NLR-Werte [NLR(li) < NLR(re)]	91
Tabelle 55: Bewertung der Ca(OH) ₂ -Beschichtung; farblich hervorgehoben sind günstige und bestätigte Eigenschaften (grün), noch unzureichend (gelb) oder nicht erforschte Kriterien (rot)	103

V Materialanhang

a) Gerätschaften, verwendet In vitro (Vorversuche) und In vivo (Studie)

- Aufblock-Gerät(Leica EG1150 H)
- Deckgläser, quadratisch / rechteckig (DK15, DK18; DK20 Hartenstein)
- Deckgläser, rund (DKR0; DKR1; DKR2; Hartenstein)
- Einmal-Pasteurpipetten, unsteril (PP04, PP05; Hartenstein)
- Färbeeinsatz aus Edelstahl (FR2; Hartenstein)
- Färbekasten S (FK09; Hartenstein)
- Färbesystem, Glas, Färbekasten (FK01; Hartenstein)
- Färbesystem, Glas, Färberahmen (FR1; Hartenstein)
- Gewebeeinbettautomat (Thermo Scientific Microm STP 120)
- Gilson Mikroliterpipetten, Pipetman G (P100G-M; P200G-M; P1000G-M; Hartenstein)
- Härteprüfer (Zwick, Ulm, Deutschland)
- Käfige Typs EC2 (Scanbur, Dänemark)
- Knochenmühle (Ultra-Turrax T25 basic, IKA-Werke, Deutschland)
- Kontrolleinheit Micro-Control ITL09 (Zwick, Ulm, Deutschland)
- Messzylinder, hohe Form (MZ03; MZ04; MZ05; MZ06; Hartenstein)
- Mikroskop (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH Wetzlar Type 301-371.011, Wetzlar, Deutschland) mit angeschlossener Kamera (Olympus Camedia C-4040 ZOOM)
- Mikroskop mit integrierter Kamera (VWR Typ VisiScope IT404 – Software Leica Application Suite Version 3.0.0 BUild 629)
- Objektträger Superfrost (OSM; Hartenstein)
- Pinsel
- Pipettenspitzen lose, für Mikroliterpipetten (PSBI/PSGI; Hartenstein)
- Potentiostat / Galvanostat HP96 (Bank Elektronik, Pohlheim, Deutschland)
- Rasierklingen
- Rotationsmikrotom CUT4060 (Weinkauff Medizin und Umwelttechnik, Hallerndorf Deutschland)

- Scanning Electron Mikroskop (SEM) DSM 940 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Siemens D5005 X-Ray /Röntgen Diffraktometer (Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland)

b) Chemikalien und andere Materialien

- Atipamezol (Atipam; Dechra Pharmaceuticals PLC)
- DMEM – Dulbecco’s Modified Eagle Medium (Invitrogen Life Technologies)
- Einschlussmittel Roti-Histokit (Carl Roth GmbH + Co KG)
- Eosin-G-Lösung 0,5% (Carl Roth GmbH + Co KG)
- Ethanol >99,8% (Carl Roth GmbH + Co KG)
- FCS – Fetal Calf Serum (Invitrogen Life Technologies)
- Fentanyl (Fentanyl Hexal Injektionslösung; Hexal AG)
- Flumazenil (Flumazenil Hexal Injektionslösung; Hexal AG)
- Formaldehyd (ROTI®Histofix 4 % Carl Roth GmbH + Co KG)
- Giemsa-Stammlösung (Carl Roth GmbH + Co KG)
- Isofluran (CP Pharma)
- Ketamin (Anesketin; Dechra Pharmaceuticals PLC)
- Mayers-Hämalaunlösung (Merck KGaA)
- May-Grünwald-Lösung (Carl Roth GmbH + Co KG)
- Medetomidin (Sedator; Dechra Pharmaceuticals PLC)
- Meloxicam (Metacam; Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH)
- Midazolam (Midazolam Injection, USP CIV; Akorn Inc.)
- Naloxon (Naloxon Injektionslösung; B. Braun Melsungen AG)New Zealand White Rabbit (Charles River Laboratories – Frankreich (Chatillon-sur-Chalaronne, Ecully, Lyon, Saint-Germain-sur-l’Arbresle))
- Octenisept-Lösung (Schülke & Mayr GmbH)
- Pentobarbital / Euthadorm (CP Pharma)
- Plexx – Fruity Bites (Plexx B.V.)
- Roti®-Histokitt (Carl Roth GmbH + Co. KG)
- SBF – Simulated Body Fluid (Invitrogen Life Technologies)

- Seralon (Serag Wiessner GmbH & Co. KG)
- Ssniff K-H (Ssniff Spezialdiäten GmbH)Sprühpflaster (Hansaplast)
- Xylazin (Nerfasin; Dechra Pharmaceuticals PLC)
- Xylol $\geq 99\%$ (Carl Roth GmbH + Co KG)

c) Programme/Digitaler Anhang

- Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.8
- IBM SPSS Statistics 25
- ImageJ – Cell Counter, Version 1.50f3 / Januar 2016
- Leica Application Suite LAS EZ Version 3.0.0 Build 629
- Microsoft Excel-Tool (bereitgestellt durch FMZ Institut Würzburg)
- Microsoft Office 365

VI Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Frau Stephanie

Danke, dass du mich immer bedingungslos unterstützt hast.

VII Lebenslauf