

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Rainer H. Meffert

**Biotechnologisch modifizierte Silikonimplantate in der Chirurgie - in vivo
Untersuchungen zur Biokompatibilität einer
Polydimethylsiloxan-Tetraethoxysilan-Halofuginon-Hybridoberfläche**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Martin Cornelius Jordan
aus Berlin

Würzburg, August 2013

Referent: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2013

Der Promovend ist Arzt.

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Abw.	Standardabweichung
abs. Alk.	absoluter Alkohol
aq. dest.	destilliertes Wasser
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
ERKs	Extracellulärsignal Regulated Kinases
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
ggf.	gegebenenfalls
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Halofuginon
JNKs	c-Jun N-terminal Kinases
KWM	Kontaktwinkelmessung
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
Min.	Minuten
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MRT	Magnetresonanztomographie
MTC	Masson-Trichromfärbung
MW	Mittelwert
Nr.	Nummer
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TEOS	Tetraethoxysilan
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Kapselfibrose und Kapselkontraktur	1
1.2	Prävalenz der Kapselkontraktur	2
1.3	Ätiologie der Kapselkontraktur	3
1.3.1	Biokompatibilität	3
1.4	Implantatoberflächen	4
1.5	Beeinflussung der Kapselfibrose	5
1.6	Zytokine in der Kapselfibrose: Die Rolle von TGF-beta	6
1.6.1	Die TGF-beta-Rezeptoren zur Weiterleitung des fibrotischen Signals	7
1.6.2	Smad-Proteine und die intrazelluläre Signalkaskade von TGF-beta	7
1.6.3	Non-Smad-Signalweg in der Fibrose	8
1.7	Smad3 in der Fibrose	8
1.8	Halofuginon	9
1.8.1	Halofuginon in der Fibrose	9
1.8.2	Wirkung von Halofuginon auf beteiligte Zytokine und Enzyme	9
1.9	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Implantate	14
2.2	Beschichtungsprozess mit Halofuginon	14
2.3	Versuchstiere	15
2.4	Implantation	16
2.5	Explantation	16
2.5.1	Anfertigen der Kryoschnitte	18
2.5.2	Anfertigen der Paraffinschnitte	18
2.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	19
2.5.4	Die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung	20
2.5.5	Untersuchung der Übersichtsfärbungen	21
2.5.6	Immunzytologie und Immunhistologie	22
2.5.7	Auswertung der Immunhistologie	27
2.6	Pufferherstellung	27
2.7	Durchführung der qRT-PCR	27
2.7.1	RNA-Isolation und RT-PCR	29

2.8	Kontaktwinkelmessung der Implantatoberflächen	30
2.9	Drug-eluting -Studie der halofuginonbeschichteten Oberfläche	31
2.10	Statistik	31
2.11	Versuchsplanung	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Histologische Auswertung	33
3.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Auswertung	33
3.1.2	Masson-Trichrom-Auswertung	34
3.2	Auswertung der Immunhistologie	36
3.2.1	Auswertung der CD68-Immunzytologie	36
3.2.2	Auswertung der TGF-beta-Immunzytologie	38
	38
3.2.3	Auswertung der Fibroblasten-Immunzytologie	39
3.2.4	Auswertung der Kollagen-Typ-I-Immunhistologie	40
3.2.5	Auswertung der Kollagen-Typ-III-Immunhistologie sowie der CD4- und CD8-Immunzytologie	41
3.2.6	Ergebniszusammenfassung der Immunhistologie	42
3.3	Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchung	43
3.3.1	Auswertung der Real-Time-PCR	43
3.3.2	Ergebnisse der verwendeten Primer	43
3.4	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung	47
3.5	Ergebnisse der Drug-eluting -Studie	48
4	Diskussion	49
4.1	Pathologie der Kapsel­fibrose	49
4.1.1	Kapsel­fibrose durch Ablagerung extrazellulärer Matrix	50
4.1.2	Fibroblasten in der Kapsel­fibrose	50
4.1.3	Makrophagen in der Kapsel­fibrose	51
4.1.4	Die Rolle von TGF-beta	51
4.1.5	CTGF in der Kapsel­fibrose	52
4.1.6	Matrix-Metalloproteinasen in der Kapsel­fibrose	52
4.2	Halofuginon freisetzende Silikonoberfläche und der Einfluss auf die Kapsel­fibrose	53
4.2.1	Wirkung von Halofuginon auf Kollagen	53
4.2.2	Wirkung von Halofuginon auf Fibroblasten	54

4.2.3 Wirkung von Halofuginon auf Makrophagen.....	54
4.2.4 Halofuginon und TGF-beta	55
4.2.5 Lokale MMP-2-Inhibierung.....	56
4.3 Bisherige Beeinflussung der Kapsel­fibrose im Kontext mit der vorliegenden Studie.....	58
4.4 Schlussfolgerung	61
Zusammenfassung:.....	62
Literaturverzeichnis:	64

1 Einleitung

1.1 Kapselfibrose und Kapselkontraktur

Alloplastische Silikonimplantate, welche beispielsweise als Gewebeersatz zur Rekonstruktion der weiblichen Brust nach Ablatio mammae verwendet werden, können trotz ihrer allgemein guten Verträglichkeit Komplikationen verursachen. Die Kapselfibrose und die klinisch relevante Kapselkontraktur ziehen am häufigsten eine operative Revision nach sich [1, 2]. Die Entstehung einer solchen Kapselfibrose, die zu einer Abgrenzung des Silikonimplantates zum umliegenden Gewebe führt, stellt im Grunde genommen eine physiologische Reaktion dar [3]. Die fibröse Kapsel bildet dabei eine Barriere zwischen der Implantatoberfläche und dem umliegenden Gewebe und setzt sich aus Kollagenfasern, Entzündungszellen, Fibroblasten und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) zusammen [4-6]. Diese Abkapselung ist charakteristisch für alloplastische Materialien und verläuft im Regelfall subklinisch, so dass in den meisten Fällen eine dauerhafte Integration in den Organismus möglich ist. Kommt es aber zur verstärkten Anreicherung von Entzündungszellen und EZM in der Kapsel sowie zur Kontraktur des periprothetischen Gewebes, dann tritt eine Kapselkontraktur auf [7], die mit im Verlauf und Ausprägung variablen Missempfindungen, Schmerzen, Verhärtungen und sichtbaren Deformierungen einhergeht.

Für die Klassifikation der klinisch manifesten Kapselkontraktur wird der vierstufige „Baker-Score“ verwendet (s. Tabelle). [8].

Grad	Befund
I	Inspektion und Palpation unauffällig
II	leichte Induration des periprothetischen Gewebes, das Implantat ist tast-, aber nicht sichtbar
III	stärkere Induration des periprothetischen Gewebes, das Implantat ist tast- und sichtbar
IV	deutliche Induration und Deformierung des Gewebes

Tabelle 1.1 Klassifikation nach Baker für die klinische Einteilung der Kapselkontraktur (1975) [9].

Die Ursachen, die zur Entstehung einer Kapselbildung und in der Folge zur Ausbildung einer revisionsbedürftigen Kapselkontraktur führen, sind bis heute nicht eindeutig und vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die bei der Implantation des alloplastischen Materials auftretende Traumatisierung des Gewebes eine Blut-Material-Interaktion initiiert, welche eine Entzündungsreaktion durch unspezifische Proteinanlagerung, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Bildung einer transitorischen Entzündungsmatrix [3, 10] auslöst. Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten steuern über Zytokine (z. B. TGF-beta, CTGF, TNF- α) und Fibroblasten den weiteren Prozess der Einkapselung [11-14].

Obwohl Silikonimplantate seit Jahrzehnten in Gebrauch sind, ist es bisher nicht gelungen, die übermäßige Ausbildung einer periprothetischen Kapsel zu verhindern [1, 15].

1.2 Prävalenz der Kapselkontraktur

Zur Beurteilung der Prävalenz müssen folgende Parameter berücksichtigt werden:

- Implantatgeneration
- Anzahl der Patienten
- Nachuntersuchungszeitraum (Follow-up)
- Implantattyp (glatt, texturiert, beschichtet etc.)
- Implantatlage (subglandulär, submuskulär, subfaszial)
- Baker-Stadium

Die Bandbreite der Kapselkontrakturrate umfasst in verschiedenen Studien einen Bereich zwischen 4 und 44 % bei einem Baker-Stadium III oder IV [7, 16-20]. Henriksen et al. veröffentlichten eine repräsentative prospektive Studie mit einer Kapselkontrakturrate von 4,3 % (Baker III und IV) bei 2277 beobachteten Patienten im Verlauf von 19,5 Monaten [21]. Dass die Kapselkontraktur vermehrt im direkten Anschluss an die Implantation auftritt, bestätigten McGrath und Burkhardt [22]. Sie dokumentierten, dass 84 % der Kapselkontrakturen im ersten Jahr vorkommen und die Inzidenz dann anschließend stark abfällt [22]. Neben dem ersten Auftrittsschwerpunkt im Zeitraum nach der Operation erhöht sich das Risiko erst wieder im späteren Verlauf mit zunehmender Implantationsdauer [16].

1.3 Ätiologie der Kapselkontraktur

Obwohl die Kapselkontraktur als Komplikation seit der Einführung der Silikonimplantate bekannt ist, wird über die Ätiologie weiterhin kontrovers diskutiert [15, 23]. Neben klinischen und subklinischen Infektionen wurden Hämatome, Serome und die Operationsdauer in Zusammenhang mit der Kapselkontraktur gebracht [16, 23-25]. In den großen Verlaufsstudien zeigte sich ein protektiver Effekt bei texturierten und polyurethanbeschichteten Implantate im *frühen* Verlauf der Kapselkontraktur [17, 20, 26]. Bei diesen Implantatoberflächen kam es zu deutlich weniger Kapselkontrakturen [17, 27]. Diese Ergebnisse begründen die Vermutung, dass die Oberflächen der Implantate einen entscheidenden Einfluss auf die Kapselentstehung haben [28, 29], da sie in engem Kontakt mit dem periprothetischen Gewebe stehen und eine Fremdkörperreaktion und Bindegewebsablagerung induzieren [3, 30]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Oberflächenbeschaffenheit entscheidend für die Biokompatibilität ist und dass durch Modifikationen der Oberfläche die Verträglichkeit beeinflusst werden kann [31].

1.3.1 Biokompatibilität

Die Biokompatibilität beschreibt die Wechselwirkung zwischen Implantat und Organismus und kann dabei wie folgt klassifiziert werden [32]:

Inkompatibel: Das Material führt zu Allergien, ausgeprägten Fremdkörperreaktionen, Entzündungen bis hin zur Nekrose.

Biokompatibel: Hier werden Teile des Materials in nicht toxischen Konzentrationen an die Umgebung abgegeben. In der Regel kommt es zu einer schwachen Fremdkörperreaktion mit anschließender Abkapselung.

Bioinert: Der Werkstoff setzt keine toxischen Substanzen frei. Die Materialien haben praktisch keinen Effekt auf den Organismus.

Bioaktiv: Es kommt zur Interaktion mit dem umliegenden Gewebe. Das Material induziert aktiv eine Integration.

1.4 Implantatoberflächen

Für den Gewebeersatz in der Brustchirurgie haben sich Implantate mit einer Hülle aus einem kautschukartigen Silikonelastomer und einem Füllstoff aus kohäsivem Silikongel etabliert [14]. Die Grundstruktur des Silikons bildet dabei eine Silizium-Sauerstoff-Verbindung, welche durch eine organische Seitengruppe ergänzt wird.

Ausgangspunkt der Herstellung von Silikon ist die Produktion verschiedener Methylchlorosilane durch die „Müller-Rochow-Synthese“, welche seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt ist. Eines dieser Methylchloridsilane, das Dimethyldichlorsilan, bildet durch seine Weiterverarbeitung das bekannte Polydimethylsiloxan (PDMS). Das synthetische Polymer PDMS besteht aus sich wiederholenden $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ -Einheiten und ist die Basis für diverse Medizinprodukte [34].

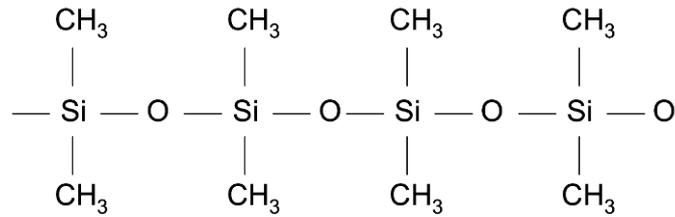


Abb. 1.1 Strukturformel von Polydimethylsiloxan (PDMS). Silikon ist ein synthetischer Polymer mit einer Grundstruktur aus sich wiederholenden Si-O-Gruppen. Über kovalente Bindungen werden sie mit organischen Gruppen vernetzt (z. B. Methyl-, Hydroxy- oder Vinylgruppen). PDMS besteht aus sich wiederholenden $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ -Einheiten und wird zur Herstellung von Implantaten verwendet.

Silikone haben eine hohe thermische Stabilität und eine relativ gute Beständigkeit gegenüber hydrolytischem sowie enzymatischem Abbau [32]. Damit sind sie grundsätzlich als Biomaterial zum langfristigen Gewebeersatz geeignet.

Eine Nachteil von Silikon ist dessen hydrophobe Beschaffenheit, welche die Anlagerung von Entzündungszellen und die Ablagerung von EZM an der Grenze zwischen Implantat und Gewebe fördert [35, 36].

Die limitierte Biokompatibilität in Bezug auf die Kapselbildung und Kapselkontraktur konnte bisher weder durch chemische Veränderung der Hülle noch des Füllstoffs signifikant verbessert werden [23].

1.5 Beeinflussung der Kapselbildung.

Um eine übermäßige Fremdkörperreaktion zu vermeiden, gilt es, die Entzündungsreaktion und die Ablagerung von Bestandteilen der EZM nach Implantation eines Silikonimplantates zu vermindern.

Daraus ergeben sich zwei Ansätze:

1. lokale Maßnahmen, d. h. Modifikation der Silikonoberfläche durch Beschichtung mit/ohne Freisetzung antifibrotischer Substanzen
2. systemische Maßnahmen, d. h. systemische Applikation antifibrotisch wirksamer Substanzen

Die Beschichtung herkömmlicher Silikonimplantate mit Polyurethan oder mit einem antifibrotischen Wirkstoff (TGF-beta1-Antikörper) konnten einen solchen lokalen Effekt erzielen [17, 37, 38].

Als systemische Maßnahme wird eine Verabreichung von Medikamenten (Pirfenidone, Zafirlukast, Enalapril) mit einer Verminderung der Kapselfibrose im Tierexperiment beschrieben [39-41]. Die Untersuchungen ergaben eine verminderte Ablagerung extrazellulärer Matrix und eine reduzierte Inflammation im Tierversuch. Dennoch führten die bisherigen Versuche zu keiner klinisch relevanten Innovation bzw. Komplikationen verhinderten den sicheren Einsatz von neuen Implantaten beim Menschen [42].

1.6 Zytokine in der Kapselfibrose: Die Rolle von TGF-beta.

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass transforming growth factor beta (TGF-beta) im Pathomechanismus der fremdkörperinduzierten Fibrose eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, obgleich alle hierbei involvierten Zusammenhänge noch nicht vollständig bekannt sind [12] [43-45]. Bei TGF-beta handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, welches bei Prozessen der Entzündung, Proliferation, Wundheilung und Fibrose eine zentrale Rolle spielt. Die TGF-Superfamilie besteht aus zahlreichen strukturähnlichen Proteinen (2005, ca. 30) mit jeweils spezifischen Funktionen. Bei TGF-beta werden die drei Isoformen TGF-beta1, TGF-beta2 und TGF-beta3 unterschieden, wobei alle im Zusammenhang mit der Wundheilung und fibrotischen Prozessen [12] stehen. TGF-beta1 und TGF-beta2 sind im periprothetischen Kapselgewebe bei der Kapselfibrose vermehrt nachweisbar [13, 46, 47]. Beide sind Mediatoren der Kapselfibrose, wobei die Bedeutung von TGF-beta1 wesentlicher als die von TGF-beta2 [3, 45] zu sein scheint. In der Kapselfibrose induzieren beide Zytokine die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, die Einwanderung von Fibroblasten und die Produktion von Bestandteilen der EZM [12].

Die Signalkaskade des TGF-beta umfasst verschiedene Rezeptoren und „second messenger“. Zuerst bindet der TGF-beta-Ligand an die transmembranen Rezeptoren (Serin/Threonin-Kinasen) der Zelloberfläche. Danach aktivieren diese Rezeptoren verschiedene Smad-Proteine. Smad-Proteine sind die für die Fibrose entscheidenden second messenger und beeinflussen die Transkription verschiedener Gene, z. B. die von Kollagen [43, 48].

1.6.1 Die TGF-beta-Rezeptoren zur Weiterleitung des fibrotischen Signals

Es können drei verschiedene Rezeptortypen für TGF-beta unterschieden werden. Der TGF-beta-Ligand bindet dabei zunächst an den TGF-beta-Rezeptor-Typ-II (TGFβRII). Dies ist eine transmembrane Serin/Threonin-Kinase und hat ihre Bindungsstelle an der Zelloberfläche. Der TGFβRII phosphoryliert anschließend einen TGF-beta-Rezeptor-Typ-I (TGFβRI). Der Komplex aus TGF-beta-Rezeptor I und II ermöglicht anschließend die transmembrane Signalweiterleitung durch Phosphorylierung der second messenger. Der dritte Rezeptor, der TGF-beta-Typ-III-Rezeptor (Betaglycan), unterstützt die Bindung des TGF-beta-Liganden an den TGF-beta-Typ-II-Rezeptor [49].

1.6.2 Smad-Proteine und die intrazelluläre Signalkaskade von TGF-beta

Smad-Proteine übermitteln das Signal vom TGF-beta-Ligand-Rezeptor-Komplex an der Zelloberfläche durch das Zytoplasma in den Zellkern und beeinflussen somit direkt die Transkription.

Es gibt 3 Smad-Protein-Gruppen:

die rezeptorregulierten Smad Proteine (R-Smads), von denen es fünf verschiedene gibt, das common mediator Smad-Protein (Co-Smad), von dem es nur einen Vertreter gibt, und die inhibitorischen bzw. antagonistischen Smad-Proteine (I-Smad) mit zwei bekannten Formen.

Smad-Gruppe	Nummer
rezeptorreguliertes Smad (R-Smad)	1,2,3,5,8
common mediator Smad (Co-Smad)	4
inhibitorisches Smad (I-Smad)	6,7

Tabelle 1.2 Smad-Proteine übermitteln als second messenger Signale vom TGF-beta-Rezeptor durch das Zytoplasma in den Zellkern. Es werden drei Gruppen unterschieden. Die erste ist die rezeptorregulierende Gruppe (R-Smad). Die zweite Gruppe wird common mediator Smad genannt. Die dritte Gruppe beinhaltet die inhibitorischen Smad-Proteine (I-Smad).

R-Smad-Proteine werden zum aktivierten Rezeptor gelotst und dort phosphoryliert. Für TGF-beta werden Smad2 und Smad3 aktiviert. Zwei R-Smads verbinden sich im phosphorylierten Zustand mit einem Co-Smad, dem Smad4. Der daraus resultierende heteromere Smad2/3/4-Komplex, bestehend aus zwei R-Smads und dem Co-Smad, wird nun durch Nukleoporine in den Zellkern geschleust. Dort interagieren die Smads mit weiteren Transkriptionsfaktoren und steuern so die Transkription der Zielgene [50].

I-Smads verhindern die Bindung von R-Smads an die TGF-beta-Rezeptoren und induzieren deren Abbau. Smad7 ist das I-Smad im TGF-beta-Signalweg und hemmt somit die Signaltransduktion [51]. Die I-Smads werden ebenfalls durch TGF-beta aktiviert und fungieren als negative Rückkopplung, wodurch die Stärke und Dauer der TGF-beta-Wirkung limitiert werden kann.

Die Transkription wird nicht alleine durch den Smad-Komplex, sondern auch durch Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren und Corepressoren reguliert [52].

1.6.3 Non-Smad-Signalweg in der Fibrose

TGF-beta-Zytokine wirken nicht nur über die Smad-Signalkette. TGF-beta1 aktiviert auch den Mitogen-activated-protein-kinase(MAPK)-Signalweg, welcher die ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase 1/2), die JNK (c-Jun N-terminal kinase) und das p38 umfasst. Diese können sich mit dem Smad-Weg überschneiden oder auch unabhängig davon ablaufen [53]. Zellen unterschiedlicher Gewebe nutzen verschiedene Signalwege, um die erforderlichen Gene zu aktivieren. Fibroblasten nutzen sowohl den Smad- als auch den p38-Signalweg für die Transkription von Kollagen-Typ-I, jedoch nicht den Ras/ERK/MEK-Weg [54, 55]. Fibroblasten sind durch die Produktion der EZM von grundlegender Bedeutung in der Fibrose und durch ihre Aktivierung über TGF-beta1/Smad von übergeordneter Bedeutung [47].

1.7 Smad3 in der Fibrose

Smad3 ist der für die Fibrose entscheidende second messenger im TGF-beta1-Signalweg [48]. Besonders die Steuerung extrazellulärer Matrixproteine scheint ein Smad3-abhängiger Prozess zu sein. Verrecchia et al. belegten, dass die Expression

der Kollagene (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL6A1 und COL6A3) durch TGF-beta1/Smad3 induziert wird [56]. Die Untersuchung an Smad3 $-/-$ Knockout-Mäusen zeigte, dass die Anwesenheit von Smad3 Voraussetzung für die Entstehung einer Fibrose ist [57].

1.8 Halofuginon

Halofuginon (DL-trans-7-Brom-6-chlor-(3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl)-4(3H)-chinazolinon) ist ein Analogon des Stoffes Febrifugin und wurde aus der Wurzel des Hortensiengewächses *Dichroa febrifuga* isoliert. Halofuginon findet als Kokzidiostatika in der Geflügeltierhaltung Anwendung. Durch die Behandlung mit Halofuginon wurde bei den Tieren eine verminderte Hautfestigkeit und eine vermehrte kutane Rissbildung beobachtet [58, 59]. Untersuchungen an Hühner-, Mäuse- und Human-Fibroblasten bestätigten, dass Halofuginon die vom TGF-beta-Signalweg abhängige Kollagen-Typ-I-Synthese durch Blockade der α 1-Genexpression inhibiert [60, 61].

1.8.1 Halofuginon in der Fibrose

Der wichtigste antifibrotische Effekt von HF beruht auf der Hemmung der Kollagen-Typ-I-Synthese [60]. So kann HF bei lokaler Anwendung die kutane Fibrose der Haut z. B. bei Sklerodermie [62] sowie bei systemischer Anwendung abdominelle Adhäsionen sowie Strikturen nach Verbrennungen erfolgreich vermindern [63-67]. Tierexperimentelle Studien zur antifibrotischen Anwendung von HF bei der Leber-, Muskel- und Lungenfibrose zeigten bei systemischer Applikation ebenfalls Wirkung [68-70]. Darüber hinaus hat HF antiangiogenetische Eigenschaften [71].

1.8.2 Wirkung von Halofuginon auf beteiligte Zytokine und Enzyme

Der beschriebene antifibrotische Effekt von HF beruht auf einer Interaktion mit dem TGF-beta-Signalweg [70, 72], wobei HF initial eine Verminderung der TGF-beta-Typ-II-Rezeptoren initiiert [72], wodurch weniger Rezeptoren für die transmembrane Signalvermittlung zur Verfügung stehen. In der Folge inhibiert Halofuginon die

Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 [69, 72-74], wodurch es zu keiner Komplexbildung aus R- und Co-Smad kommt, die zur Induktion der Genexpression notwendig ist. Außerdem induziert HF die Expression des inhibitorischen Smad7 [72, 74], wobei Smad7 die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 unterbindet. Als Folge kommt es zu einer spezifischen Inhibition der Expression von Kollagen-Typ-I [60], dem Hauptbestandteil der fibrösen Kapsel.

Halofuginon hemmt die Expression der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), des connective tissue growth factor (CTGF) und des basic fibroblast growth factor (bFGF), was in Kombination mit der Hemmung einiger Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) den antifibrotischen Effekt zusätzlich unterstützt [71, 75, 76].

MMP-2 und MMP-9 sind durch Degradation von Kollagenfasern, insbesondere von Kollagen-Typ-IV in der Basalmembran, an der Regulierung der extrazellulären Matrix beteiligt. So ermöglichen sie die Angiogenese durch Gefäßaussprossung und somit die Versorgung des neu entstandenen Gewebes bei einer Fibrose [76-78].

CTGF führt zu Fibroblastenproliferation, Chemotaxis, Kollagenproduktion und Angiogenese [79, 80]. Er wird TGF-beta-abhängig aktiviert und ist in der Wundheilung und Fibrose vermehrt nachweisbar [81, 82].

bFGF ist von Bedeutung bei der Wundheilung und Angiogenese, da er die Fibroblasten- und Endothelzellproliferation stimuliert [83, 84]. Dabei ist bFGF in der Basalmembran und den Endothelzellen vorzufinden und ist z. B. während der Wundheilung erhöht [85]. Halofuginon ist in der Lage, die Neovaskularisation und Zellproliferation durch Inhibierung von bFGF zu unterdrücken [71].

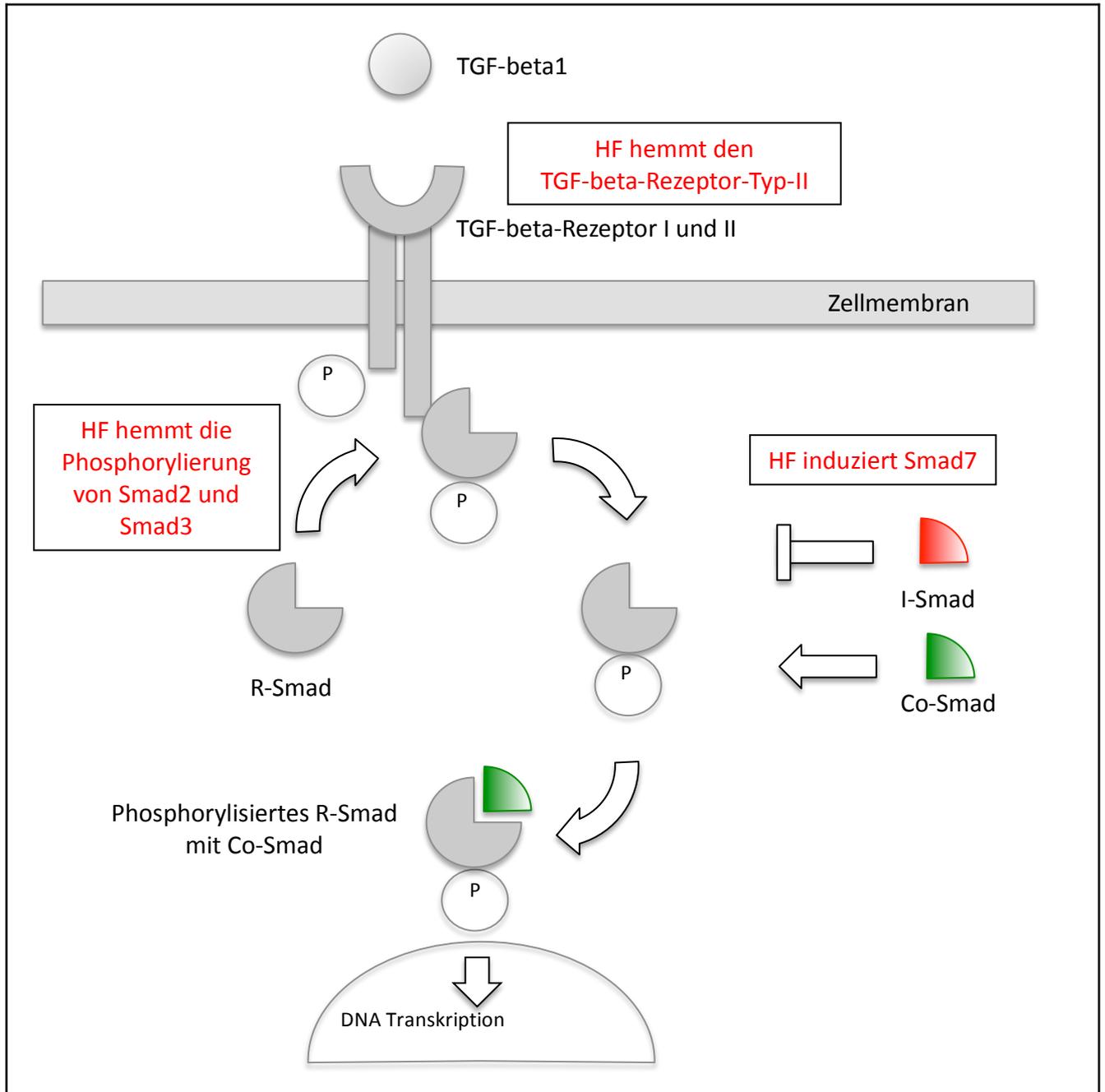


Abb. 1.2 Schematisch vereinfachte Darstellung des TGF-beta/Smad-Signalwegs und der Wirkung von Halofuginon (HF) auf die Signalkaskade. HF hemmt den TGF-beta-Rezeptor an der Oberfläche der Zelle. Diese Rezeptor-Kinase ist der erste Schritt der intrazellulären Signaltransduktion. HF hemmt auch die direkte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3. Zusätzlich induziert HF das Inhibitor-Smad7. Dieses hemmt die Aktivierung der R-Smads.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Silikon gehört heute zu den am intensivsten untersuchten Materialien in der Medizintechnik. Dennoch treten weiterhin Komplikationen auf, die ihre Ursache in den physikalischen und chemischen Eigenschaften haben.

Aus diesem Grunde beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage nach einer Optimierbarkeit herkömmlicher Silikonimplantate, wobei es das Ziel der In-vivo-Studie sein soll, die übermäßige Fibrosierung des periprothetischen Gewebes durch eine Oberflächenbeschichtung der Implantate mit der antifibrotisch wirksamen Substanz Halofuginon zu vermindern.

Arbeitshypothesen:

Halofuginon freisetzende Silikonoberflächen haben keinen Einfluss auf die Entstehung einer Kapselbildung und Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe (H_0).

Das gebundene Halofuginon auf der Silikonoberfläche vermindert die Kapselbildung und Entzündungsreaktion um die behandelten Implantate und führt so zu einer Steigerung der Biokompatibilität (H_1).

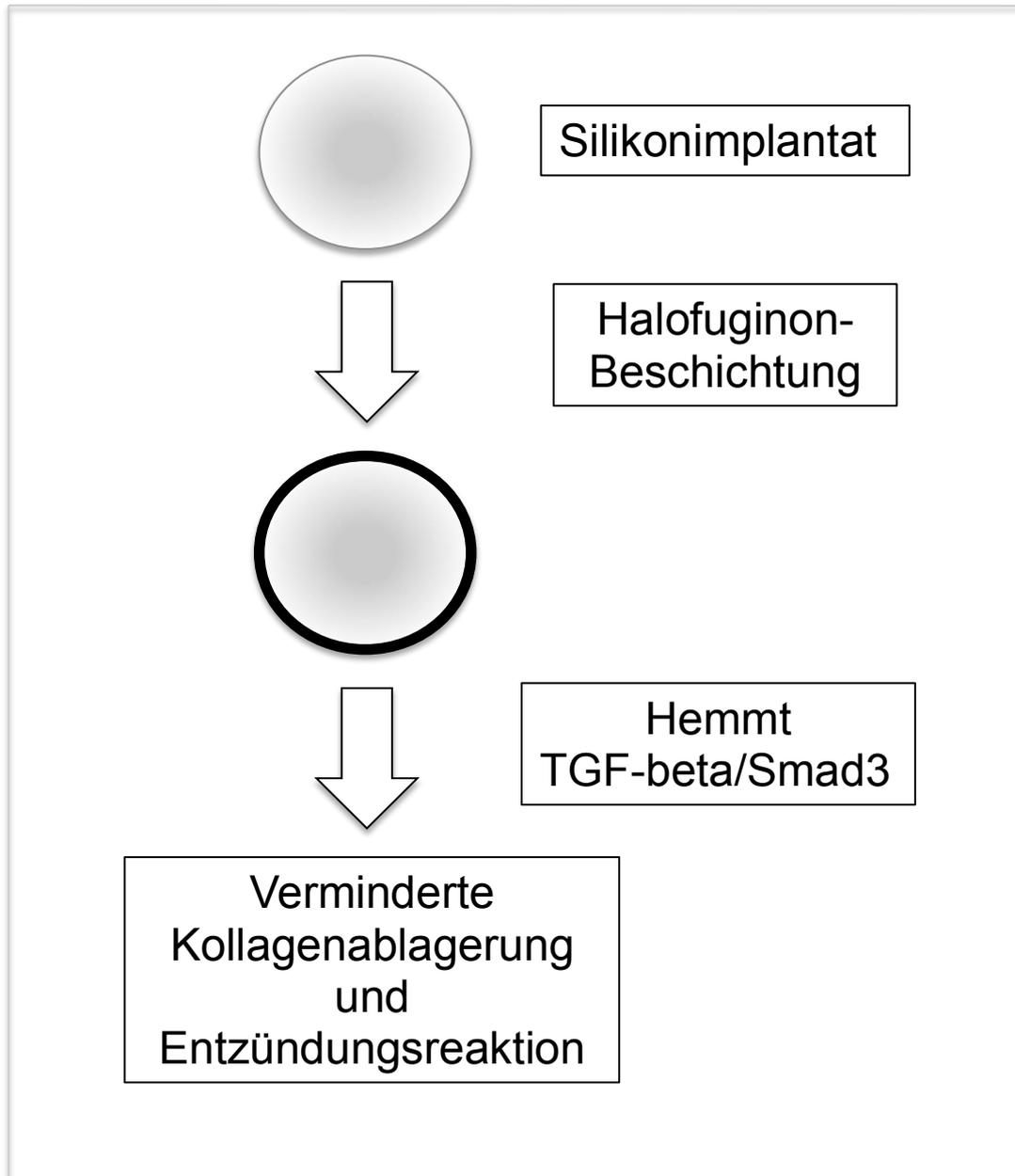


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Herkömmliche Silikonimplantate erhalten durch Modifikation eine Halofuginon freisetzende Oberfläche, welche durch Inhibition des TGF-beta/Smad-Signalwegs die Ausbildung einer Kapselfibrose hemmen soll.

2 Material und Methoden

2.1 Implantate

Für die Versuche wurden 14 texturierte Mikrosilikonimplantate verwendet (Nagor Ltd., Glasgow, UK). Die Implantate bestanden aus einer texturierten Silikonhülle und einem Füllstoff aus Silikongel. Der Durchmesser betrug 1,80 cm und das Volumen 0,95 ml. Sieben Implantate aus unbehandeltem Silikon bildeten die Kontrollgruppe und sieben weitere Silikonimplantate wurden mit Halofuginon beschichtet.

2.2 Beschichtungsprozess mit Halofuginon

Die Halofuginonbeschichtung der Implantate wurde von der Firma bionic surfaces Dr. med. Rolf Siegel in Würzburg durchgeführt (Abb. 2.1). Ausgangssubstanz für die Silikonimplantate war PDMS $((\text{CH}_3)_3\text{SiO}[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3)$. Der erste Schritt bestand aus der Oberflächenaktivierung bei Raumtemperatur. Hierfür wurden die Implantate für 8 Stunden in einem geschlossenen Gefäß in Kontakt mit Tetraethoxysilan (TEOS / $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$) (Fluka Chemie AG, Basel, Schweiz) gebracht. Danach wurden alle Implantate mit 0,1%iger NaOH-Lösung benetzt und für 90 Min. in eine 0,5%ige Halofuginon-Lösung ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$) getränkt (Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Das Ergebnis war eine quervernetzte TEOS/PDMS Oberfläche, in die sich Halofuginon integriert hatte. Als letzter Schritt folgte die Plasmasterilisation für 75 Min. bei einer Zyklustemperatur von 46 °C - 55 °C mit dem STERRAD® 200-System (Wasserstoffperoxid-Gas-Plasma) von ASP.

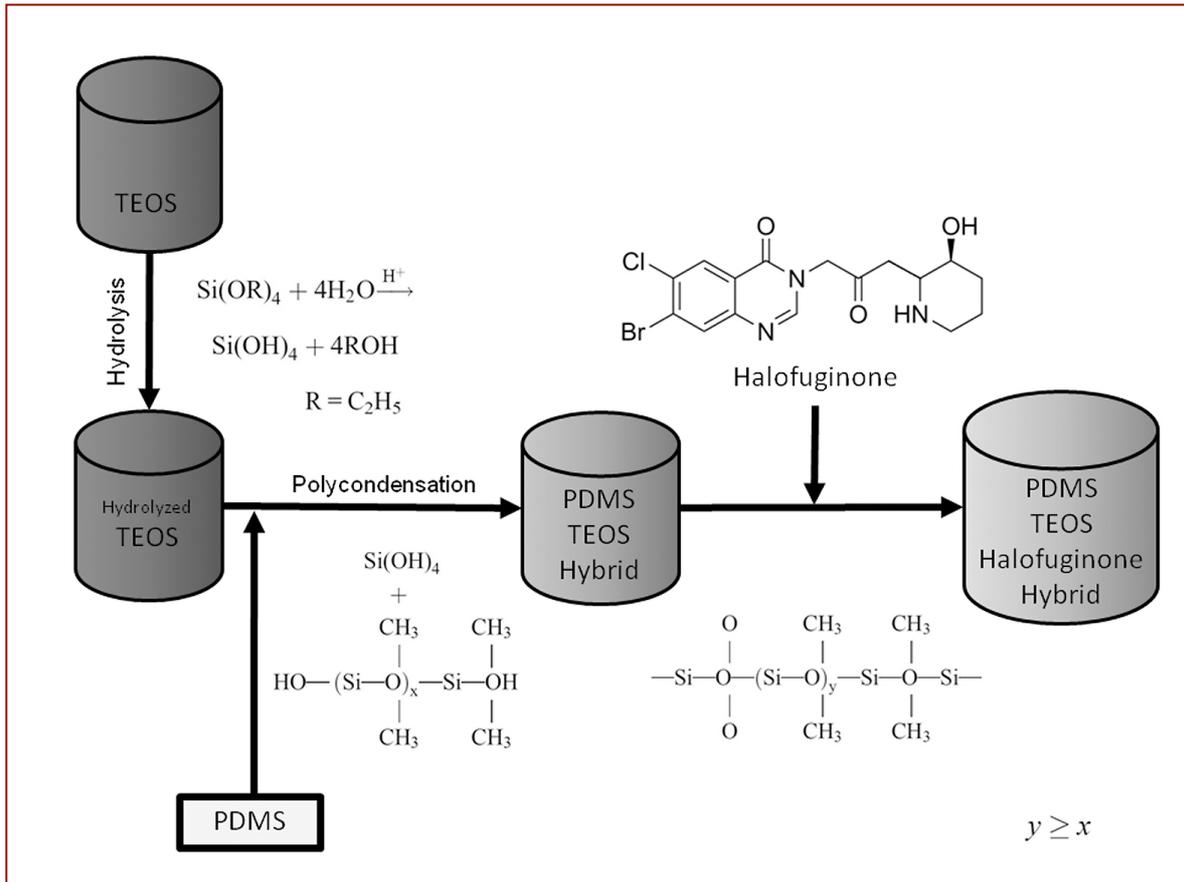


Abb. 2.1 Der Beschichtungsprozess der Halofuginon-Implantate. Das hydrolysierte TEOS wird mit PDMS in Kontakt gebracht. Es folgt eine Polykondensationsreaktion zwischen den terminalen Silanol-Gruppen des PDMS und den OH-Gruppen des TEOS. Anschließend wird Halofuginon in die quervernetzte PDMS/TEOS-Hybridoberfläche integriert.

2.3 Versuchstiere

Der Versuch wurde im Zeitraum von Juli bis September 2008 durchgeführt. Für die Experimente wurden männliche Sprague-Dawley-Inzuchtratten (Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland) verwendet. Das Ausgangsgewicht betrug 250 - 300 g bei einem Alter von zwölf Wochen. Die Tiere wurden in zwei Gruppen randomisiert. Die Versuchgruppe erhielt die Halofuginon beschichteten Implantate. Die Kontrollgruppe bildeten Tiere mit herkömmlichen Silikonimplantaten. Die Tierkäfige (Polycarbonat, Makrolon® Typ IV) standen in Lamina-Air-Flow-Schränken® (Scanbur, Koge, Dänemark) im Kleintierlabor der Universitätsklinik Würzburg. Die Raumtemperatur betrug 21 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 % und der Hell-Dunkel-Rhythmus wurde auf zwölf Stunden eingestellt. Pro Käfig wurden fünf Tiere auf Sägemehlstreue gehalten. Während der gesamten Zeit erhielten die Tiere

Altromin[®] Pressfutter und Trinkwasser *ad libitum*. Die Genehmigung aller Versuche erfolgte über den Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg bei der Regierung von Unterfranken (54-2531.01-30/07). Alle Eingriffe wurden von autorisierten Personen durchgeführt.

2.4 Implantation

Während der Operation wurde jedes Tier mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (Forene[®], 1-Chlor-2,2,2-trifluoroethyl-difluor-methylether, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) betäubt. Nach der Narkoseeinleitung wurden die Ratten auf den Bauch gelegt und im Bereich des kaudalen Rückens ein ca. 5 x 5 cm großer zentraler Hautbereich rasiert. Nach gründlicher Desinfektion folgte ein 2 cm langer Hautschnitt und die Präparation einer Tasche unter dem Panniculus carnosus. Darin wurde das jeweilige Implantat unter Berücksichtigung steriler Kautelen implantiert. Die Wunde wurde mit nicht resorbierbaren Fäden (Prolene 4/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und das Nahtmaterial zwei Wochen postoperativ entfernt. Vor Ende der Operation erhielt jedes Tier einmalig Tramal[®] (Tramalhydrochlorid, Grünenthal GmbH, Aachen) i. m. zur Schmerzprophylaxe. Um das Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere postoperativ unter eine Wärmelampe gelegt. Anschließend erfolgte eine regelmäßige Wundkontrolle.

2.5 Explantation

Das Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der Explantation hatte sich im Durchschnitt auf 450 g verdoppelt. Alle Tiere wurden erneut mit Isofluran betäubt, die Haut rasiert und neben dem tastbaren Implantat ein 4 cm langer Schnitt gesetzt. Die Entnahme der Implantate erfolgte unter Mitnahme der periprothetischen Kapsel. Diese fibröse Kapsel wurde vorsichtig vom Implantat gelöst und zur histologischen Untersuchung in drei Teile zerlegt. Der erste Teil der Kapsel wurde in Formaldehyd gegeben und später in Paraffin eingelegt. Der zweite Teil wurde in einem Konservierungsröhrchen (Best.-Nr. PR02 3,5 ml, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) mit Tissue Tek[®] eingelegt (Best.-Nr. TTEK 125 ml Tissue-Tek O.C.T. Compound, Würzburg, Deutschland). Der verschlossene Probenbehälter wurde bei -196 °C in flüssigem

Stickstoff gefroren. Danach kamen die Proben zur Aufbewahrung in den Eisschrank bei -18 °C. Der dritte Teil wurde für die Untersuchung mittels PCR in ein Röhrchen RNA-Later® (Best.-Nr. AM7022, Ambion, Austin, USA) gegeben. Alle Proben wurden verschlüsselt beschriftet und dokumentiert. Nach der Implantatentnahme wurden die Ratten auf den Rücken gelegt und durch einen Herzschnitt getötet.

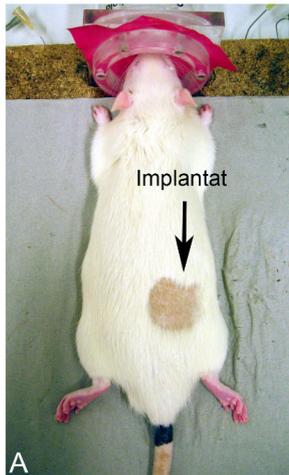
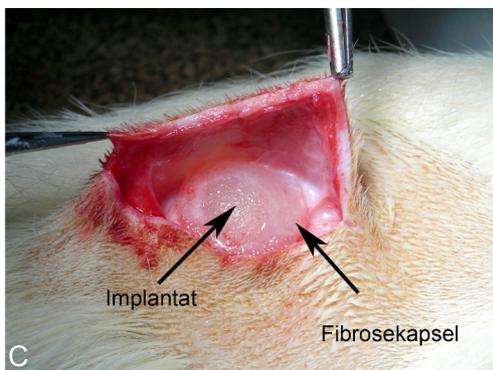
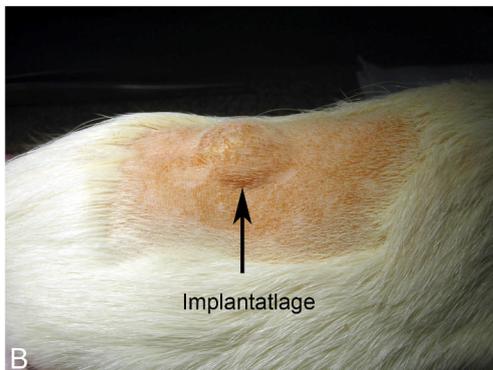


Abb. 2.2 **A** Die Lage nach Implantation. **B** Das Implantat vor Explantation. **C** Der Situs während der Explantation. Das Implantat ist von einer fibrösen Kapsel aus Bindegewebe umgeben.



2.5.1 Anfertigen der Kryoschnitte

Die gefrorenen Proben wurden auf dem Kryoträger fixiert und dieser im Kryostat eingespannt (Frigocut-N-2800, Firma Reichert Jung bzw. Firma Leica, Bensheim, Deutschland). Dann begann das automatische Trimmen bei 150 µm pro Schnitt abwärts in 50µm-Schritten. Der gefrorene Gewebeblock fährt hierbei an der eingesetzten Klinge entlang (Firma Feather, Japan, Microtome Blade S35). Das Gewebeblatt kommt auf der Glasplatte zum Liegen und kann auf einem Objektträger fixiert werden. Die Proben wurden manuell auf eine Dicke von 5 µm zugeschnitten. Diese Objektträger können für die konventionelle sowie für die immunhistologische Färbung verwendet werden. Nachfolgend konnten die Schnitte zur Aufbewahrung bei -18 °C im Eisschrank gelagert werden. Wurden sie dagegen im Anschluss direkt gefärbt, so mussten die Schnitte zuerst bei Raumtemperatur für 20 Minuten trocknen.

2.5.2 Anfertigen der Paraffinschnitten

Bei der Organentnahme wurden die Gewebeproben zum Schutz vor Autolyse in 3%iger Formaldehydlösung eingelegt. Zur Dehydrierung der Präparate wurde eine Entwässerungsmaschine verwendet (Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Deutschland). Nachdem die Plastikkassetten den Entwässerungsprozess durchlaufen hatten, wurden sie in 80 °C warmes Wachs gelegt und kühlten 24 Stunden aus. Am nächsten Tag waren die Paraffinblöcke dann zur Bearbeitung mit dem Schlittenmikrotom Hn40 verwendbar (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland). Zum Schneiden wurde eine Klinge der Klasse S22 benutzt (Microtome Blade, Feather Safety Razor Co.,Ltd., Osaka, Japan). Auch hier wurde mit dem Trimmen auf eine Schnittdicke von 5 µm begonnen. Nach dem Schneiden wurden alle Objektträger in einem Trockenschrank bei 70 °C aufbewahrt (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Bei der Anfertigung von Kryo- sowie Paraffinschnitten war anfangs bei der Einbettung darauf zu achten, dass immer gleiche Teile in einer Position fixiert wurden. Nur so war es möglich, das Kapselgewebe im gleichen Winkel zu schneiden.

2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Bestandteile der Färbung waren:

- Mayer's Hematoxylin: Hämatoxylin, Kaliumaluminiumsulfat, Kaliumjodat, Essigsäure (Firma: Bio Optika, 20134 Mailand, Italien, Art. Nr. 05-06002/L, Lot. 310850)
- Eosin-Floxin alcoholic solution (Firma: Bio Optika, 20134 Mailand, Italien Art. Nr. 05-10020/L, Lot.110820)

Hämatoxylin-Eosin ist eine Übersichtsfärbung und eignet sich gut zur Darstellung von Bindegewebe. Das basische Hämatoxylin färbt saure Strukturen wie DNA (Zellkern) und RNA blauviolett. Eosin als saurer Farbstoff färbt überwiegend basische Strukturen wie Proteine (Zytoplasma) und auch Kollagen hellrosa bis pink. Gefärbt wurde das Kapsel- und Lebergewebe.

Durchführung der Färbung:

1. Entparaffinierung: Dafür wurde eine Glaswanne mit Roti[®] Histol gefüllt (Firma: Roth, 76185 Karlsruhe, Art.-Nr. 6640.1, Charge: 31898741), auf 70 °C aufgewärmt und alle Schnitte für 5 Minuten eingetaucht.
2. Hydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe:
 - Zweimal abs. Alk. (absoluter Alkohol) für jeweils 5 Min.,
 - 80%iger Alk. für 3 Min.,
 - 70%iger Alk. für 3 Min.,
 - 50%iger Alk. für 3 Min.,
 - Spülen in Aqua dest. (destilliertes Wasser).
3. Färben mit Mayer's Hematoxylin für 5 Minuten in einer Glaswanne.
4. Spülen mit Leitungswasser. Dadurch erhöht sich der pH-Wert und die anfangs rötliche bis braune Farbe schlägt um in das typische Blauviolett.
5. Färben mit der Eosin - Alkohollösung für 2 bis 3 Minuten in einer Glaswanne.
6. Spülen mit Leitungswasser.
7. Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe.
8. Eintauchen für jeweils 5 Minuten in zwei Roti[®] Histol - Bäder.

9. Behandlung mit Roti[®]-Histokitt (Firma: Roth, Karlsruhe, Deutschland, REF 66381, Lot. 15895847) und Eindecken mit Deckgläsern.

2.5.4 Die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

Die Masson Trichrome Goldner Färbung ist eine der etablierten Färbungen für das Bindegewebe (Firma: Bio Optica, 20134 Mailand Italien, Art. Nr., Lot. 260810). Zellkerne und Keimzellen erscheinen schwarz. Zytoplasma, Kreatin, Muskelfibrillen färben sich rot. Kollagen, Mucus und basophile Körnchen der Hypophyse kommen grün zur Geltung und die Erythrozyten leuchten gelb. Verwendet werden bei dieser Färbung 5 µm dicke Paraffinschnitte. Hierbei wurde unter dem Abzug gefärbt.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Entparaffinierung im 70 °C warmen Rotihistol[®]-Becken für 5 Minuten.
10. Hydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe:
 - Zweimal abs. Alk. (absoluter Alkohol) für jeweils 5 Min.,
 - 80%iger Alk. für 3 Min.,
 - 70%iger Alk. für 3 Min.,
 - 50%iger Alk. für 3 Min.,
 - Spülen in Aqua dest. (destilliertes Wasser).
2. Auf jeden Schnitt kommen 6 Tropfen Weigerts Eisenhämatoxylin A und 6 Tropfen Weigerts Eisenhämatoxylin B. Einwirkzeit 10 Min.
3. 10 Tropfen alkoholisch stabile Pikrinsäure aufgeben (CAVE: karzinogen); 4 Min.
4. Abspülen mit Aqua dest.
5. Danach 10 Tropfen Ponceau Säurefuchsin; 4 Min.
6. Abspülen mit Aqua dest.
7. Abtropfen und 10 Tropfen Goldner light green Lösung; 5 Min.
8. Spülen in Aqua dest.
9. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe.
10. Eintauchen in zwei Glasgefäße mit Rotihistol[®].
11. Eindecken mit dem Roti[®]-Histokitt (Firma: Roth, Karlsruhe, Deutschland, REF 66381, Lot. 15895847) und einem Deckglas.

2.5.5 Untersuchung der Übersichtsfärbungen

Zur Auswertung der histologischen Präparate wurde ein Olympus[®]-Mikroskop (Typ BX 51 TF No. Oc22834) und eine Digitalkamera von Olympus[®] (DP 71 No. 7E10977) sowie das Programm Cell[^]F 2007 (Olympus Soft Imaging Solutions[®] GmbH) verwendet. Im Präparat jeder explantierten Kapsel wurden zehn Bereiche randomisiert ausgewählt und mit einer 200-fachen Vergrößerung untersucht.

Folgende Parameter wurden in den Präparaten beurteilt:

- **Kollagen**
- **Vaskularisierung**
- **inflammatorische Zellen**
- **Silikonpartikel**, wobei hierbei eine Unterscheidung zwischen Silikonpartikeln innerhalb von Silikonomen und freien Silikonkörpern, welche durch das mechanische Ablösen der Kapsel von der Silikonoberfläche gelöst worden waren, gemacht wurde
- **Fibroblasten**
- **Kapseldicke in μm** an der dünnsten Stelle der Kapsel im Blickfeld

Jedes Blickfeld wurde auf die genannten Parameter hin untersucht. Die Ausprägung wurde bei den Parametern Kollagen, Vaskularisierung, inflammatorische Zellen, Silikonpartikel und Fibroblasten semiquantitativ anhand einer Gradeinteilung dokumentiert. Die Quantifizierung der Kapseldicke erfolgte quantitativ in Mikrometern.

Grad	Ausprägung des Parameters
0	negativ, nicht vorhanden
1	Mild
2	Moderat
3	Ausgeprägt
4	massiv

Tabelle 2.1 Die Tabelle zeigt die semiquantitative Gradeinteilung bei der Bewertung der Übersichtsfärbung, welche für die Analyse der Parameter Kollagen, Vaskularisierung, inflammatorische Zellen, Silikonpartikel und Fibroblasten genutzt wurde.

2.5.6 Immunzytologie und Immunhistologie

Bei der immunzytologischen Färbung wurden die indirekte und die doppelt indirekte Methode verwendet. Die indirekte Methode als gängigstes Verfahren hat einen primären und einen sekundären Antikörper. Bei der doppelt indirekten Methode wird nach dem primären und sekundären Antikörper noch ein tertiärer verwendet. Dieser tertiäre Antikörper ist gegen die Tierspezies des sekundären Antikörpers gerichtet. Mit dieser Methode kann das Farbsignal verstärkt werden. Alle verwendeten Antikörper waren vom IgG-Typ. CD8, CD4, CD68, TGF-beta waren monoklonal. Sie binden nur ein Epitop eines Antigens. Dadurch sind sie anfällig gegenüber Veränderungen des Epitops. Kreuzreaktionen und Hintergrundfärbungen treten seltener auf. Kollagen-Typ-I und -III waren polyklonal, genauso wie der sekundäre und tertiäre Antikörper. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen B-Zell-Linien und erkennen so verschiedene Determinanten des Antikörpers. Mögliche Veränderungen an den Epitopen haben demnach schwächere Auswirkungen als bei den monoklonalen Antikörpern. Außerdem sind sie nicht aufgereinigt. Vorhandene Serumproteine können deswegen zu unerwünschter Hintergrundfärbung führen. Durch die Variabilität der Antikörper kann es zu Kreuzreaktionen und falsch positiven Ergebnissen kommen. Zu beachten ist auch, dass es in unterschiedlichen Chargen zu spürbaren Konzentrationsunterschieden kommen kann. Die Reproduzierbarkeit ist im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern somit schwächer. Diese Vor- und Nachteile gilt es bei der Färbung zu beachten und sie müssen mittels Positiv- und Negativ- Kontrolle mitbeurteilt werden.

Durchführung der Färbung:

1. Die 5 µm dicken Gefrierschnitte wurden direkt aus dem Eisschrank in ein Becken mit Aceton gelegt. Die Einwirkzeit betrug 10 Minuten. ((CH₃)₂CO, Lot 0633813004, Firma: J.T.Baker, Center Valley, USA).
2. 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen und beschriften.
3. Dreimaliges Waschen der Objektträger mit 138,5 mmol Tris-NaCl, pH 7,4 für jeweils 5 Minuten.
4. Kurzes Trocknen bei Raumluft.
5. Inkubation mit dem primären Antikörper: Der jeweilige Antikörper wird mit einem Verdünnungsmedium gemischt (Antibody Diluent Lot 00046835 REF S 2022, Firma: Dako Real™, Glostrup, Dänemark). Die Konzentration des Antikörpers wurde vorher mittels Titrierung bestimmt. Durch die Titrierung wird die optimale Verdünnung des Antikörpers zur Vermeidung von Kreuzreaktionen und damit falsch positiven Ergebnissen erreicht. Die Kreuzreaktion ist eine spezifische Bindung, bei der der Antikörper noch ein zusätzliches anderes Epitop erkennt und bindet.
6. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl Antikörperlösung aufgetragen. Eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur oder bei 8 °C in einer feuchten Kammer (Hartenstein, Würzburg, Deutschland).
7. Dreimaliges Waschen für 5 Minuten in 138,5 mmol Tris-NaCl bei pH 7,4.
8. Der sekundäre Antikörper: Bei den primären Antikörpern Mouse anti-Rat und Mouse-anti-Human (TGFB) wird der sekundäre Antikörper Rabbit anti-Mouse verwendet. (Polyclonal Rabbit anti-Mouse/HRP, Code Nr. P 0160 LOT, Firma Dako Real™, Glostrup, Dänemark). Bei den primären Antikörpern Kollagen-Typ-I und -III wird der sekundäre Antikörper Goat anti-Rabbit benutzt (Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP, REF P0448, LOT 00046062 Dako Real™, Glostrup, Dänemark). Der sekundäre Antikörper wird mit dem Verdünnungsmedium und Rattenserum vermischt.
9. Verdünnung 1 : 100, Verdünnungslösung = 80 % Verdünnungsmedium + 20 % Rattenserum (Firma: AbD Serotec, Oxford, England, Rat Serum with 0,9 % Azide, REF C13SB, LOT 260908). Das Rattenserum soll die Hintergrundfärbung durch mögliche unspezifische Bindungen verhindern. Dieses Serum besitzt keine spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Antigen. Dieses Nichtimmunserum, auch Normalserum genannt, sättigt die elektrostatischen Proteine im Gewebe.

10. Auf jeden Objektträger kommen 100 µl. Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur.
11. Dreimaliges Waschen mit 138,5 mmol Tris-NaCl bei pH 7,4.
12. Tertiäre Antikörper. (Nur bei CD 4, CD 8, CD 68): Goat anti-Rabbit (Firma: Caltag, Hamburg, Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Human Ads HRPO Conjugat, REF LL42007, LOT 56040605). Dieser Antikörper bindet an die Tierspezies des sekundären Antikörpers, hier Rabbit anti-Mouse. Auf jeden Schnitt kommen 100 µl für 30 Min. bei Raumtemperatur. Die Arbeitsverdünnung ist 1 : 100. Verdünnungslösung = 80 % Verdünnungsmedium + 20 % Rattenserum. Auch hier soll das Rattenserum eine unspezifische Hintergrundfärbung verhindern.
13. Auf jeden Objektträger kommen 100 µl. Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur.
14. Dreimaliges Waschen für 5 Minuten in 138,5 mmol Tris-NaCl, pH 7,4.
15. Kurzes Trocknen bei Raumluft.
16. Färbung mit einem enzymgebundenen 3,3'-Diaminobenzidin, welches von der Horseradish Peroxidase am sekundären bzw. tertiären Antikörper oxidiert wird und dadurch zu einer bräunlichen Färbung führt.
17. Auf jeden Objektträger werden zwei Tropfen des DAB-Kits aufgebracht. Anschließend wird unter dem Lichtmikroskop der Farbumschlag der markierten Antigene beobachtet (BIO GENEX, Liquid DAB Substrat Pack, REF HK 130-5KE, Lot 1300 708, San Ramon, USA).
18. Nach ausreichender Färbung werden die Objektträger gründlich in 138,5 mmol Tris-NaCl, pH-Wert 7,4, gewaschen.
19. Kurzes Spülen in Aqua dest.
20. Eintauchen in Hämatoxylin (Art. Nr. 05-06002/L, Lot. 310850, Firma: Bio Optika, 20134 Mailand, Italien) für 30 Sekunden.
21. Spülen mit kaltem Leitungswasser; 10 Min.
22. Zweimal für 5 Minuten in absoluten Alkohol.
23. Nacheinander in zwei Becken mit dem Lösungsmittel Roti[®] Histol.
24. Eindecken mit Roti[®]-Histokitt und Deckgläsern.

Material und Methoden

Antikörper	Firma	Kat.-Nr.	Isotype	Verdünnung	Klonität	Antikörperspezifität	Kreuzreaktion	Sekundärer Antikörper
TGF-beta (transforming growth factor beta)	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA797 LOT 071108	IgG1	1 : 500	monoklonal	Mouse Anti Human	Sheep, Rat, Mustelid	Polyclonal Rabbit anti Mouse Immuno- globulins/HRP Firma: Dako Code Nr. 0161
CD8 Alpha	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA 48R LOT 1004	IgG1	1 : 1000	monoklonal	Mouse Anti Rat	-	Polyclonal Rabbit anti Mouse Immuno- globulins/HRP Firma: Dako Code Nr. 0161
CD68	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA 341R Lot Batch 031208	IgG1	1 : 1500	monoklonal	Mouse Anti Rat	-	Polyclonal Rabbit anti Mouse Immuno- globulins/HRP Firma: Dako Code Nr. 0161
CD4 (Domain 1)	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA 3726 Lot Batch 1204	IgG2a	1 : 1500	monoklonal	Mouse Anti Rat	-	Polyclonal Rabbit anti Mouse Immuno- globulins/HRP Firma: Dako Code Nr. 0161
Kollagen III	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA 2150-1950 Lot 130608	IgG	1 : 200	polyklonal	Rabbit Anti Rat	Weniger als 10 %	Polyclonal Goat anti Rabbit Immuno- globulins/HRP Firma: Dako REF P0448 Lot 00046062

Material und Methoden

Kollagen I	AbD Serotec Immermann Str. 13 40210 Düsseldorf	MCA2150- 1908 Lot 100708	IgG	1 : 300 1 : 500 1 : 150	polyklonal	Rabbit Anti Rat	-	Polyclonal Goat anti Rabbit Immuno- globulins/HRP Firma: Dako REF P0448 Lot 00046062
Anti- Propyl-4- Hydroxy- lase, Fibroblasten	Acris GmbH, Schillerstraße 5, 32052 Herford Germany	MCA AF 5110-1 Lot 08P00812	IgG1	1 : 500	monoklonal	Mouse Anti Rat	-	Polyclonal Rabbit anti Mouse Immuno- globulins/HRP Firma: Dako Code Nr. 0161

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Antikörper.

2.5.7 Auswertung der Immunhistologie

Die Antikörper gegen CD4, CD8, TGF-beta, CD68 und Fibroblasten - Epitope führten zu einer zytoplasmatischen Färbung. Die Antikörper gegen Kollagen-Typ-I und -III konnten Kollagen nachweisen. Aufgrund dieser Eigenschaft erfolgte die Auswertung der zytoplasmatischen Antikörper quantitativ durch Auszählen der markierten Zellen pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung. Die Auswertung der Kollagenfärbung wurde semiquantitativ gemäß Tab. 2.3. durchgeführt.

Bewertung	Kollagenmenge
1	kein Kollagen
2	wenig Kollagen
3	moderate Menge an Kollagen
4	viel Kollagen
5	sehr viel Kollagen

Tabelle 2.3 Semiquantitative Bewertungsgrade zur Beurteilung der Kollagenmenge in der immunhistologischen Färbung.

2.6 Pufferherstellung

1. Tris-NaCl, 5 l:
2. 40,5 g NaCl (Apotheke Uniklinik Würzburg)
3. 3,0 g Tris (Art.-Nr. 48551 M 121,14 g/mol, Charge 448100264, Firma Carl Roth GmbH)
4. pH 7,4 aufgefüllt mit HCl \geq 32 % M 36,46 g/mol (REF P074.1, LOT 448101001, Firma: Carl Roth GmbH)

2.7 Durchführung der qRT-PCR

Um mit der PCR-Technik eine quantitative Aussage zu treffen, bietet sich die Verwendung einer Real-Time-PCR an. Dabei wird die Amplifizierung in Echtzeit beobachtet. Diese Visualisierung kann zum Beispiel anhand einer fluoreszierenden Sonde, welche durch die Polymerase aktiviert wird, erfolgen. Auch die Verwendung

eines interkalierenden Farbstoffs ermöglicht solch eine Messung. Bei jedem Zyklus verändert sich die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge. Durch die Messung der Fluoreszenz während der Amplifikation kann so ein quantitativer Rückschluss gezogen werden.

Für diese Art der Quantifizierung wird ein Referenzgen zur Normierung herangezogen. Die Expression des untersuchten Gens wird dabei mit einem nicht regulierten, konstant exprimierten Gen verglichen. So ist es möglich, die durchgeführte PCR mit einem definierten Standard zu vergleichen. Konstante Gene sind zum Beispiel β -Aktin und GADPH, welche aus diesem Grunde als Haushaltsgene (*housekeeping genes*) bezeichnet werden.

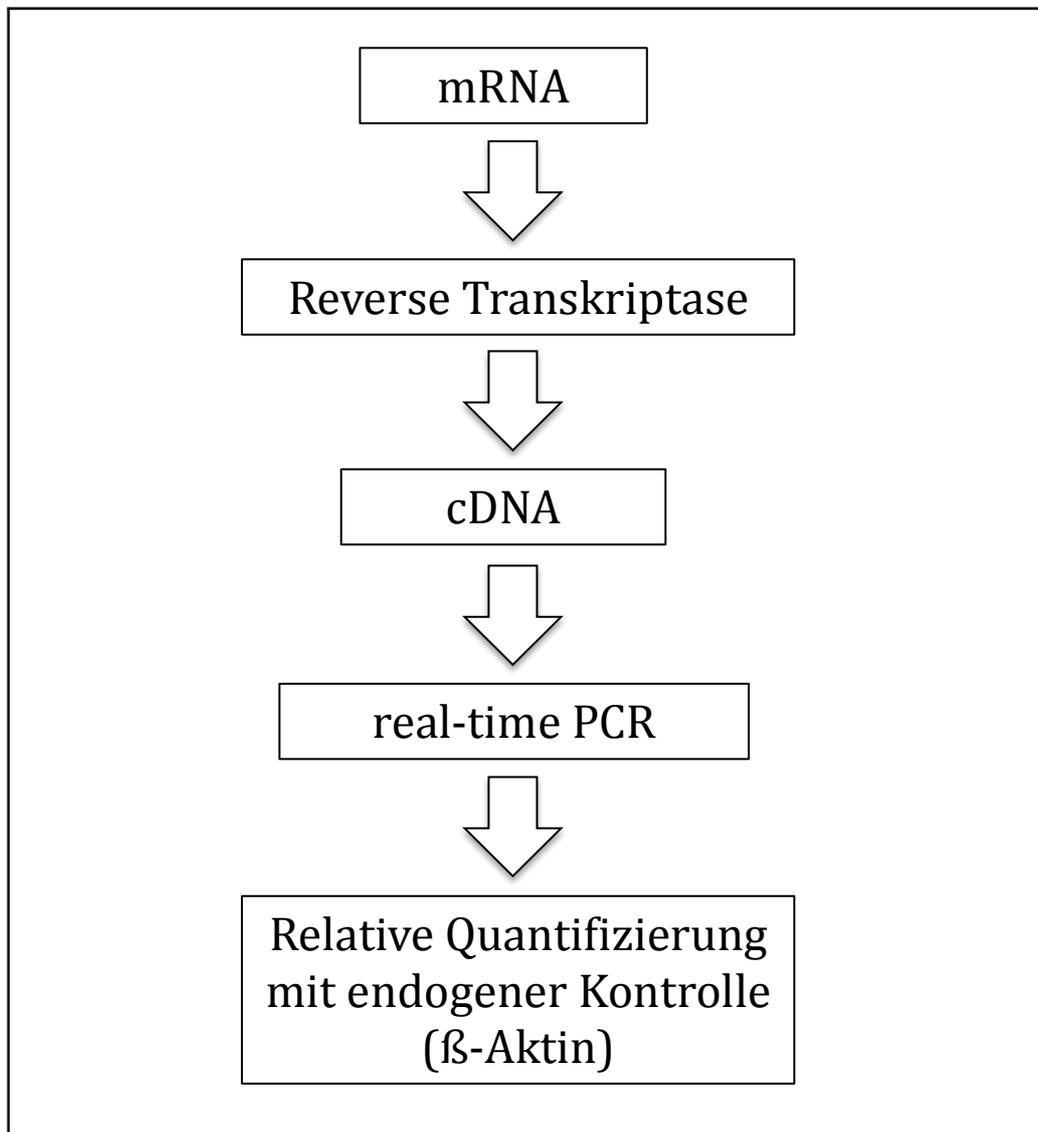


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der qRT-PCR zur quantitativen Bestimmung von mRNA im Gewebe um die Halofuginon freisetzenden Silikonimplantate. Zuerst wird die RNA mittels

Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Matrize wird in einem zweiten Schritt mittels Real-Time-PCR amplifiziert. Die Veränderung der Fluoreszenz bei fortschreitenden PCR-Zyklen korreliert mit der Zunahme der DNA-Menge. Durch Normierung mit Hilfe eines konstant exprimierten *Haushaltsgens* (β -Aktin) wird eine relative Quantifizierung der untersuchten RNA errechnet.

2.7.1 RNA-Isolation und RT-PCR

Teile der explantierten Kapsel wurden für die qRT-PCR aufgearbeitet. Die totale RNA wurde mit TRIzol® (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. 1 μ g der totalen RNA wurde zur Synthese der cDNA verwendet. Dieser Schritt wurde mit dem ThermoScript® RT-PCR-System durchgeführt (Invitrogen, Deutschland). Kennzeichnend für dieses System sind die unspezifischen Oligo-dT-Primer und die reduzierte RNase-H-Aktivität der Reversen Transkriptase. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde die GoTaq-Flexi-DNA-Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) unter Berücksichtigung von Zeit und Temperatur benutzt. Die verwendeten Primer (Qiagen, Hilden, Deutschland) waren für die mRNA spezifisch, um falsch positive Ergebnisse durch DNA-Kontamination zu vermeiden. Für die Quantifizierung der untersuchten Gene mittels Real-Time-PCR wurde das unspezifische SYBRGreen® Premix (Eurogentec, Seraing, Belgien) in einem Opticon2-cycler (Biorad, München, Deutschland) verwendet. Die Fluoreszenz wurde während aller Zyklen gemessen. Für ein möglichst genaues „annealing“ betrug die Temperatur 55 °C. Standard-Kurven wurden von jeder Probe aufgezeichnet und bildeten einen linearen Plot der Ct-Werte, ausgedrückt als Logarithmus. Die Menge jeder Untersuchung wurde anhand der Standardkurve quantifiziert und als willkürliche Einheit angegeben.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines untersuchten Gens auf ein konstant aktives Referenzgen bezogen. In dieser Studie wurde β -Aktin zur Normalisierung verwendet. Dies vermindert die Varianz der Expressionsergebnisse.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Aus diesem kann die Fold-Differenz berechnet werden ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) [86].

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct}_{\text{Halofuginon}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} \\ \text{Ratio} &= 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}\end{aligned}$$

Die fold change ratio der mRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) wurde zwischen der Halofuginon- und der Kontrollgruppe verglichen. Jedes Ergebnis ≥ 2 wurde als relevant angesehen. Die fold change ratio musste dementsprechend um das Zweifache hoch- oder herunterreguliert sein und der p-Wert kleiner oder gleich 0,05, um als eine unterschiedliche Expression des untersuchten Gens gewertet zu werden.

Folgende Primer wurden verwendet: TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, CD4, CD8, CD68, MMP-2, MMP-9, CTGF, FGF2, Ifnb1 und PDGF (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.8 Kontaktwinkelmessung der Implantatoberflächen

Diese Untersuchungen wurden am Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam durch Dr. A. Holländer durchgeführt.

Die Messung des Wasserkontaktwinkels auf der Oberfläche soll Rückschluss auf die hydrophobe bzw. hydrophile Eigenschaft der Implantate geben.

Die Messung des Wasserkontaktwinkels erfolgte folgendermaßen: Ein 0,01 ml großer Tropfen einer standardisierten Testlösung wird mit einer Pipette auf die Oberflächen der Proben gesetzt. Dabei wird die Vergrößerung des Tropfens durch kontinuierliche Flüssigkeitszugabe gemessen. Der Kontaktwinkel wird nach Aufnahme mit einer Videokamera, softwaregestützt, in einem Zeitraum von 30 s im Takt von 0,2 s bestimmt (Tropfenkonturanalyse-System DSA100, Krüss, Deutschland). Dieser Vorgang wird an verschiedenen Positionen wiederholt. Somit erhält man den Fortschreite- bzw. Benetzungswinkel. Zur Bestimmung des Entnetzungswinkels wird ein Tropfen der Testflüssigkeit nach Aufbringen auf die Oberfläche im Volumen verkleinert.

2.9 Drug-eluting-Studie der halofuginonbeschichteten Oberfläche

Eine weitere Untersuchung sollte Aufschluss geben, ob die Bindung von Halofuginon an die TEOS/PDMS-Oberfläche herkömmlicher Silikonimplantate erfolgreich war und ob anschließend eine Freisetzung möglich ist. Hierfür wurden halofuginonbeschichtete Silikonfolien mit einem Durchmesser von 2 cm für die Drug-eluting-Studie verwendet. Fünf Silikonfolien wurden manuell zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß mit 100 µl phosphate buffered saline (PBS) gelegt. Die PBS-Lösung wurde nach 24 Stunden gewechselt und die gewonnene Lösung auf Halofuginon untersucht. Hierfür wurde die Ultraviolett-Spektroskopie (Absorption bei 243 nm, NanoDrop 2000®, Prelab, USA) verwendet und die Halofuginon-Lösung mit einer Standard-Lösung verglichen. Die Verdünnung wurde viermal durchgeführt, bis Halofuginon unter die Nachweisgrenze fiel.

2.10 Statistik

Die Analyse der gesammelten Daten erfolgte mit SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angezeigt. Um die verschiedenen Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mit $p \leq 0,05$ angegeben.

2.11 Versuchsplanung

Der Versuchsaufbau richtet sich nach den Vorgaben der Europäischen Norm, EN ISO 10993-6:2007, mit dem Titel: „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 6: Prüfung auf lokale Effekte nach Implantation“. Der Versuchsablauf deckt sich mit den normativen Prüfverfahren für Implantate in subkutanem Gewebe. Auch die Untersuchung und Auswertung der biologischen Reaktion um die Implantate entsprechen dem empfohlenen histologischen Punktbewertungssystem für die Zelltypen und die Gewebereaktion. Die Normvorgabe beschreibt ein halbquantitatives Punktbewertungssystem. Durch Berücksichtigung der europäischen Leitlinien können Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen

besser verglichen werden. Des Weiteren soll die Umsetzung in ein Medizinprodukt in Zukunft auf einheitlichen Richtlinien basieren.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Auswertung

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Auswertung

In den Hämatoxylin-Eosin-Präparaten (HE) zeigte sich eine signifikante Veränderung der Kollagenmenge, der Entzündungszellen, der Anzahl der Fibroblasten und der gemessenen Kapseldicke.

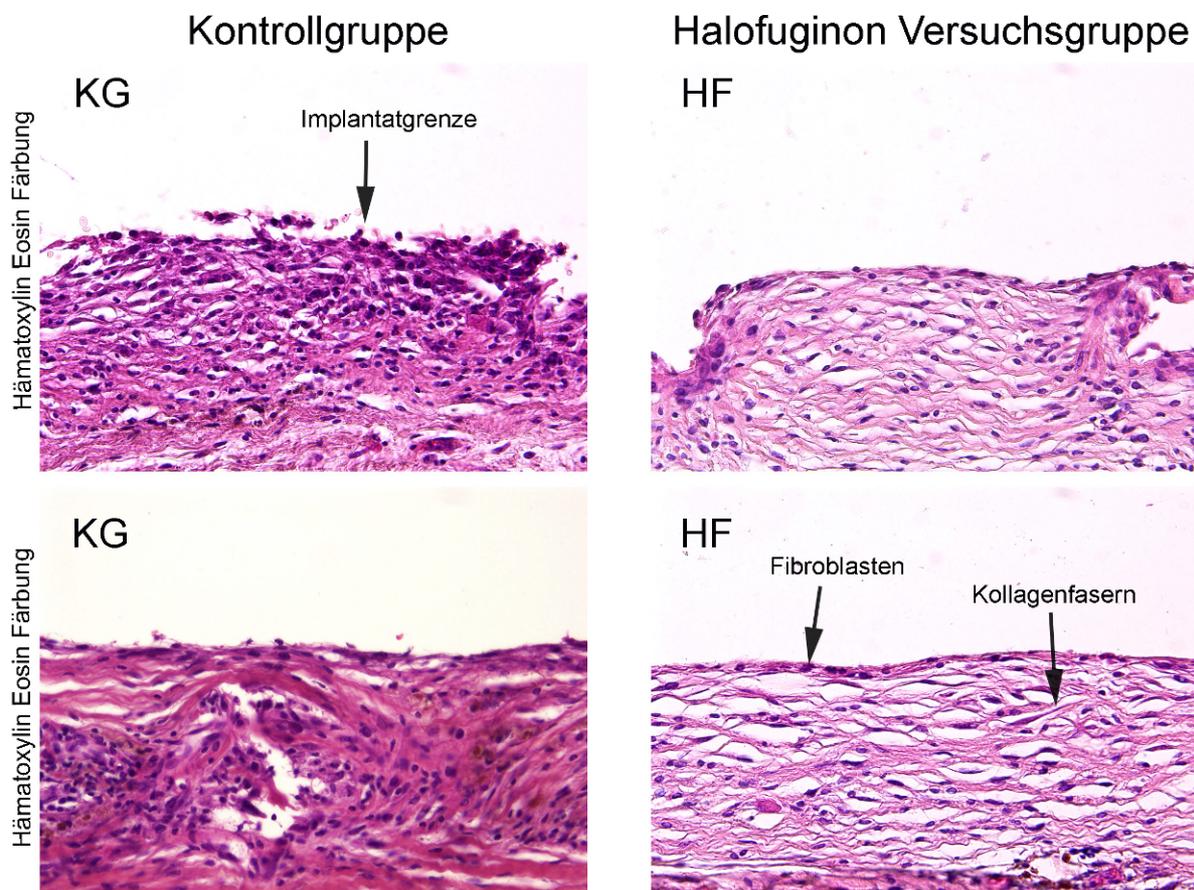


Abb. 3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 200-facher Vergrößerung. Abgebildet ist die Bindegewebskapsel um das Implantat der Kontrollgruppe. Im oberen Bildbereich befand sich das Implantat. In der Mitte ist die Grenze zwischen Implantat und Bindegewebe zu erkennen. In der Kontrollgruppe ist eine kompakte Ansammlung von Zellkernen und Kollagenfasern zu erkennen. Dies entspricht der Kapselfibrose um die Implantate. In der Halofuginon-Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe eine zellarme Kapsel mit einer lockeren Ansammlung von Kollagenfasern nachweisbar.

HE	KG	SD	Halofuginon	SD	p
EZ	2,2333	0,41231	1,700	0,37786	0,019*
KM	2,8889	0,34075	1,6600	0,26331	< 0,0001*
GD	1,7889	1,03975	1,8200	0,45412	0,512
SP	0,3889	0,47813	0,3100	0,35040	0,832
FB	2,9556	0,34681	1,9400	0,36271	0,004*
KD	175,7722	29,59026	123,9255	25,27752	0,002*

Table 3.1 HE: Hämatoxylin-Eosin, KG: Kontrollgruppe, SD: Standardabweichung, p: Signifikanz, EZ: Entzündungszellen, KM: Kollagenmenge, GD: Gefäßdichte, SP: Silikonpartikel, FB: Fibroblasten, KD: Kapseldicke in μm .
Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Um die Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und $p \leq 0,05$ als signifikant determiniert.
*signifikant.

Die Untersuchung der Gewebeproben auf die vorhandene Kollagenmenge zeigte in der HE-Färbung einen signifikanten Unterschied. Um die Halofuginon freisetzenden Implantate waren deutlich weniger Kollagenfasern nachweisbar. Damit übereinstimmend waren auch die Fibroblasten im perikapsulären Gewebe vermindert. Die Untersuchung auf freie Silikonpartikel und Silikonpartikel, umgeben von Entzündungszellen entsprechend einer Fremdkörper-Riesenzell-Reaktion, ergab kein relevantes Ergebnis. Die Auswertung auf Entzündungszellen erbrachte hingegen einen messbaren Unterschied. Die genaue Differenzierung zwischen Entzündungszellen und Fibroblasten gestaltete sich teilweise als schwierig. Deshalb erfolgte die immunzytologische Färbung. Als einfach durchführbare Untersuchung erfolgte am Ende noch die Auswertung der Kapseldicke. Gemessen wurde die Strecke zwischen Implantat und dem lockeren Bindegewebe. Der Unterschied war signifikant.

3.1.2 Masson-Trichrom-Goldner-Auswertung

Die MTC-Färbung bestätigte die Ergebnisse der HE-Übersichtsfärbung. Auch hier konnte eine signifikante Verminderung der Kollagenmenge, der Entzündungszellen, der Anzahl der Fibroblasten und der gemessenen Kapseldicke beobachtet werden.

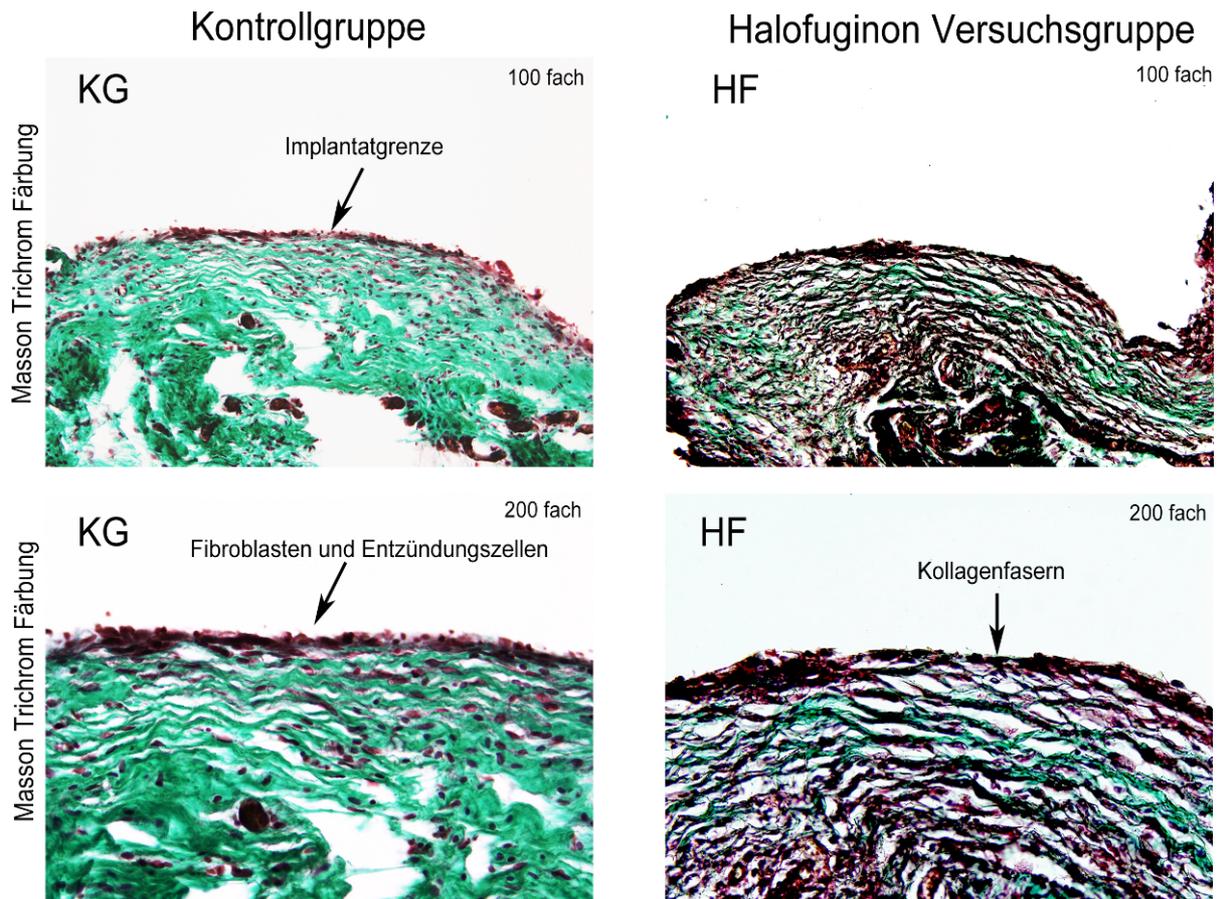


Abb. 3.2 Die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung eignet sich zum Nachweis von Bindegewebe. Das Kollagen der Fibrosekapsel zeigt sich hier in einer grünen Farbe. Das Zytoplasma färbt sich dunkel. Fibroblasten, Entzündungszellen und extrazelluläre Matrix bilden eine solide Grenze zum Implantat. Das Kapselgewebe um die Halofuginon freisetzenden Implantate ist durch weniger Kollagenfasern und Zellkerne gekennzeichnet.

MTC	KG	SD	Halofuginon	SD	p
EZ	1,7750	0,2500	1,3100	0,14491	0,007**
KM	2,8000	0,21602	1,4000	0,20000	0,004*
GD	2,3250	0,82614	1,7400	0,31693	0,175
SP	0,1750	0,35000	0,300	0,09487	0,417
FB	2,6000	0,14142	1,5300	0,26268	0,004*
KD	162,3215	17,04467	110,8962	7,20747	0,005*

Tabelle 3.2 MTC: Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, KG: Kontrollgruppe, SD: Standardabweichung, p: Signifikanz, EZ: Entzündungszellen, KM: Kollagenmenge, GD: Gefäßdichte, SP: Silikonpartikel, FB: Fibroblasten, KD: Kapseldicke in μm . Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Um die Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und $p \leq 0,05$ als signifikant determiniert. *signifikant.

Die Untersuchung der Kollagenmenge zeigte in dieser Färbung (MTC) weniger Kollagenfasern um die Halofuginon freisetzenden Implantate. Dieser Unterschied war signifikant. Auch die Untersuchung auf Entzündungszellen und Fibroblasten im Kapselgewebe ergab einen signifikanten Unterschied im Intensitätsgrad. Die Untersuchung auf Silikonpartikel ergab keinen nennenswerten Unterschied. Die Vermessung der Kapseldicke in μm an der jeweils dünnsten Stelle zeigte eine signifikant dünnere Kapsel in der Halofuginon-Gruppe.

3.2 Auswertung der Immunhistologie

3.2.1 Auswertung der CD68-Immunzytologie

Die quantitative Auswertung der CD68-positiven Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied. CD68 ist ein Oberflächenmolekül der Makrophagen, welche eine zentrale Rolle in der Kapselfibrose innehaben. Die Anwesenheit induziert die Fibroblastenaktivierung und somit die Kollagensynthese. In Abb. 3.15 und 3.16 sind die Fibrosekapseln der beiden Versuchsgruppen in zunehmender Vergrößerung abgebildet. In der Halofuginon-Versuchsgruppe sind bei der quantitativen Auswertung signifikant weniger Makrophagen im Kapselgewebe (Tab. 3.3).

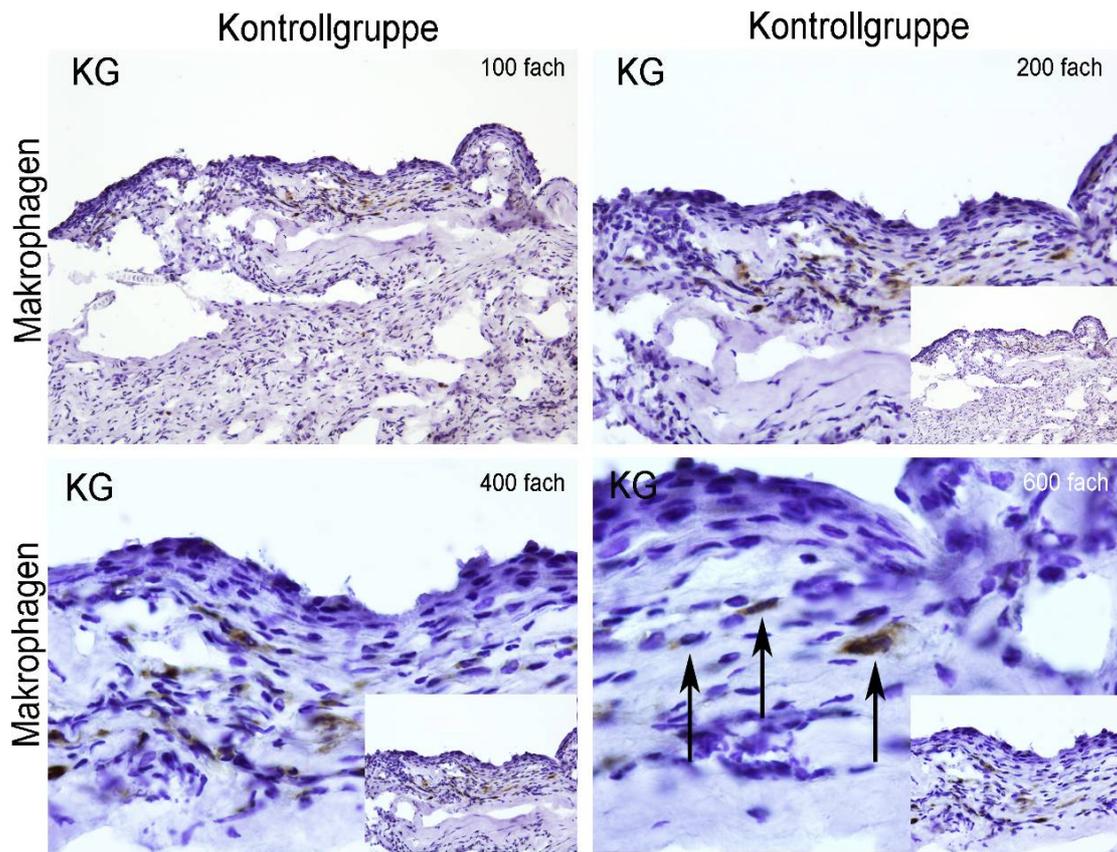


Abb. 3.3 Immunzytologie mit einer Anti-CD68-Färbung der Kontrollgruppe.

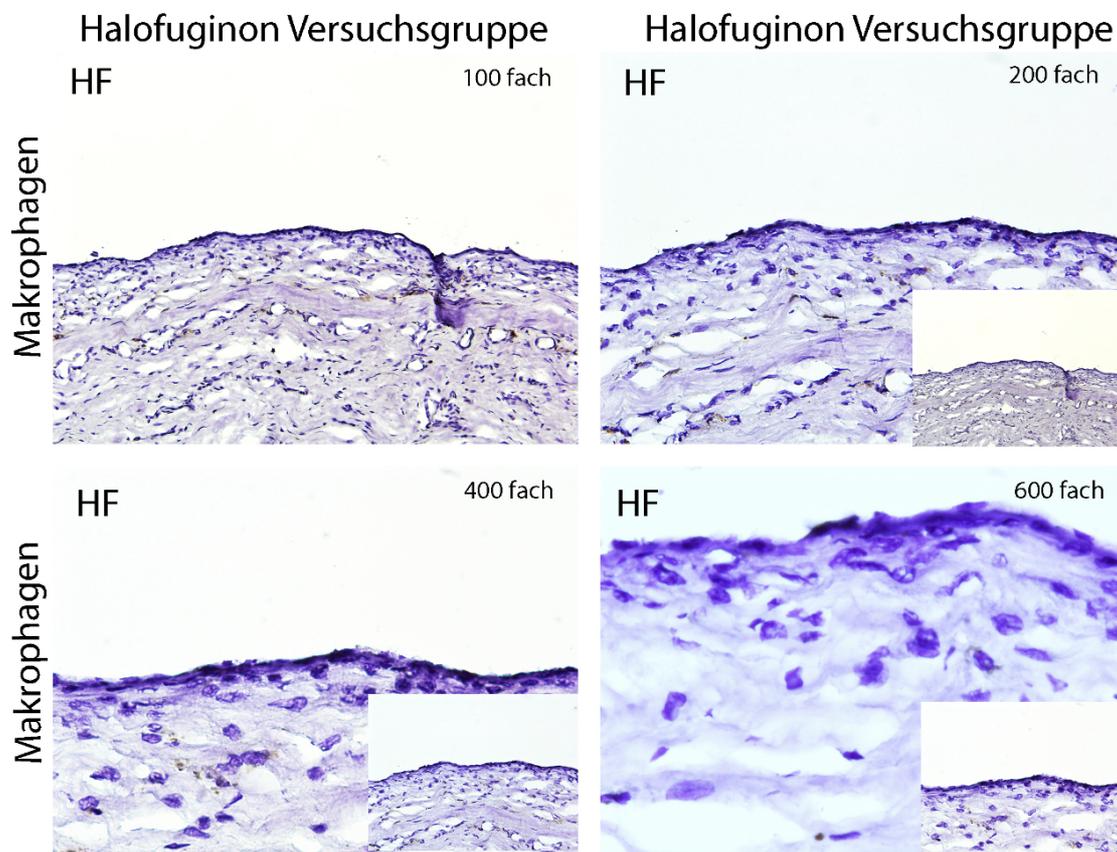


Abb. 3.4 Immunzytologie mit einer Anti-CD68-Färbung der Halofuginon-Versuchsgruppe.

3.2.2 Auswertung der TGF-beta-Immunzytologie

Die Auswertung der TGF-beta-Antikörperfärbung ergab weniger positive Zellen um die Halofuginon freisetzenden Implantate. Die Auswertung von jeweils 12 Gesichtsfeldern pro Kapsel bei einer 200-fachen Vergrößerung ergab einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,022$. In Abb. 3.18 ist zu erkennen, dass sich das Zytoplasma der TGF-beta-synthetisierenden Zellen hellbraun verfärbt. Kontrollgruppe und Halofuginon-Gruppe werden in zunehmender Vergrößerung gegenübergestellt.

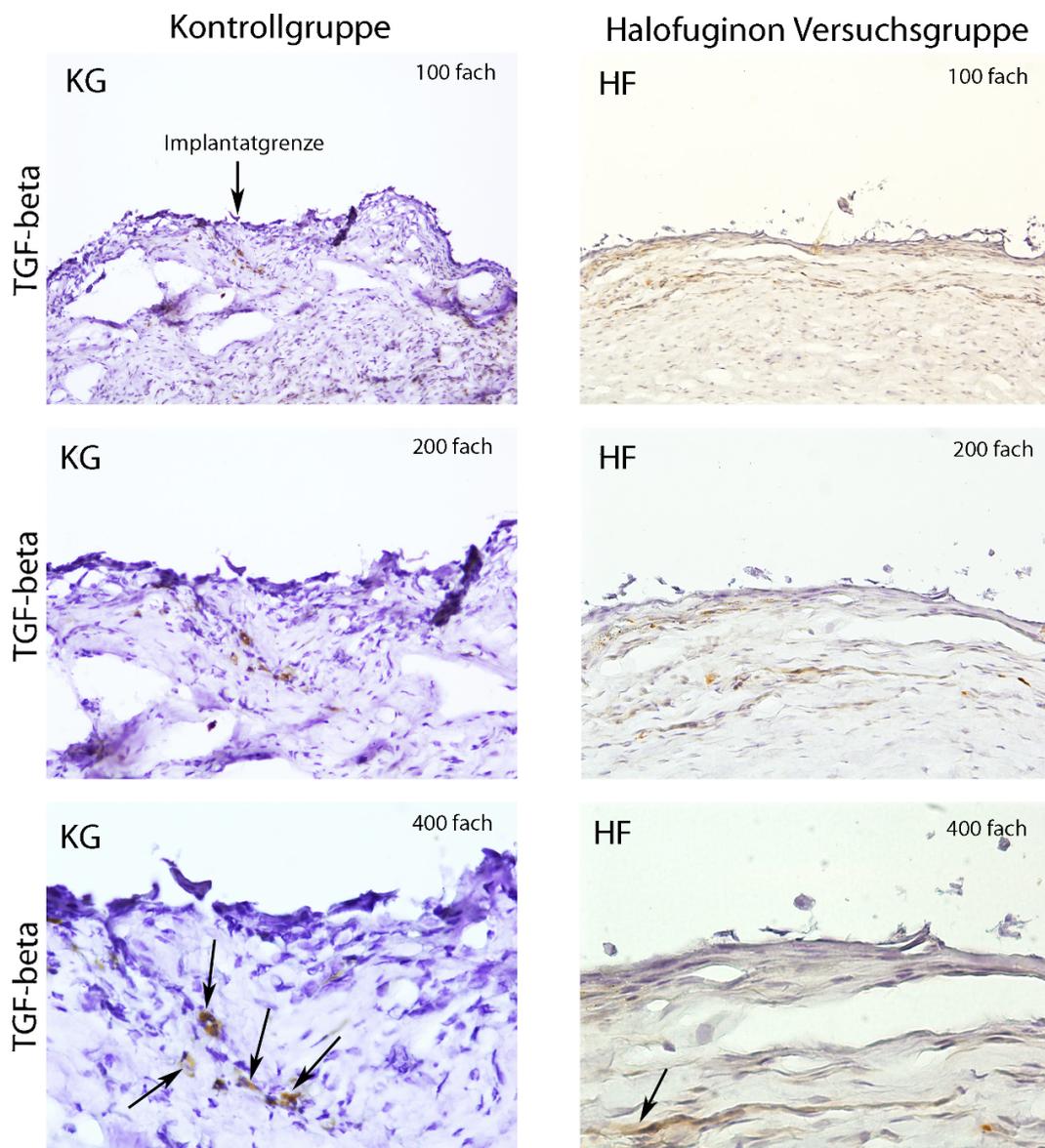


Abb. 3.5 Immunzytologie mit einem TGF-beta-Antikörper.

3.2.3 Auswertung der Fibroblasten-Immunzytologie

Bei der Auswertung der Fibroblasten im Kapselgewebe konnte um die Halofuginon freisetzenden Implantate eine deutliche Verminderung nachgewiesen werden. Diese Verminderung der Fibroblasten war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $p = 0,003$ signifikant. In Abb. 3.20 sind die beiden Versuchsgruppen dargestellt. Die Fibroblasten sind am basophilen Zellkern und an der zytoplasmatischen Braunfärbung zu erkennen. In der Kontrollgruppe war eine höhere Fibroblastendichte, insbesondere an der Grenze zu den Implantaten, nachweisbar. Dieses Ergebnis untermauert die Beobachtung in der HE-und MTC-Färbung.

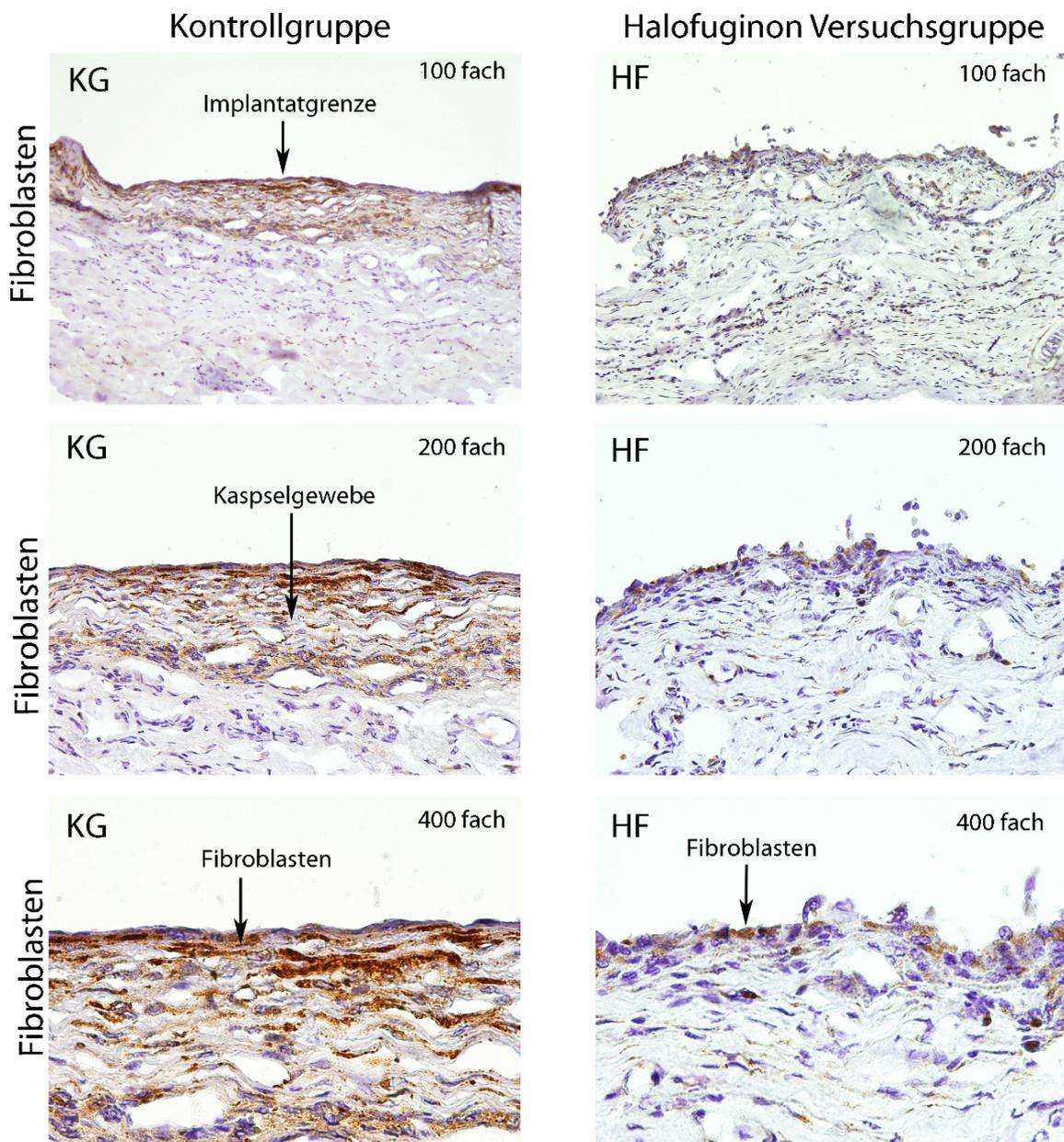


Abb. 3.6 Immunzytologie mit Antikörpern gegen Fibroblasten.

3.2.4 Auswertung der Kollagen-Typ-I-Immunhistologie

Grundstruktur der Fibrosekapsel um die Implantate sind Kollagenfasern, insbesondere Kollagen-Typ-I. Die Intensität der Braunfärbung korreliert mit der Kollagendichte. An der Kontaktfläche zum Implantat zeigt sich eine besonders starke Färbung. Die semiquantitative Beurteilung von Kollagen-Typ-I und -III war mit einem p-Wert von jeweils 0,003 signifikant. Halofuginon ist ein spezifischer Inhibitor der Kollagen-Typ-I-Synthese. Durch die Bindung an eine Silikonoberfläche führt die lokale Applikation zu einer Verminderung der Kollagenablagerung, wie es auf der rechten Seite in Abb. 3.7 zu erkennen ist.

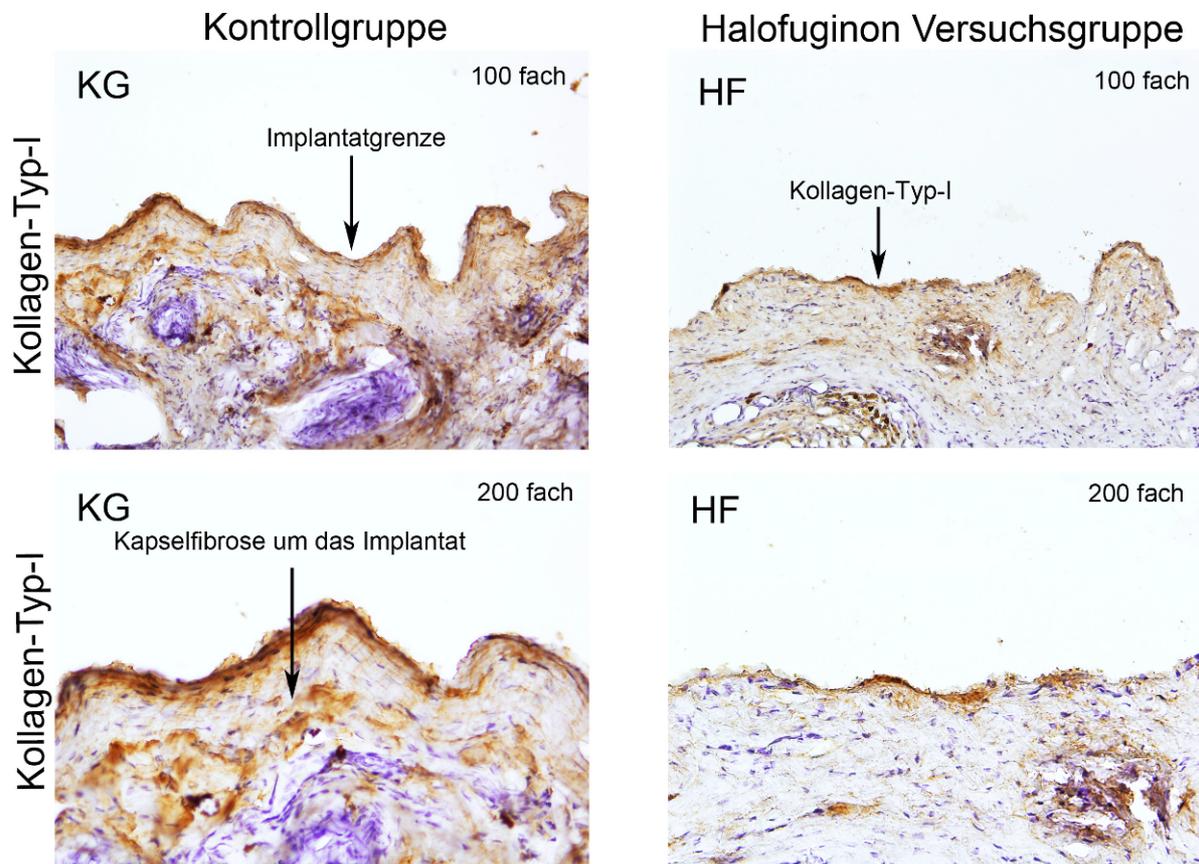


Abb. 3.7 Immunzytologie mit Kollagen-Typ-I-Antikörpern

3.2.5 Auswertung der Kollagen-Typ-III-Immunhistologie sowie der CD4- und CD8-Immunzytologie

Bei der CD4- und CD8-Antikörperfärbung konnte nur ein geringer, aber nicht signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.2.6 Ergebniszusammenfassung der Immunhistologie

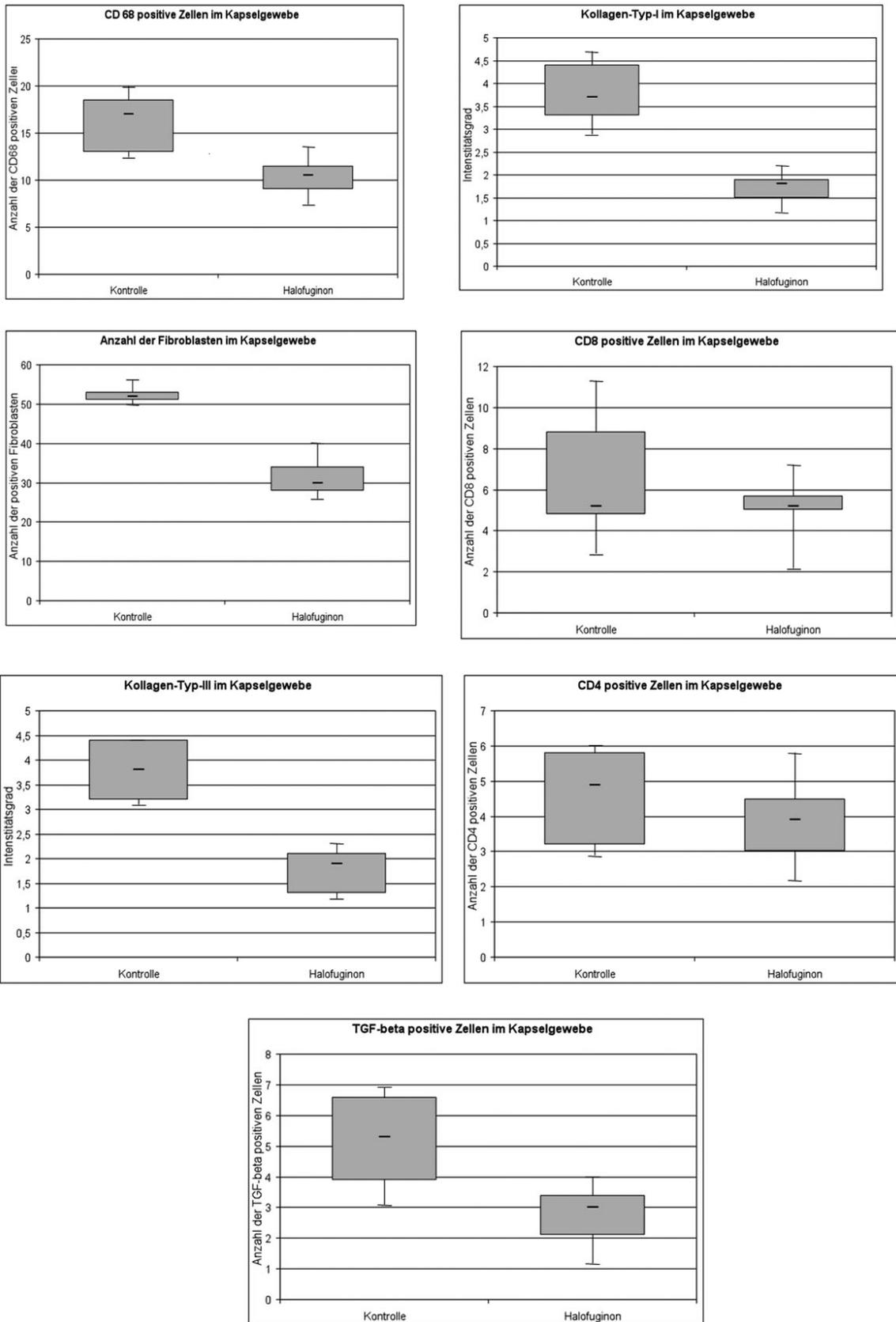


Abb. 3.8 Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse mittels Box-Whisker-Plots.

IH	KG	SD	Halofuginon	SD	p
CD4	4,47	1,29	3,89	1,16	0,316
CD8	6,38	3,2	4,92	1,50	0,431
CD68	16,38	2,79	10,33	1,94	0,004*
FB	51,56	3,39	31,26	4,44	0,003*
TGF-beta	5,15	1,62	2,87	0,91	0,022*
Kollagen I	3,81	0,69	1,81	0,29	0,003*
Kollagen III	3,82	0,54	1,79	0,45	0,003*

Tabelle 3.3 IH: Immunhistologie, KG: Kontrollgruppe, SD: Standardabweichung, FB: Fibroblasten.

*Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Um die Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und $p \leq 0,05$ als signifikant determiniert *signifikant.*

3.3 Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchung

3.3.1 Auswertung der Real-Time-PCR

Die relative Quantifizierung der Real-Time-PCR-Untersuchung zeigt eine verminderte Genexpression in der Gruppe der Halofuginon-Implantate für TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, Fibroblasten, MMP-2, CD68 und CTGF.

3.3.2 Ergebnisse der verwendeten Primer

Die Real-Time-PCR zeigt eine schnelle Amplifizierung der cDNA von β -Aktin, TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, Fibroblasten, MMP-2, MMP-9, CD4, CD8, CD68, CTGF, FGF2, PDGF, TGF-beta2 und TGF-beta3. In der Kontrollgruppe ergaben sich folgende relevante Ct-Werte, angegeben als Mittelwerte: TGF-beta1 $26,39 \pm 2,00$, Kollagen-Typ-I $21,8 \pm 2,34$, Fibroblasten $22,55 \pm 2,34$, MMP-2 $26,36 \pm 2,35$, CD68 $33,23 \pm 2,98$ und CTGF $29,05 \pm 3,00$. In der Halofuginon-Gruppe betrug der Ct-Wert von TGF-beta1 $28,84 \pm 3,79$, Kollagen-Typ-I $24,2 \pm 3,57$, Fibroblasten $24,14 \pm 3,58$, MMP-2 $31,06 \pm 5,2$, CD68 $33,66 \pm 3,12$ und

CTGF $34,21 \pm 2,97$. Die Analyse der untersuchten Gene in Relation zu β -Aktin ($\Delta\Delta$ Ct-Methode) zeigten für TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, Fibroblasten, MMP-2, CD68 und CTGF eine höhere Expression, als es in der Halofuginon-Gruppe gemessen werden konnte. Für diese Faktoren war der Unterschied signifikant. Dieses Ergebnis zeigt sich auch in der fold change ratio ($2^{(-\Delta\Delta C_t)}$) mit einer erniedrigten Expression für TGF-beta (13,83-fach), Kollagen-Typ-I (10,85-fach), Fibroblasten (5,31-fach), MMP-2 (42,22-fach), CD68 (3,63-fach) und CTGF (91,13-fach).

Ergebnisse

	Ct		Ct β -Aktin		Δ Ct		$\Delta\Delta$ Ct	fold change ratio	p-Wert
	HF	KG	HF	KG	HF	KG			
TGF-beta1	28.84 \pm 3.79	26.39 \pm 2	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	8.5	4.71	-3.79	13.83	0.0069*
COL1	24.2 \pm 3.57	21.8 \pm 2.34	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	3.56	0.12	-3.44	10.85	0.0417*
COL3	24.17 \pm 4.3	22.31 \pm 2.49	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	3.41	0.49	-2.92	6.45	0.0907
lfnb1	24.14 \pm 3.58	22.55 \pm 2.34	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	3.28	0.87	-2.41	5.31	0.0164*
MMP-2	31.06 \pm 5.2	26.36 \pm 2.35	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	10.08	4.68	-5.4	42.22	0.0417*
MMP-9	29.09 \pm 0.54	29.33 \pm 2.19	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	8.54	7.65	-0.89	1.85	0.6993
CD4	30.68 \pm 1.94	30.61 \pm 2.51	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	9.56	8.93	-1.17	2.25	0.6069
CD8	28.25 \pm 2.96	27.19 \pm 2	20.76 \pm 1.09	21.82 \pm 2.24	7.14	6.07	-1.07	2.09	0.7307
CD68	33.66 \pm 3.12	33.23 \pm 2.98	21.97 \pm 2.88	23.03 \pm 2.61	12.48	10.62	-1.86	3.63	0.0479*
CTGF	34.21 \pm 2.97	29.05 \pm 3	28.04 \pm 7.39	22.8 \pm 2.4	12.75	6.24	-6.51	91.13	0.009*
FGF2	32.65 \pm 1.18	31.29 \pm 3.53	28.04 \pm 7.39	22.8 \pm 2.4	6.82	8.48	1.66	0.31	0.7272
PDGF	28.66 \pm 1.74	29.6 \pm 2.39	21.97 \pm 2.88	23.03 \pm 2.61	6.68	6.56	-0.12	1.08	0.7756
TGF-beta2	35.62 \pm 1.74	35.67 \pm 3.05	21.97 \pm 2.88	23.03 \pm 2.61	13.34	12.63	-0.71	1.63	0.5184
TGF-beta3	31.23 \pm 3.05	31.08 \pm 3.05	21.97 \pm 2.88	23.03 \pm 2.61	9.25	8.77	-0.48	1.39	1

Tabelle 3.4 Real-Time-PCR: Ct-Werte der verschiedenen Primer sowie der dazugehörigen Ct-Werte des Referenzgens β -Aktin (housekeeping gene). Zur relativen Quantifizierung sind die Δ Ct und die $\Delta\Delta$ Ct-Werte angegeben.. Auf der linken Seiten sind die folgenden Primer aufgelistet: TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, Kollagen-Typ-I (COL1), Kollagen-Typ-III (COL3), Ifnb1 (Fibroblasten-Marker), Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, Makrophagen (CD68), connective tissue growth factor (CTGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2) und platelet-derived growth factor (PDGF). Gemessen wurde die Genexpression im Kapselgewebe um die Halofuginon-Implantate und um die Kontrollimplantate. Ct-Werte werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. HF=Halofuginon, KG=Kontrollgruppe. Fold change ratio und p-Werte der RT-PCR. Verglichen wurde die Genexpression im Kapselgewebe um die Halofuginon- und Kontrollimplantate. Um die Halofuginon freisetzenden Implantate findet sich eine verminderte Genexpression für TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, Fibroblasten, Matrix-Metalloproteinase 2 und connective tissue growth factor. Als statistische Methode wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. $p \leq 0,05$ ist signifikant (*).

3.4 Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung

Die Größe des Benetzungswinkels nimmt bei hydrophoben Oberflächen zu, wohingegen er auf hydrophilen Materialien kleiner wird. Der Benetzungswinkel auf den Silikonimplantaten entspricht mit $95,3^\circ$ (MW) einer hydrophoben Oberfläche. Der Benetzungswinkel auf den Halofuginon freisetzenden Implantaten beträgt $87,7^\circ$ (MW), ein Entnetzungswinkel konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ausweitung der Tropfen und die dazugehörigen Messwerte zeigen, dass die Oberfläche der Halofuginon-Implantate durch den Versuchstropfen verändert wird. Das gebundene Halofuginon scheint sich aus der PDMS/TEOS-Verbindung zu lösen und somit die Tropfenausweitung zu beeinträchtigen. Eine Hydrophilisierung ist durch die Modifizierung nicht eingetreten.

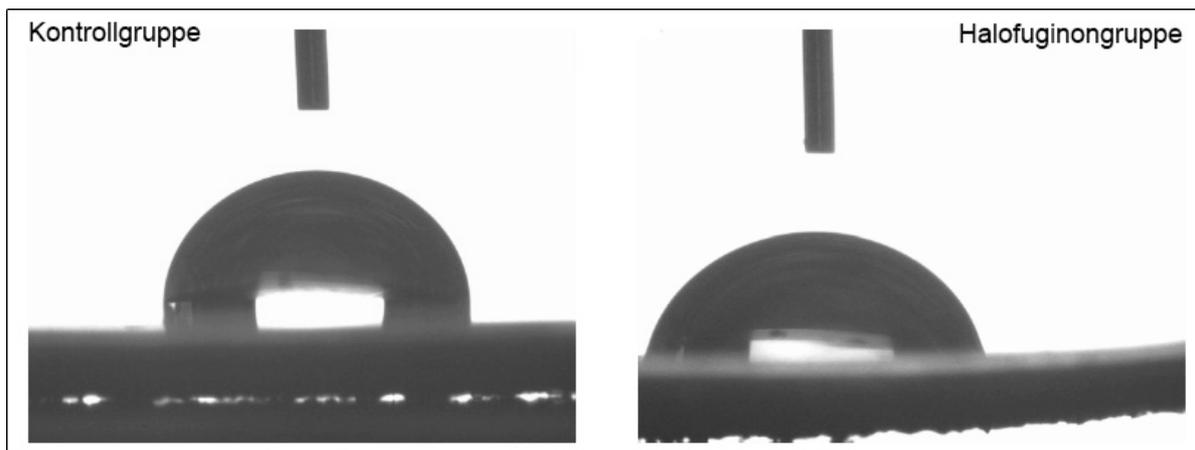


Abb. 3.9 Kontaktwinkelmessung. Der Wasserkontaktwinkel gibt Rückschluss darauf, ob es sich um eine hydrophobe oder hydrophile Oberfläche handelt. Silikon hat eine hydrophobe Eigenschaft. Die Tropfenbildung bei der Halofuginon-Gruppe wird durch die Lösung von Halofuginon beeinflusst und kann somit nicht mit der Kontrollgruppe verglichen werden.

Probe	Benetzungswinkel				MW	Entnetzungswinkel
	1	2	3	4		
KG						
MW	87,4°	95,9°	98,6°	99,2°	95,3°	77,4°
Abw.	3,7°	3,2°	1,8°	4,9°		
HF						
MW	78,0°	85,7°	86,9°	100,1°	87,7	0
Abw.	2,6 °	5,1°	4,7°	3,6°		

Tabelle 3.5 Kontrollgruppe (KG), Halofuginon-Gruppe (HF), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Abw.). Der Benetzungswinkel wurde viermal hintereinander bei zunehmender Größe gemessen. Der Entnetzungswinkel wurde bei abnehmender Größe gemessen.

3.5 Ergebnisse der Drug-eluting-Studie

Bei den Proben zeigte sich über den Zeitraum von vier Tagen ein nahezu linearer Abfall der gemessenen Werte in der UV-Spektroskopie. In jeder untersuchten Probe kam es zum Abfall der Absorption nachdem das Medium gewechselt wurde. Die Halofuginon-Freisetzung konnte über 4 Tage nachgewiesen werden, bevor die Konzentration unter die Nachweisgrenze fiel. Dieser Versuch belegt, dass das gebundene Halofuginon durch Pufferlösung aus dem PDMS/TEOS-Verbund gelöst wird.

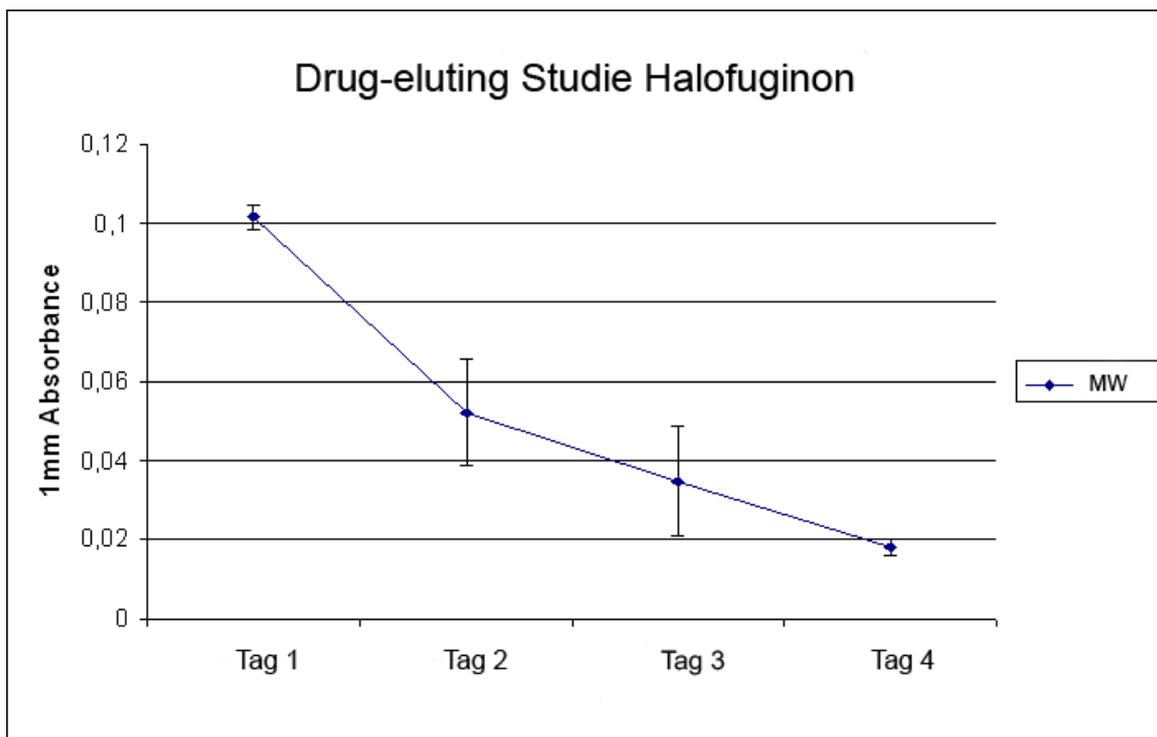


Abb. 3.10 Grafische Darstellung der Halofuginon-Freisetzung. Die Absorption wird für jeden Tag als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Freisetzung ist am ersten Tag am stärksten und nimmt bis zum vierten Tag durchgehend ab.

4 Diskussion

4.1 Pathologie der Kapselfibrose

Die Kapselkontraktur ist der entscheidende Grund für Revisionseingriffe bei der Verwendung von Silikonimplantaten [16, 87]. Daran konnte die Weiterentwicklung der Implantate sowie die Entwicklung unterschiedlicher operativer Verfahren bis heute nur wenig ändern. Die Auswertung der vorhandenen Langzeitstudien über die Prävalenz und Verteilung zeigen, dass bei der klinisch relevanten Kapselkontraktur zwischen einem *frühen* und einem *späten* Auftreten unterschieden werden kann [16, 20-22]. Im ersten Jahr nach Implantation ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Kapselfibrose am höchsten. Im weiteren Verlauf fällt die Inzidenz stark ab, bevor sie nach längerer Liegezeit, mehreren Jahren später wieder zunimmt [21, 22, 88].

Dies gilt für rekonstruktive sowie für ästhetisch-augmentative Eingriffe, wobei das Risiko nach der Brustrekonstruktion vergleichsweise höher ist [1, 16].

Als Ursache für das *frühe* Auftreten der Kapselkontraktur kommen Hämatome, Serome, eine starke Fremdkörperreaktion oder bakterielle Kontamination in Frage [24, 89]. Für die *späte* Kontraktur können sogenannte *low-grade* Infektionen, ein Austritt von Füllstoff oder Materialabrieb, verantwortlich sein [16, 28]. Die Oberflächenbeschaffenheit ist ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entstehung der *frühen* Kapselfibrose. So können unterschiedliche Oberflächen (glatt, texturiert, Polyurethan) die Tendenz der Kapselkontraktur im Anschluss an die Operation signifikant beeinflussen [16, 17, 26]. Bei der *späten* Kapselkontraktur (mehrere Jahre bis Jahrzehnte nach der OP) lässt dieser jedoch Effekt nach [90].

Einige experimentelle Studien konnten für modifizierte Oberflächen der Implantate eine bessere Integration nachweisen [37, 91, 92]. Bisher führten die meisten Studien zur Biokompatibilität nicht über das Versuchsstadium hinaus. Ein verbessertes alloplastisches Material würde ein Zugewinn in der rekonstruktiven Chirurgie darstellen. Die Steigerung der Biokompatibilität verbunden mit einer Verminderung der frühen Kapselfibrose stellte das Ziel dieser Studie dar.

4.1.1 Kapselfibrose durch Ablagerung extrazellulärer Matrix

Nach Einbringen eines alloplastischen Materials bildet sich eine feine Schicht aus fibrösem Bindegewebe um das Implantat und stellt so eine Barriere zum umliegenden Gewebe [3, 6]. Diese Kapsel ist bei idealem Verlauf ohne Komplikationen genau so wie bei der symptomatischen Kapselkontraktur vorhanden. Der Unterschied zur klinisch relevanten Kapselkontraktur ist dabei die Ausprägung der Inflammation und Fibrose um die Implantate [93]. Der genaue Pathomechanismus hin zur Kapselkontraktur ist jedoch nur teilweise bekannt. Als gesichert gilt, dass es bei der Kapselkontraktur zu einer massiven Ablagerung von Kollagenfasern kommt [38, 93], wobei dies Folge einer Makrophagen- und Fibroblasten-Aktivierung durch verschiedene Zytokine (TGF-beta1, CTGF, PDGF) ist, welche durch die Silikonoberfläche getriggert wird [94]. Besonders die Stimulation durch TGF-beta erhöhte die Transkription der Kollagen-Gene und führt so zur Anreicherung von Bestandteilen der EZM [48].

4.1.2 Fibroblasten in der Kapselfibrose

Fibroblasten produzieren den Großteil der EZM und sind somit zentral in die Entstehung der Fibrose involviert. Im periprothetischen Gewebe der Kapselkontraktur ist die Anzahl Kollagen synthetisierender Fibroblasten signifikant erhöht [48, 93]. Die Anzahl der Fibroblasten korreliert hier mit der Kollagenablagerung [95]. Neben der Fibroblastenzahl ist auch die Transdifferenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten von Relevanz [4, 96].

Myofibroblasten sind differenzierte Fibroblasten, welche ebenfalls Prokollagen sezernieren und darüber hinaus in der Lage sind, durch einen Aktin-Myosin-Komplex Kontraktionskräfte zu erzeugen. Es sind diese Zellen, die in der Wundheilung zur Wundkontraktion führen [97]. Es wird angenommen, dass sie auch für die Entstehung der Kapselkontraktur mitverantwortlich sind [4]. Beide Prozesse, die Produktion der extrazellulären Matrix sowie die Transdifferenzierung, werden durch Zytokine wie TGF-beta, CTGF, PDGF oder FGF2 angeregt [97-100]. Exprimiert werden diese Zytokine durch aktivierte Makrophagen, welche im Kapselgewebe ebenfalls vermehrt vorliegen [101].

4.1.3 Makrophagen in der Kapsel­fibrose

In der Fibrose sind Makrophagen in direkter Nähe zu Fibroblasten und Myofibroblasten zu finden [102]. Ihnen wird eine regulatorische Rolle in der Fibroseentstehung zugeschrieben [45]. Makrophagen sezernieren Chemokine, welche Fibroblasten und Entzündungszellen rekrutieren [93]. Außerdem stimulieren Makrophagen die umliegenden Zellen durch Zytokine (TGF-beta1, CTGF) zur Produktion von EZM [102]. Sie steuern den Umsatz der EZM durch Sekretion diverser MMPs und TIMPs, und anfallender Zelldetritus wird von ihnen phagozytiert. In der Kapselkontraktur sind die Makrophagen von Bedeutung, da die Ausprägung der Kontraktur (Baker III und IV) mit der Makrophageninfiltration positiv korreliert [5]. Diese Beobachtungen sind ein Indiz für die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Fibroblasten, die zu einer vermehrten Ablagerung von EZM führen [102-104]. Hauptmediator der Fibrose ist dabei TGF-beta1.

4.1.4 Die Rolle von TGF-beta

TGF-beta ist das zentrale Zytokin in der Fibrose [48, 102, 105]. Die Unterscheidung zwischen TGF-beta1, TGF-beta2 und TGF-beta3 ist aufgrund ihrer teils divergierenden Eigenschaften wichtig. TGF-beta1 hat die stärkste profibrotische Wirkung, da es ein potenter Stimulator der Kollagensynthese und der Myofibroblasten ist [106, 107]. Die profibrotische Wirkung von TGF-beta2 ist schwächer ausgeprägt.

TGF-beta3 hat eine eher entgegengesetzte, antifibrotische Eigenschaft. Es verhindert die Narbenbildung und die Anreicherung von Kollagen [12, 108].

Bei der Kapselkontraktur sowie in vielen anderen fibrotischen Erkrankungen sind TGF-beta1 und TGF-beta2 deutlich erhöht [13, 48]. TGF-beta erscheint deshalb als ein sinnvoller Ansatzpunkt zur Therapie fibrotischer Erkrankungen.

Insbesondere das Smad3-Protein ist für diese Signaltransduktion verantwortlich [48]. Die zentrale Rolle von Smad3 wird anhand der Untersuchung von Smad3-Knockout-Mäusen ersichtlich. Die Abwesenheit von Smad3 verhindert hier eine strahleninduzierte kutane Fibrose, eine Bleomycin-induzierte Lungenfibrose, CCl₄-induzierte Leberfibrose und eine Streptozotocin-induzierte Nierenfibrose [57, 109-

111]. Bei diesen Smad3-Null-Mäusen kommt es im Vergleich zum Wildtyp darüber hinaus zu einer verminderten Ablagerung von EZM.

Ein negativer Feedback-Mechanismus des TGF-beta/Smad3-Signalwegs erfolgt durch die Hochregulierung von Smad7. Smad2 und Smad3 verlieren damit ihre Wirkung und können keine Transkriptionsfaktoren mehr aktivieren. In Keloiden ist eine Herunterregulierung von Smad7 beschrieben. So kann hier das profibrotische Smad2 und Smad3 vermehrt phosphoryliert werden [112]. Auf Zellen mit erhöhter Smad7-Aktivität kann TGF-beta keine fibrotische Wirkung ausüben [113]. Somit ist auf dieser Signalebene eine erfolgreiche Inhibierung der Fibrose möglich.

4.1.5 CTGF in der Kapselfibrose

Neben TGF-beta1 ist CTGF ein weiteres bedeutendes Zytokin in der Fibrose und kann ebenfalls verstärkt in fibrotisch verändertem Gewebe nachgewiesen werden [116, 117]. Seine Expression ist hierbei abhängig vom TGF-beta/Smad3-Signalweg [48, 118, 119]. CTGF kann als „Downstream-Mediator“ von TGF-beta angesehen werden [12]. Dabei scheint das Zusammenwirken von TGF-beta und CTGF für die Entwicklung einer persistierenden Fibrose erforderlich zu sein [116, 118].

Eine selektive Inhibierung von TGF-beta und/oder CTGF kann die Fibrose um alloplastische Materialien hemmen [14]. Die Inhibition von CTGF scheint neben der von TGF-beta1 ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Biokompatibilität zu sein.

4.1.6 Matrix-Metalloproteinasen in der Kapselfibrose

Ulrich et al. zeigten in ihren Versuchen, dass die MMP-2-Expression bei der humanen Kapselkontraktur signifikant erhöht ist [78, 120]. MMP-2 nimmt dabei auf unterschiedliche Art und Weise Einfluss auf die Kapselentstehung.

Zum einen ist MMP-2 in der Lage, den TGF-beta-Signalweg positiv zu beeinflussen. Über die Spaltung von Decorin wird TGF-beta1 extrazellulär in seinen aktiven Zustand überführt [121]. MMP-2 aktiviert nun Decorin und somit TGF-beta, welches anschließend die Fibrose unterhält.

Des Weiteren fördern MMPs den enzymatischen Abbau der EZM. Die Kollagenabbauende Eigenschaft spiegelt den erhöhten Bindegewebsumsatz wieder, denn

neben einer Erhöhung der MMPs ist auch eine gesteigerte Synthese der MMP-hemmenden Proteine (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) nachweisbar [78, 120, 122]. Dabei ist die Expressionssteigerung für TIMPs stärker als für MMPs. Aus diesem Grund überwiegt der hemmende Effekt der TIMPs auf die MMPs, weswegen es zu einer absoluten Mehrablagerung an Bindegewebe kommt [78, 120, 122].

Ein weiterer Effekt beruht auf dem angiogenetischen Effekt von MMP-2, einem zentralen Induktor der Angiogenese [123]. Bei der Kapsel­fibrose ist die Versorgung des neu entstandenen Gewebes durch Anschluss an den Blutkreislauf eine wesentliche Voraussetzung für die Abkapselung. MMP-2 spaltet die Basalmembran und ermöglicht die Aussprossung neuer Gefäße [123]. Halofuginon unterbindet die Angiogenese über die MMP-2-Hemmung [76].

4.2 Halofuginon freisetzende Silikonoberfläche und der Einfluss auf die Kapsel­fibrose

Das pathologische Resultat einer Kapsel­fibrose ist eine Barriere gebildet aus Kollagenfasern, Fibroblasten, Myofibroblasten, Makrophagen und weiteren inflammatorischen Komponenten. Ein Großteil dieser Komponenten kann durch Halofuginon inhibiert werden.

4.2.1 Wirkung von Halofuginon auf Kollagen

Verschiedene Studien konnten durch systemische Halofuginon-Applikation eine inhibierende Wirkung auf Kollagen-Typ-I [60, 124] und Kollagen-Typ-III nachweisen [125]. Diese Kollagentypen stellen mengenmäßig den größten Anteil an der Fibrose [126]. Die hier durchgeführten Versuche demonstrieren eine deutliche Reduzierung der Kollagen-Typ-I und -III Ablagerung. Dies belegt den antifibrotischen Effekt von Halofuginon, der hiermit auch lokal durch freisetzende Silikonoberflächen erreicht werden kann. Eine verminderte Kollagendichte um die Implantate kann die Integration verbessern [127].

4.2.2 Wirkung von Halofuginon auf Fibroblasten

Dass Halofuginon im Ergebnis die Ablagerung der Kollagenfasern vermindert, hat mehrere Gründe. So wirkt Halofuginon antiproliferativ auf Fibroblasten [128], was unsere Beobachtungen einer verminderten Präsenz von Fibroblasten in der Halofuginon-Gruppe bestätigen. Darüber hinaus hemmt Halofuginon die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten, die intensiv Prokollagen produzieren und sich kontrahieren, werden somit gehemmt [97, 129]. Halofuginon beeinflusst den für die Kapselkontraktur entscheidenden Prozess der Kollagenablagerung [4, 44, 130].

4.2.3 Wirkung von Halofuginon auf Makrophagen

Halofuginon freisetzende Implantate vermindern die Anzahl aktivierter Makrophagen im periprotetischen Gewebe. Diese Beobachtung geht einher mit der verminderten Ablagerung extrazellulärer Matrix und der Anzahl der Fibroblasten. Die Auswertung der beschriebenen Zytokine gibt einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von Halofuginon auf Makrophagen, welcher bisher noch nicht genauer untersucht wurde. [31] Es ist belegt, dass eine Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Fibroblasten durch PDGF und TGF-beta1 verursacht wird [102]. Die autokrine Wirkung von TGF-beta1 stimuliert die kontinuierliche TGF-beta Freisetzung durch Makrophagen und die Produktion extrazellulärer Matrix durch angrenzende Fibroblasten [102-104]. Die Beobachtung, dass weniger TGF-beta1 m-RNA um die Halofuginon freisetzenden Implantate zu finden war, deutet auf eine Unterbrechung des Fibrose-Kreislaufs hin. Dass dieser Effekt auch durch die Inhibierung des PDGF-Signalwegs (profibrotisch) zustande gekommen ist, scheint anhand der hier beschriebenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich [98]. Wichtiger ist die Erkenntnis, dass Halofuginon auch CTGF inhibiert. Es steht in engem Zusammenhang mit dem TGF-beta1-Signalweg [48, 118] und hat ebenfalls eine profibrotische Wirkung [116, 117]. Die Veränderung der Implantate hin zu einer hydrophilen Oberfläche durch den Beschichtungsprozess wäre ebenfalls eine mögliche Ursache für die verminderte Anlagerung aktivierter Makrophagen [31]. Dass diese Veränderung während der Modifizierung nicht eingetreten ist, konnte durch die Kontaktwinkelmessung

festgestellt werden. Die suffiziente Freisetzung von Halofuginon führt zu einer Hemmung der Makrophagen.

4.2.4 Halofuginon und TGF-beta

[43, 44, 48, 70, 72] Shah et al. konnten zeigen, dass die TGF-beta1- und TGF-beta2-Inhibierung im Versuchsmodell die Entwicklung einer hypertrophen Narbe oder eines Keloids hemmt [131, 132]. Die spezifische Hemmung von TGF-beta1 durch lokal freigesetzte Antikörper kann eine Fibrose um alloplastische Materialien verhindern [37].

Die Folge der Inhibierung des TGF-beta/Smad-Signalwegs durch eine Halofuginon freisetzende Silikonoberfläche ist eine signifikante Verminderung der Kapselfibrose. Bei dieser schwächer ausgeprägten Kapsel kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Abnahme der Fibroblasten, Makrophagen, Kollagenfasern und weiterer für die Fibrose entscheidender Zytokine und Proteine. Die Inhibition von Kollagen wurde bereits zu Beginn der experimentellen Auseinandersetzung mit Halofuginon von Granot et al. beschrieben [60]. Halofuginon erzielt diesen Effekt durch eine Inaktivierung von Smad2 und Smad3, eine Verminderung der TGF-beta-Typ-II-Rezeptoren und des TGF-beta-Liganden sowie der Induktion des I-Smads (Smad7) [48, 69, 73, 74]. Smad3 ist hierbei entscheidend für die Fibroseentwicklung [48, 57] und wird besonders effektiv durch Halofuginon gehemmt [72, 74]. Alle genannten Schritte hemmen die intrazelluläre Signaltransduktion von TGF-beta.

Die beobachtete Abnahme von TGF-beta1 scheint die Wechselwirkung zwischen Makrophagen, Fibroblasten bzw. Myofibroblasten einzuschränken und so die Fibrose zu bremsen [103, 104]. Die zusätzliche Abnahme von CTGF scheint diesen Effekt zu verstärken [14, 82, 116].

In der hier vorliegenden Studie konnte im perikapsulären Gewebe eine Verminderung von TGF-beta1, nicht aber von TGF-beta2 und TGF-beta3 beobachtet werden. Die fibrotische Eigenschaft von TGF-beta2 wird im Vergleich zu TGF-beta1 als schwächer eingeschätzt [131, 132]. TGF-beta3 hat einen antifibrotischen Effekt und ist Grund für die fetale narbenfreie Wundheilung [12]. Die Hemmung von TGF-beta1, TGF-beta2 und PDGF, verbunden mit der Induktion von TGF-beta3, kann

auch beim Erwachsenen die Narbenbildung verhindern [108]. Die Expressionsaktivität von TGF-beta2 und TGF-beta3 blieb in diesem Versuch unbeeinflusst durch Halofuginon. Dementsprechend scheint Halofuginon seine antifibrotische Wirkung nicht durch eine Herunterregulierung von TGF-beta2 oder Hochregulierung von TGF-beta3 zu erreichen, sondern einzig durch Hemmung von TGF-beta1.

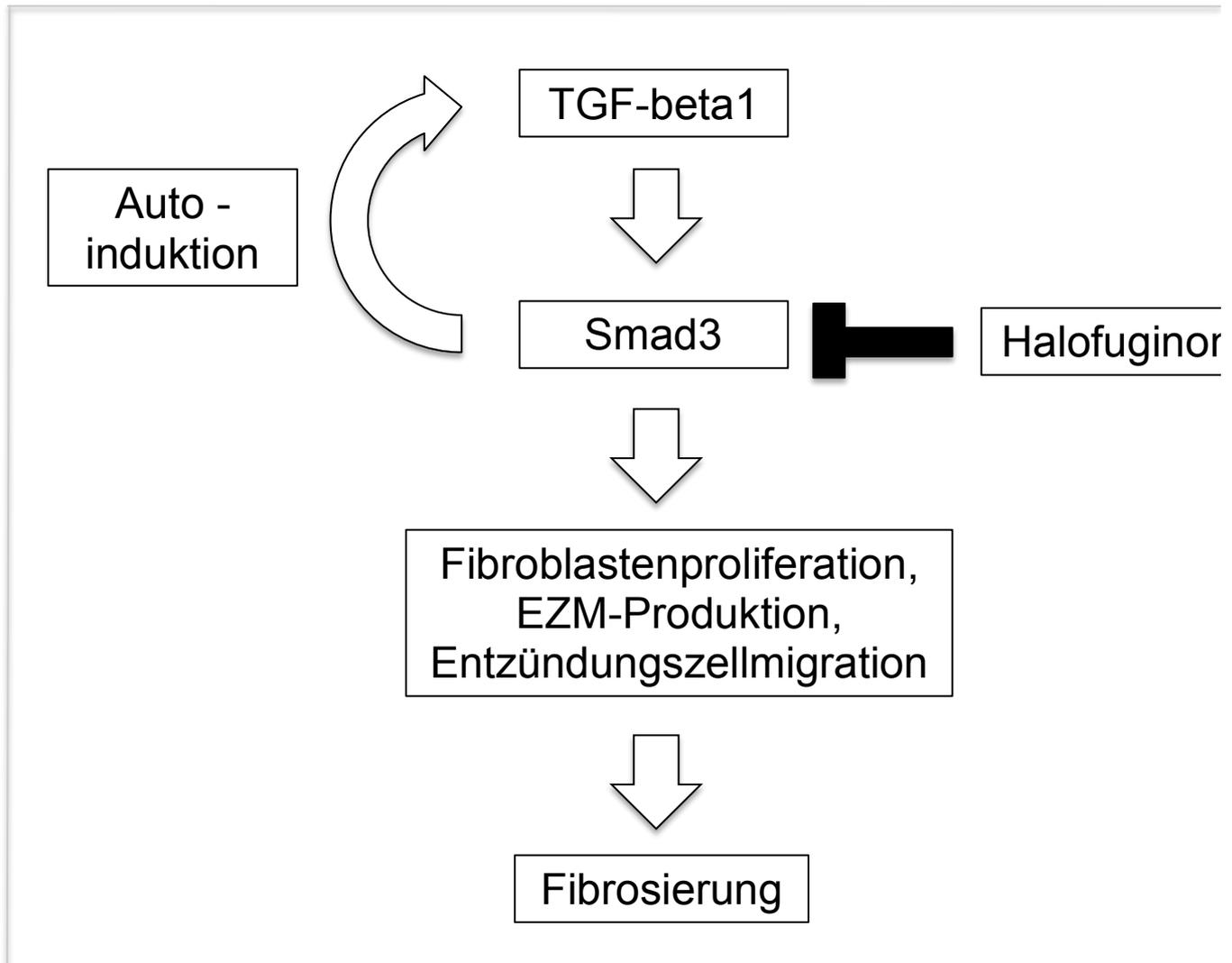


Abb. 4.1 TGF-beta1 kann seine eigene Expression positiv beeinflussen. Diese Autoinduktion wird unter anderem über den intrazellulären Signaltransduktor Smad3 gesteuert. Somit unterhält TGF-beta1 seine Wirkung während der Fibrose [103, 104]. Halofuginon hemmt die Phosphorylierung von Smad3 und unterbricht somit die autokrine Stimulierung. Die Folge ist eine verminderte TGF-beta1-Expression und eine schwächere Fibrose.

4.2.5 Lokale MMP-2-Inhibition

Die Expression von MMP-2 war in dieser Studie um die Halofuginon freisetzenden Implantate signifikant vermindert. Bei der Expression von MMP-9 konnte kein Unterschied festgestellt werden [78, 120]. Die Tatsache, dass MMP-2 in der hier vorliegenden Studie vermindert ist, kann in Zusammenhang mit der schwächeren Kapselfibrose gebracht werden [78, 120]. Dies geschieht durch die verminderte Aktivierung von TGF-beta1, einen erhöhten Umsatz der EZM und eine Hemmung der Angiogenese [134].

Dass die Expression von MMP-2 durch Halofuginon vermindert wird, deckt sich mit den Beobachtungen von Elkin et al. [71, 75]. Eine Abnahme der MMP-2-Expression um die Hälfte konnte dabei in Blasenkarzinomzellen erreicht werden [75]. Tara et al. beschreiben auch eine Expressionsminderung von MMP-9 durch die Halofuginon-Behandlung [76]. Diese Beobachtung konnte nicht nachvollzogen werden. Dass der MMP-9-inhibierende Effekt aber auch mit Halofuginon freisetzenden Silikonoberflächen prinzipiell möglich ist, konnte Zeplin in einem Modell der Nacktmaus mit konstanter Applikation und somit höherer Konzentration belegen [135].

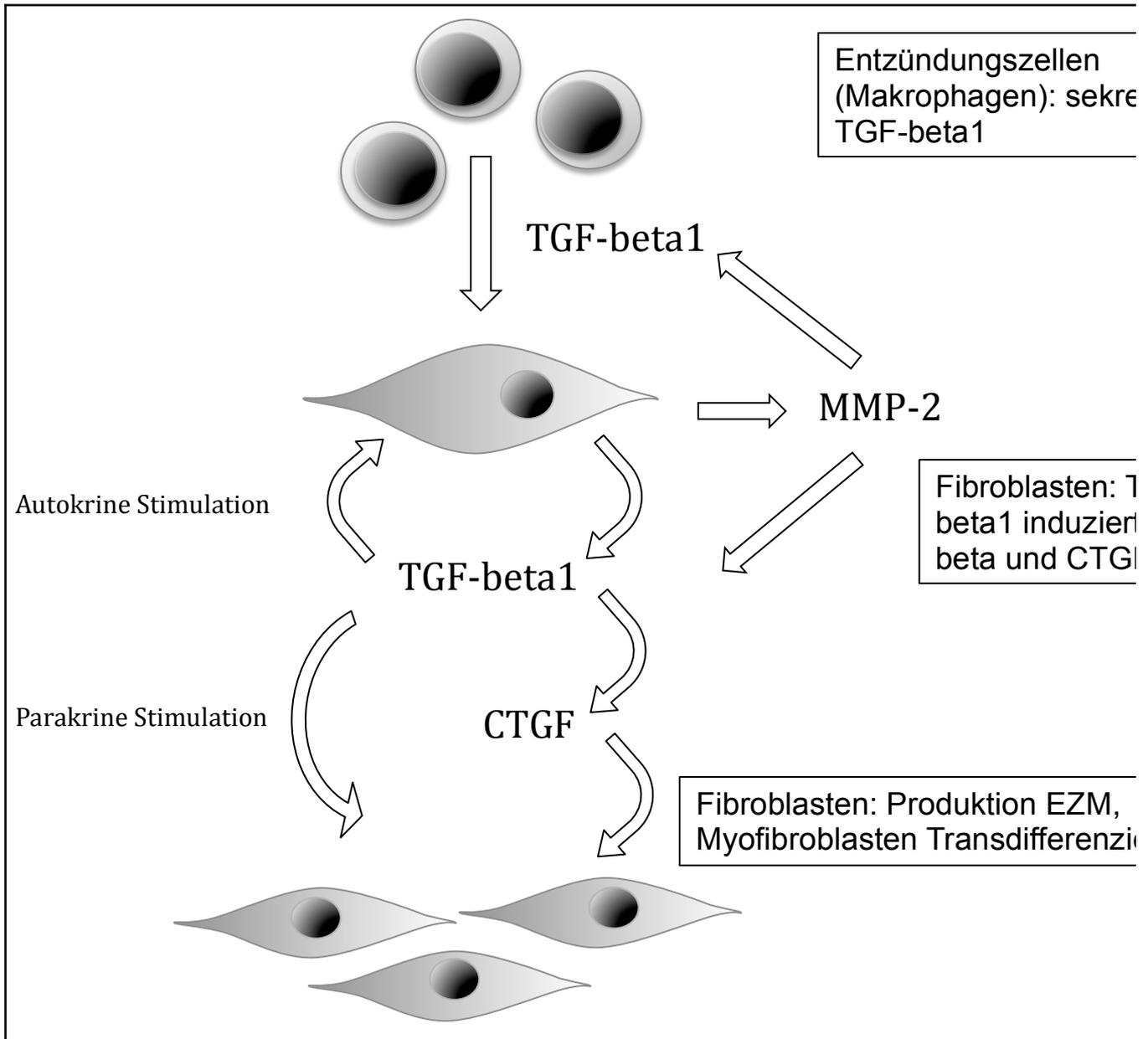


Abb. 4.2 Makrophagen und Fibroblasten haben eine zentrale Rolle im fibrotischen Prozess und führen zur Ablagerung von EZM. Die Aktivierung der Fibroblasten durch Makrophagen erfolgt dabei durch TGF-beta1. TGF-beta1 übt eine autokrine und parakrine Stimulation auf die umliegenden Fibroblasten und initiiert die Bildung von Kollagenfasern sowie die Transdifferenzierung hin zu Myofibroblasten. CTGF ist ein Downstream-Mediator von TGF-beta1 und ist an der Fibroseentstehung beteiligt. MMP-2 überführt TGF-beta1 in seine aktive Form. Halofuginon hemmt TGF-beta1, CTGF und MMP-2 und durchbricht damit den fibrotischen Prozess.

4.3 Bisherige Beeinflussung der Kapsel­fibrose im Kontext mit der vorliegenden Studie

Ruiz-de-Erenchun et al. zeigten in einem Tierversuch, dass mit einem TGF-beta-Antikörper die lokale Fibrose um Implantate vermindert werden kann. Dafür beschichteten sie Implantate mit einem TGF-beta-Inhibitor und untersuchten sie im Rattenmodell. Die dabei verwendete Substanz leitet sich vom Typ-III-Rezeptor für TGF-beta1 ab und kann dieses extrazellulär abfangen [37]. Die Ergebnisse bestätigen die zentrale Rolle von TGF-beta1 in der Fibrose. Aufgrund seiner zell- und organspezifischen Rolle führt TGF-beta1 aber nicht nur zur Fibrose, sondern hat auch regulatorische Aufgaben in anderen Bereichen. Durch die vielseitige Wirkung von TGF-beta1 ist eine unspezifische Inhibierung wahrscheinlich mit unerwünschten Wirkungen auf andere Zellen verbunden. Im Gegensatz zum Abfangen des TGF-beta-Liganden durch einen Antikörper erfolgt bei Halofuginon die Beeinflussung spezifisch über die Smad-Signalkaskade während der intrazellulären Signaltransduktion. Hierbei wird das für die Fibrose wichtige Smad3 selektiv gehemmt. Nebenwirkungen sind weniger wahrscheinlich.

Dosisabhängig ist die systemische Halofuginon-Applikation mit gastrointestinalen Nebenwirkungen verbunden [136]. Übelkeit und Schwindel können bei höheren Dosen zur Behandlung solider Tumoren mit Antiemetika kontrolliert werden [137]. Ein kausaler Zusammenhang mit Blutungen bei sehr hohen Dosen konnte bisher nicht ausgeschlossen werden [137]. Diese Erkenntnisse offenbaren potenzielle Probleme, die sich aus der Studie von Olbrich et al. ergeben könnten. Olbrich et al. zeigten 2005, dass die systemische Behandlung mit Halofuginon zu einer verminderten Kollagenablagerung um Implantate führt. In diesem Versuch erhielten Sprague-Dawley-Ratten ein subkutanes reguläres Implantat und die Therapiegruppe erhielt während der achtwöchigen Untersuchung um Halofuginon ergänztes Pressfutter. Die Kollagenablagerung in der Kapsel um das Implantat war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verringert [130]. Auch wenn in dieser Studie keine unerwünschten Nebenwirkungen genannt werden, so ist doch die systemische Verabreichung von Halofuginon vermutlich risikoreicher als die lokale Applikation [136, 137]. Der von Olbrich et al. beschriebene Effekt kann auch durch eine lokale Freisetzung von Halofuginon erreicht werden. Halofuginon freisetzende Silikonoberflächen sind hinsichtlich potenzieller Nebenwirkungen zu bevorzugen.

Zimman et al. konnten die Kollagenablagerung auch mit einem angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE-I, Enalapril) beeinflussen. Die orale Therapie mit einem ACE-I ergab im Kapselgewebe eine Verminderung von Kollagen und TGF-beta1. Daraus schließen Zimman et al., dass die orale Verabreichung von Enalapril eine Reduzierung der Gewebefibrose bewirkt. Ihrer Hypothese zufolge kann die Präsenz von Angiotensin II bei einer Gewebsschädigung den fibrotischen Prozess, gesteuert durch TGF-beta1, verstärken [41]. Ein rein lokaler Effekt konnte hiermit noch nicht erreicht werden.

Spano et al. versuchten durch eine Beeinflussung der Entzündungsreaktion die Kapselbildung zu inhibieren. Sie behandelten Implantat tragende Ratten während der Versuchsdauer mit Zafiruklast, einem Leukotrien-Antagonisten. Bei den Tieren der Versuchsgruppe konnte eine geringere Kapseldicke nachgewiesen werden. Grund für dieses Experiment war die Arbeit von D'Andrea et al., welche die starke Expression von Cysteinyl-Leukotriene-Rezeptoren in humanem Kapselkontrakturgewebe aufgezeigt hatten [138, 139]. Die antiphlogistische Wirkung des Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten konnte somit die Kapselfibrose abschwächen [40]. Damit zeigte sich eine erfolgreiche direkte Beeinflussung der Entzündungsreaktion, nicht aber der Fibroblasten. Die hier durchgeführte Studie mit Halofuginon hemmt sowohl die Entzündungsreaktion als auch die Fibroblasten direkt.

Weitere Studien zur Reduzierung der Kapselbildung wurden mit Natrium 2-mercaptoethanesulfonate (Mesna) [140], Kortison [141] und α -tocopherol (Vitamin E) [142] durchgeführt. Ein geringer Effekt konnte meist nachgewiesen werden, wobei ein Vergleich der Studien durch Unterschiede in Design und Methodik nur begrenzt möglich ist. Eine klinisch anwendbare Modifizierung erfolgte hieraus bisher nicht.

Die systemische Verabreichung eines Wirkstoffs kann postoperativ für einen umschriebenen Zeitraum sinnvoll sein, wenn Evidenz für eine bessere Integration in das umliegende Gewebe vorliegt. Eine dauerhafte Therapie ist unter Berücksichtigung der Brustrekonstruktion als nicht lebensnotwendigem Eingriff tendenziell eher nicht zu vertreten. Auch bei der Modifikation einer Implantatoberfläche mit der lokalen Freisetzung eines Wirkstoffs können unerwünschte Wirkungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Wirkung

scheint aber durch die niedrige Dosis einen geringeren systemischen Einfluss zu haben und von der Dauer her begrenzt zu sein. Der gebundene Wirkstoff sowie dessen Metaboliten müssen in toxikologischen Versuchsreihen immer wieder auf ihre Unbedenklichkeit hin untersucht werden. Aus diesem Grund wird die lokale Anwendung favorisiert.

4.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit belegt erstmalig eine Verbesserung der Biokompatibilität von Silikonimplantaten durch Bindung des Wirkstoffs Halofuginon an deren Oberfläche. Die H_0 -Hypothese kann zugunsten der H_1 -Hypothese verworfen werden. Der antifibrotische Effekt von Halofuginon nach systemischer Applikation ist anhand zahlreicher Studien belegt [72, 74, 124]. Hinzu kommt nun der Nachweis einer lokalen Wirksamkeit durch die Freisetzung aus einer biotechnologisch modifizierten Materialoberfläche.

Die Ergebnisse demonstrieren die erfolgreiche Bindung an die Implantate sowie eine signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion und der periprothetischen Bindegewebsablagerung [31]. Das gebundene Halofuginon ist wasserlöslich und vermindert nach Implantation die Expression von TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, MMP-2 und CTGF als auch die Proliferation und Migration von CD68-positive Makrophagen und Fibroblasten. Somit wird die Fibrose um die alloplastischen Fremdkörper signifikant abgeschwächt. Auf eine systemische Anwendung könnte somit verzichtet werden, da Nebenwirkungen bei lokaler Freisetzung bisher nicht beschrieben wurden.

Dennoch bleibt kritisch anzumerken, dass Nebenwirkungen auch bei lokaler Freisetzung durchaus möglich sind und in unserem Versuchsmodell nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Über die Wirkdauer gibt die Studie ebenfalls nur begrenzt Auskunft. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass Halofuginon trotz niedriger Dosierung und nach ausschließlich lokaler Applikation auch nach drei Monaten noch wirksam zu sein scheint. Ob diese Wirkung auch über die Dauer von drei Monaten hinaus anhält und ob dieser Effekt tatsächlich die *frühe* Kapselkontraktur verhindern kann, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Zusammenfassung:

Silikonprodukte werden erfolgreich im klinischen Alltag eingesetzt und haben sich in vielen Bereichen der Medizin als nützlich erwiesen. Trotz guter Biokompatibilität ist die Verwendung von medizinischen Materialien aus Silikon, besonders bei der dauerhaften Integration in den Körper, mit Komplikationen verbunden. Die Brustrekonstruktion mit Silikonimplantaten ist ein Beispiel für den langfristigen Gewebeersatz mit einem Fremdmaterial. Der Organismus erkennt dabei das synthetische Polymer und reagiert mit einer fibrösen Abkapselung. Dabei handelt es sich um eine physiologische Entzündungsreaktion mit Abgrenzung des Implantats durch Bestandteile der extrazellulären Matrix. Durch bisher nicht vollständig geklärte pathophysiologische Abläufe kann es jedoch zu einer verstärkten Ausprägung dieser Kapselfibrose kommen, was mit Schmerzen und einer Deformierung sowie Zerstörung des Implantats einhergehen kann. Als Konsequenz einer voll ausgeprägten Kapselfibrose, der sogenannten Kapselkontraktur, bleibt dann meist nur eine operative Revision.

Das Ziel dieser Arbeit war die Modifizierung herkömmlicher Silikonimplantate, um die Biokompatibilität zu verbessern und die übermäßige Ausbildung einer periprothetischen Kapsel als häufigste revisionsbedürftige Komplikation zu vermeiden. Dafür wurde der antifibrotische Wirkstoff Halofuginon in einem nasschemischen Beschichtungsprozess auf eine Silikonoberfläche gebunden und die Implantate in einem Tiermodell der Ratte untersucht. Es zeigte sich, dass Halofuginon den TGF-beta1-Signalweg durch Beeinflussung der intrazellulären Smad-Signalkaskade hemmt, wodurch es unter anderem zu einer spezifischen Hemmung der Kollagen-Typ-I-Expression kommt.

Histologische, immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen nach einer Implantationsdauer von drei Monaten zeigten, dass eine Halofuginonbeschichtung die Kollagendichte, die Kapseldicke und die Anzahl an Fibroblasten und Entzündungszellen im Kapselgewebe vermindert. Zusätzlich konnten weniger TGF-beta- und CD68-positive Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR zeigten

übereinstimmend eine erniedrigte Expression für TGF-beta1, Kollagen-Typ-I, CTGF und CD68 und bestätigten die immunhistologische Auswertung. Darüber hinaus konnte eine verminderte Expression des MMP-2-Gens nachgewiesen werden, welches für die Steuerung der EZM-Ablagerung mitverantwortlich ist.

Es kann belegt werden, dass eine Halofuginon freisetzende Silikonhybridoberfläche effektiv und spezifisch die pathologische periprothetische Kapselbildung hemmt. Es sind jedoch weitere in-vivo-Studien zur Überprüfung der Nachhaltigkeit und der Pharmakodynamik erforderlich, um die gewonnenen Erkenntnisse als Schritt in der Verbesserung der Biokompatibilität von Silikonimplantaten nutzen zu können.

Literaturverzeichnis:

1. Handel, N., et al., *The fate of breast implants: a critical analysis of complications and outcomes*. *Plast Reconstr Surg*, 1995. 96(7): p. 1521-33.
2. Alfano, C., M. Mazzocchi, and N. Scuderi, *Mammary compliance: an objective measurement of capsular contracture*. *Aesthetic Plast Surg*, 2004. 28(2): p. 75-9.
3. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. *Semin Immunol*, 2008. 20(2): p. 86-100.
4. Hwang, K., et al., *Myofibroblasts and capsular tissue tension in breast capsular contracture*. *Aesthetic Plast Surg*, 2010. 34(6): p. 716-21.
5. Kamel, M., et al., *The peri-implant breast capsule: an immunophenotypic study of capsules taken at explantation surgery*. *J Biomed Mater Res*, 2001. 58(1): p. 88-96.
6. Siggelkow, W., et al., *Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture*. *Biomaterials*, 2003. 24(6): p. 1101-9.
7. Heden, P., et al., *Long-term safety and effectiveness of style 410 highly cohesive silicone breast implants*. *Aesthetic Plast Surg*, 2009. 33(3): p. 430-6; discussion 437-8.
8. Spear, S.L. and J.L. Baker, Jr., *Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction*. *Plast Reconstr Surg*, 1995. 96(5): p. 1119-23; discussion 1124.
9. Baker, J., *Augmentation mammoplasty*. In J. W. Owsley, Jr. (Ed.), 1975(Symposium on Aesthetic Surgery of the Breast: Proceeding of the Syposium of the Educational Foundation of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, and the American Society for Aesthetic Plastic Surgery, in Scottsdale, Ariz. November 23-26, 1975, St. Louis, Mo.: Mosby, 1978. Pp. 256-263).
10. Rodriguez, A., et al., *T cell subset distributions following primary and secondary implantation at subcutaneous biomaterial implant sites*. *J Biomed Mater Res A*, 2008. 85(2): p. 556-65.
11. Tan, K.T., et al., *Tumour necrosis factor-alpha expression is associated with increased severity of periprosthetic breast capsular contracture*. *Eur Surg Res*, 2010. 45(3-4): p. 327-32.
12. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2008. 16(5): p. 585-601.
13. Kuhn, A., et al., *Periprosthetic breast capsules contain the fibrogenic cytokines TGF-beta1 and TGF-beta2, suggesting possible new treatment approaches*. *Ann Plast Surg*, 2000. 44(4): p. 387-91.
14. Mazaheri, M.K., et al., *Role of connective tissue growth factor in breast implant elastomer capsular formation*. *Ann Plast Surg*, 2003. 50(3): p. 263-8; discussion 268.
15. Cronin TD, G.F., *Augmentation mammoplasty: a new "natural feel" prosthesis*. *Transactions of the Third International Congress of Plastic and Reconstructive Surgons*. 1963: p. 41-49.

16. Handel, N., et al., *A long-term study of outcomes, complications, and patient satisfaction with breast implants*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(3): p. 757-67; discussion 768-72.
17. Handel, N. and J. Gutierrez, *Long-term safety and efficacy of polyurethane foam-covered breast implants*. *Aesthet Surg J*, 2006. 26(3): p. 265-74.
18. Spear, S.L., et al., *Inamed silicone breast implant core study results at 6 years*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 120(7 Suppl 1): p. 8S-16S; discussion 17S-18S.
19. Cunningham, B., *The Mentor Core Study on Silicone MemoryGel Breast Implants*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 120(7 Suppl 1): p. 19S-29S; discussion 30S-32S.
20. Hakelius, L. and L. Ohlsen, *Tendency to capsular contracture around smooth and textured gel-filled silicone mammary implants: a five-year follow-up*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. 100(6): p. 1566-9.
21. Henriksen, T.F., et al., *Incidence and severity of short-term complications after breast augmentation: results from a nationwide breast implant registry*. *Ann Plast Surg*, 2003. 51(6): p. 531-9.
22. McGrath, M.H. and B.R. Burkhardt, *The safety and efficacy of breast implants for augmentation mammoplasty*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. 74(4): p. 550-60.
23. Pittet, B., D. Montandon, and D. Pittet, *Infection in breast implants*. *Lancet Infect Dis*, 2005. 5(2): p. 94-106.
24. Schreml, S., et al., *Bacterial colonization is of major relevance for high-grade capsular contracture after augmentation mammoplasty*. *Ann Plast Surg*, 2007. 59(2): p. 126-30.
25. Dobke, M.K., et al., *Characterization of microbial presence at the surface of silicone mammary implants*. *Ann Plast Surg*, 1995. 34(6): p. 563-9; discussion 570-1.
26. Collis, N., et al., *Ten-year review of a prospective randomized controlled trial of textured versus smooth subglandular silicone gel breast implants*. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 106(4): p. 786-91.
27. Vazquez, G. and A. Pellon, *Polyurethane-coated silicone gel breast implants used for 18 years*. *Aesthetic Plast Surg*, 2007. 31(4): p. 330-6.
28. Wong, C.H., et al., *Capsular contracture in subglandular breast augmentation with textured versus smooth breast implants: a systematic review*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 118(5): p. 1224-36.
29. Barnsley, G.P., L.J. Sigurdson, and S.E. Barnsley, *Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(7): p. 2182-90.
30. Tavazzani, F., et al., *In vitro interaction between silicone gel and human monocyte-macrophages*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. 72(2): p. 161-7.
31. Zeplin, P.H., et al., *Phosphorylcholine-coated silicone implants: effect on inflammatory response and fibrous capsule formation*. *Ann Plast Surg*, 2010. 65(6): p. 560-4.
32. Wintermantel E., S.-W.H., *Medizintechnik: Life Science Engineering. Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business*. Vol. 5. 2009: Springer. 2570.
33. Habal, M.B., *The biologic basis for the clinical application of the silicones. A correlate to their biocompatibility*. *Arch Surg*, 1984. 119(7): p. 843-8.

34. Feldner, K., *Chemie und Technologie der Direktsynthese*. Silicone Chemie und Technologie, Koerner, G.; Schulze, M.; Weis, J. Vulkan-Verlag, Essen, 1989: p. S. 9-22.
35. Brodbeck, W.G., et al., *Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro*. Cytokine, 2002. 18(6): p. 311-9.
36. Amon, M., et al., *In vivo study of cell reactions on poly(methyl methacrylate) intraocular lenses with different surface properties*. J Cataract Refract Surg, 1996. 22 Suppl 1: p. 825-9.
37. Ruiz-de-Erenchun, R., J. Dotor de las Herrerias, and B. Hontanilla, *Use of the transforming growth factor-beta1 inhibitor peptide in periprosthetic capsular fibrosis: experimental model with tetraglycerol dipalmitate*. Plast Reconstr Surg, 2005. 116(5): p. 1370-8.
38. Bassetto, F., et al., *Histological Features of Periprosthetic Mammary Capsules: Silicone vs. Polyurethane*. Aesthetic Plast Surg, 2010.
39. Gancedo, M., et al., *Pirfenidone prevents capsular contracture after mammary implantation*. Aesthetic Plast Surg, 2008. 32(1): p. 32-40.
40. Spano, A., et al., *Reduction of capsular thickness around silicone breast implants by zafirlukast in rats*. Eur Surg Res, 2008. 41(1): p. 8-14.
41. Zimman, O.A., et al., *The effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors on the fibrous envelope around mammary implants*. Plast Reconstr Surg, 2007. 120(7): p. 2025-33.
42. Sepai, O., et al., *Exposure to toluenediamines from polyurethane-covered breast implants*. Toxicol Lett, 1995. 77(1-3): p. 371-8.
43. Jagadeesan, J. and A. Bayat, *Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease*. Int J Surg, 2007. 5(4): p. 278-85.
44. Bruck, R., et al., *Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats*. Hepatology, 2001. 33(2): p. 379-86.
45. Kenneth Ward, W., *A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: the role of macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis*. J Diabetes Sci Technol, 2008. 2(5): p. 768-77.
46. Okuda, S., et al., *Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix*. J Clin Invest, 1990. 86(2): p. 453-62.
47. Border, W.A. and N.A. Noble, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. N Engl J Med, 1994. 331(19): p. 1286-92.
48. Flanders, K.C., *Smad3 as a mediator of the fibrotic response*. Int J Exp Pathol, 2004. 85(2): p. 47-64.
49. Klass, B.R., A.O. Grobbelaar, and K.J. Rolfe, *Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance*. Postgrad Med J, 2009. 85(999): p. 9-14.
50. Lin, X., et al., *PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling*. Cell, 2006. 125(5): p. 915-28.
51. Park, S.H., *Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads*. J Biochem Mol Biol, 2005. 38(1): p. 9-16.
52. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. 113(6): p. 685-700.
53. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Non-Smad TGF-beta signals*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 16): p. 3573-84.

54. Hayashida, T., et al., *TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression*. *Kidney Int*, 1999. 56(5): p. 1710-20.
55. Sato, M., et al., *Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts*. *J Invest Dermatol*, 2002. 118(4): p. 704-11.
56. Verrecchia, F., M.L. Chu, and A. Mauviel, *Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach*. *J Biol Chem*, 2001. 276(20): p. 17058-62.
57. Flanders, K.C., et al., *Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation*. *Am J Pathol*, 2002. 160(3): p. 1057-68.
58. Angel S., W.Z.G., Polishuk O., Heit M., Plavnik I. and Batrov I., *A connection between a dietary coccidiostat and skin tears of female broiler chicken*. *Poult Sci*, 1985. 65: p. 294 - 296.
59. Christensen, K.D., et al., *Dietary and environmental factors affecting skin strength in broiler chickens*. *Poult Sci*, 1994. 73(2): p. 224-35.
60. Granot, I., et al., *Halofuginone: an inhibitor of collagen type I synthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1156(2): p. 107-12.
61. Halevy, O., et al., *Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scleroderma patients: effect of halofuginone*. *Biochem Pharmacol*, 1996. 52(7): p. 1057-63.
62. McGaha, T., et al., *Effect of halofuginone on the development of tight skin (TSK) syndrome*. *Autoimmunity*, 2002. 35(4): p. 277-82.
63. Arbell, D., et al., *Prevention of esophageal strictures in a caustic burn model using halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis*. *Laryngoscope*, 2005. 115(9): p. 1632-5.
64. Krane, L.S., et al., *Halofuginone-coated urethral catheters prevent periurethral spongiofibrosis in a rat model of urethral injury*. *J Endourol*, 2011. 25(1): p. 107-12.
65. Dabak, H., et al., *The effects of methylprednisolone and halofuginone on preventing esophageal and hypopharyngeal fibrosis in delivered radiotherapy*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010. 267(9): p. 1429-35.
66. Washburn, S., J.L. Jennell, and S.J. Hodges, *Halofuginone- and chitosan-coated amnion membranes demonstrate improved abdominal adhesion prevention*. *ScientificWorldJournal*, 2010. 10: p. 2362-6.
67. Eliashar, R., et al., *Halofuginone prevents subglottic stenosis in a canine model*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2006. 115(5): p. 382-6.
68. Nagler, A., et al., *Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(4 Pt 1): p. 1082-6.
69. Roffe, S., et al., *Halofuginone inhibits Smad3 phosphorylation via the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways in muscle cells: effect on myotube fusion*. *Exp Cell Res*, 2010. 316(6): p. 1061-9.
70. Gnainsky, Y., et al., *Gene expression during chemically induced liver fibrosis: effect of halofuginone on TGF-beta signaling*. *Cell Tissue Res*, 2007. 328(1): p. 153-66.
71. Elkin, M., et al., *Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression*. *FASEB J*, 2000. 14(15): p. 2477-85.
72. Xavier, S., et al., *Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone*. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): p. 15167-76.

73. Yee, K.O., et al., *Halofuginone inhibits tumor growth in the polyoma middle T antigen mouse via a thrombospondin-1 independent mechanism*. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(2): p. 218-24.
74. Ishii, H., et al., *Halofuginone mediated protection against radiation-induced leg contracture*. *Int J Oncol*, 2009. 35(2): p. 315-9.
75. Elkin, M., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression and bladder carcinoma metastasis by halofuginone*. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(8): p. 1982-8.
76. Taras, D., et al., *Halofuginone suppresses the lung metastasis of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats through MMP inhibition*. *Neoplasia*, 2006. 8(4): p. 312-8.
77. Du, X., et al., *Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy*. *Lab Invest*, 2012.
78. Ulrich, D., et al., *Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, aminoterminal propeptide of procollagen type III, and hyaluronan in sera and tissue of patients with capsular contracture after augmentation with Trilucent breast implants*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. 114(1): p. 229-36.
79. Igarashi, A., et al., *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair*. *Mol Biol Cell*, 1993. 4(6): p. 637-45.
80. Shimo, T., et al., *Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo*. *J Biochem*, 1999. 126(1): p. 137-45.
81. Secker, G.A., et al., *TGFbeta stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and Ras/MEK/ERK signalling*. *Exp Cell Res*, 2008. 314(1): p. 131-42.
82. Frazier, K., et al., *Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor*. *J Invest Dermatol*, 1996. 107(3): p. 404-11.
83. Cao, R., et al., *Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2*. *Nat Med*, 2003. 9(5): p. 604-13.
84. Gospodarowicz, D., et al., *Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor*. *Endocr Rev*, 1987. 8(2): p. 95-114.
85. Powers, C.J., S.W. McLeskey, and A. Wellstein, *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. 7(3): p. 165-97.
86. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
87. Berry, M.G., V. Cucchiara, and D.M. Davies, *Breast augmentation: Part II--Adverse capsular contracture*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010. 63(12): p. 2098-107.
88. Henriksen, T.F., et al., *Surgical intervention and capsular contracture after breast augmentation: a prospective study of risk factors*. *Ann Plast Surg*, 2005. 54(4): p. 343-51.
89. Burkhardt, B.R., et al., *Capsular contracture: a prospective study of the effect of local antibacterial agents*. *Plast Reconstr Surg*, 1986. 77(6): p. 919-32.
90. Poepl, N., et al., *Does the surface structure of implants have an impact on the formation of a capsular contracture?* *Aesthetic Plast Surg*, 2007. 31(2): p. 133-9.
91. Gosau, M., et al., *Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants*. *J Biomater Appl*, 2012.

92. Prantl, L., et al., *A novel antibacterial silicone implant material with short- and long-term release of copper ions*. *Plast Reconstr Surg*, 2010. 125(2): p. 78e-80e.
93. Wolfram, D., et al., *Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions*. *J Autoimmun*, 2004. 23(1): p. 81-91.
94. Iribarren, P., et al., *Activation of macrophages by silicones: phenotype and production of oxidant metabolites*. *BMC Immunol*, 2002. 3: p. 6.
95. Joseph, J., M. Mohanty, and P.V. Mohanan, *Role of immune cells and inflammatory cytokines in regulation of fibrosis around silicone expander implants*. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. 21(5): p. 1665-76.
96. Baker, J.L., Jr., M.L. Chandler, and R.R. LeVier, *Occurrence and activity of myofibroblasts in human capsular tissue surrounding mammary implants*. *Plast Reconstr Surg*, 1981. 68(6): p. 905-12.
97. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(3): p. 526-37.
98. Bonner, J.C., *Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(4): p. 255-73.
99. Joseph, J., M. Mohanty, and P.V. Mohanan, *Investigative study of myofibroblasts and cytokines in peri-implant tissue of silicone breast expander by rt-PCR in a rat model*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010. 21(10): p. 1389-402.
100. Flanders, K.C., et al., *Interference with transforming growth factor-beta/Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin*. *Am J Pathol*, 2003. 163(6): p. 2247-57.
101. Piscatelli, S.J., et al., *Breast capsule contracture: is fibroblast activity associated with severity?* *Aesthetic Plast Surg*, 1994. 18(1): p. 75-9.
102. Wynn, T.A. and L. Barron, *Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis*. *Semin Liver Dis*, 2010. 30(3): p. 245-57.
103. Ohnishi, H., et al., *Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions*. *J Biol Chem*, 2004. 279(10): p. 8873-8.
104. Van Obberghen-Schilling, E., et al., *Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells*. *J Biol Chem*, 1988. 263(16): p. 7741-6.
105. Hernandez-Pando, R., et al., *Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells*. *Immunology*, 2000. 100(3): p. 352-8.
106. Wang, Z., et al., *Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2007. 60(11): p. 1193-9.
107. Meckmongkol, T.T., et al., *The fibronectin synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 360(4): p. 709-14.
108. Ferguson, M.W. and S. O'Kane, *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. 359(1445): p. 839-50.
109. Fujimoto, M., et al., *Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 305(4): p. 1002-7.
110. Zhao, J., et al., *Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 282(3): p. L585-93.

111. Schnabl, B., et al., *The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation*. Hepatology, 2001. 34(1): p. 89-100.
112. Tang, B., et al., [*Expression of Smads in keloid scarring*]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2009. 47(12): p. 941-3.
113. Xie, J.L., et al., *Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta1*. Dermatol Surg, 2008. 34(9): p. 1216-24; discussion 1224-5.
114. He, S., et al., *Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts*. Br J Dermatol, 2010. 162(3): p. 538-46.
115. Yano, H., et al., *Smad, but not MAPK, pathway mediates the expression of type I collagen in radiation induced fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 418(3): p. 457-63.
116. Colwell, A.S., et al., *Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation*. Plast Reconstr Surg, 2005. 116(5): p. 1387-90; discussion 1391-2.
117. Boor, P. and J. Floege, *Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. 38(7): p. 391-400.
118. Mori, T., et al., *Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model*. J Cell Physiol, 1999. 181(1): p. 153-9.
119. Chung, A.C., et al., *Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF-beta-independent Smad3 signaling*. J Am Soc Nephrol, 2010. 21(2): p. 249-60.
120. Ulrich, D., et al., *Effect of tissue inhibitors of metalloproteinases and matrix metalloproteinases on capsular formation around smooth and textured silicone gel implants*. Aesthetic Plast Surg, 2009. 33(4): p. 555-62.
121. Imai, K., et al., *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release*. Biochem J, 1997. 322 (Pt 3): p. 809-14.
122. Ulrich, D., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010. 63(6): p. 1015-21.
123. Amalinei, C., et al., *Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions*. Rom J Morphol Embryol, 2010. 51(2): p. 215-28.
124. Pines, M. and A. Nagler, *Halofuginone: a novel antifibrotic therapy*. Gen Pharmacol, 1998. 30(4): p. 445-50.
125. Huebner, K.D., et al., *Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(4): p. H1550-61.
126. Kenyon, N.J., et al., *TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice*. Thorax, 2003. 58(9): p. 772-7.
127. Moreira, M., et al., *The effect of liposome-delivered prednisolone on collagen density, myofibroblasts, and fibrous capsule thickness around silicone breast implants in rats*. Wound Repair Regen, 2010. 18(4): p. 417-25.
128. Haran, N., et al., *Inhibition of rat renal fibroblast proliferation by halofuginone*. Nephron Exp Nephrol, 2006. 104(1): p. e35-40.
129. Sheffer, Y., et al., *Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect*. Mol Cancer Ther, 2007. 6(2): p. 570-7.

130. Olbrich, K.C., et al., *Halofuginone inhibits collagen deposition in fibrous capsules around implants*. *Ann Plast Surg*, 2005. 54(3): p. 293-6;discussion 296.
131. Shah, M., D.M. Foreman, and M.W. Ferguson, *Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring*. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 3): p. 985-1002.
132. Shah, M., D.M. Foreman, and M.W. Ferguson, *Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents*. *J Cell Sci*, 1994. 107 (Pt 5): p. 1137-57.
133. Kitani, A., et al., *Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis*. *J Exp Med*, 2003. 198(8): p. 1179-88.
134. Jordan, M.C. and P.H. Zeplin, *Local inhibition of angiogenesis by halofuginone coated silicone materials*. *J Mater Sci Mater Med*, 2012.
135. Zeplin, P.H., *Reduction of burn scar formation by halofuginone-eluting silicone gel sheets: a controlled study on nude mice*. *Ann Plast Surg*, 2012. 68(3): p. 271-5.
136. Jiang, S., et al., *Antimalarial activities and therapeutic properties of febrifugine analogs*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(3): p. 1169-76.
137. de Jonge, M.J., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours*. *Eur J Cancer*, 2006. 42(12): p. 1768-74.
138. D'Andrea, F., et al., *Modification of cysteinyl leukotriene receptor expression in capsular contracture: Preliminary results*. *Ann Plast Surg*, 2007. 58(2): p. 212-4.
139. Grella, E., et al., *Modification of cysteinyl leukotriene receptors expression in capsular contracture: follow-up study and definitive results*. *Ann Plast Surg*, 2009. 63(2): p. 206-8.
140. Ajmal, N., et al., *The effectiveness of sodium 2-mercaptoethane sulfonate (mesna) in reducing capsular formation around implants in a rabbit model*. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 112(5): p. 1455-61; discussion 1462-3.
141. Lemperle, G. and K. Exner, *Effect of cortisone on capsular contracture in double-lumen breast implants: ten years' experience*. *Aesthetic Plast Surg*, 1993. 17(4): p. 317-23.
142. Baker, J.L., Jr., *The effectiveness of alpha-tocopherol (vitamin E) in reducing the incidence of spherical contracture around breast implants*. *Plast Reconstr Surg*, 1981. 68(5): p. 696-9.

Danksagung:

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

An dieser Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. Meffert, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die umfangreiche Laborausstattung sowie die Übernahme des Referats. Prof. Uwe Gbureck danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Philip Zeplin für die Überlassung des Themas sowie die durchgehend gewissenhafte Betreuung und Förderung. Für sein anhaltendes Engagement, den wissenschaftlichen Austausch und die Einbeziehung in experimentelle Projekte über das Thema der Doktorarbeit hinaus bin ich ihm sehr dankbar.

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

Herrn Prof. Torsten Blunk danke ich für die Einbeziehung in das Labor für Tissue Engineering und Regenerative Medizin.

Bei der Firma bionic surfaces Dr. med. Rolf Siegel bedanke ich mich für die Durchführung der Implantatbeschichtungen.

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

Publikationen:

Originalarbeiten (Peer-reviewed):

Jordan MC, Zeplin PH. Local inhibition of angiogenesis by halofuginone coated silicone materials.

J Mater Sci Mater Med 2012;

Impact Factor 2,325

Zeplin PH, Larena-Avellaneda A, **Jordan M**, Laske M, Schmidt K.

Phosphorylcholine-coated silicone implants - effect on inflammatory response and fibrous capsule formation.

Ann Plast Surg 2010; 65(6): 560-564

Impact Factor 1,274

Vorträge / Poster:

Zeplin PH, **Jordan, MC**, Meffert RH. Reduktion kutaner Narbenformationen durch Silikonpflaster mit einer Halofuginon freisetzenden Hybridoberfläche. Eine kontrollierte Studie am Nacktmausmodell.

42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgie (2011)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Verminderung der Kapselbildung bei Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon-Lactat.

29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (2009)

Jordan M, Zeplin PH, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (2009)

Jordan M, Zeplin PH, Schmidt K. Verminderung der Kapsel­fibrose bei Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon.

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Verminderung der Kapsel­fibrose bei Mamma-Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon-Laktat.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (2009)

Zitierfähige Abstracts:

Zeplin PH, Walles H, **Jordan M**, Berninger AK, Schmidt K. Effects of Halofuginone-coated silicone implants on inflammatory response, fibrosis and neovascularization in vitro and in vivo.

Can J Plast Surg 19 (Suppl. A): 101A (2011)

Impact Factor 0,179

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

Senologie 2009; 6: 169

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Verminderung der Kapsel­fibrose bei Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon-Lactat.

Senologie 2009; 6: 168-169

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

Plastische Chirurgie 9 (Suppl.1): 100-101 (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Verminderung der Kapsel­fibrose bei Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon.

Plastische Chirurgie 9 (Suppl.1): 101 (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Biokompatibilität von Phosphorylcholin beschichteten Silikonimplantaten.

Biomaterialien 10 (3/4): 158 (2009)

Zeplin PH, **Jordan M**, Schmidt K. Verminderung der Kapsel­fibrose bei Mamma-Silikonimplantaten durch Oberflächenbeschichtung mit Halofuginon-Laktat.

Biomaterialien 10 (3/4): 157 (2009)

Preise:

2011

Forschungsstipendium für Studenten der Deutschen
Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie
DGOOC