

**Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München**  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

**Mikrobiologische Untersuchung der antimikrobiellen  
Wirksamkeit silberhaltiger, abriebarmer  
Oberflächenbeschichtungen aus amorphen  
Kohlenstoff (Diamond-like Carbon, DLC) auf Titan  
und Polyethylen für orthopädische Implantate**

**Sebastian Horst Jüssen**

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. H. W. Gollwitzer  
2. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 22.09.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2015 angenommen.

*Gewidmet  
meinen Eltern,  
Großeltern und Julia,  
für die Unterstützung  
in Studium und Leben*

# Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Einsatz von Implantaten in der Medizin.....</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Biokompatibilität .....   | 3         |
| 1.1.2      | Aseptische Prothesenlockerung .....   | 4         |
| <b>1.2</b> | <b>Materialien Endoprothetik .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Implantatassoziierte Infektionen.....</b>  | <b>8</b>  |
| 1.3.1      | Epidemiologie .....   | 8         |
| 1.3.2      | Risikofaktoren .....  | 9         |
| 1.3.3      | Infektionsmechanismus/Pathogenese .....   | 9         |
| 1.3.4      | Biofilmbildung .....  | 11        |
| 1.3.5      | Keimspektrum .....  | 13        |
| 1.3.6      | Prävention .....  | 14        |
| 1.3.6.1    | Allgemeine Präventionsmethoden .....  | 14        |
| 1.3.6.2    | Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtungen.....   | 15        |
| <b>1.4</b> | <b>Diamond-Like-Carbon (DLC).....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2</b>   | <b>MOTIVATION UND ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....</b>                         | <b>21</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1.1      | Ag-DLC Beschichtungen auf Titan.....  | 22        |
| 3.1.2      | Ag-DLC + Cu-DLC Beschichtungen auf Polyethylen .....                                    | 22        |
| 3.1.3      | Bakterienstämme .....   | 23        |
| 3.1.4      | Medien.....   | 23        |
| 3.1.5      | Materialien .....   | 24        |
| 3.1.6      | Geräte .....  | 25        |
| <b>3.2</b> | <b>Methoden .....</b>   | <b>26</b> |
| 3.2.1      | Herstellungsverfahren DLC .....   | 26        |
| 3.2.1.1    | Herstellung von Ag-nanopartikelhaltigen DLC-Schichten auf.....<br>Metallsubstraten..... | 26        |
| 3.2.1.2    | Herstellung reiner sowie metallpartikelhaltiger DLC-Schichten .....                     | 27        |
|            | auf Polyethylen mittels Ionenimplantation .....   | 27        |
| 3.2.2      | Grundsätzliche Methoden und Versuchsaufbau .....  | 28        |
| 3.2.2.1    | Befüllen der Versuchsgefäße.....  | 29        |
| 3.2.3      | Sterilisation der Proben und Versiegelung der unbeschichteten Fläche mit Paraffin ..... | 29        |
| 3.2.3.1    | Sterilisationsverfahren .....   | 30        |
| 3.2.3.2    | Testung von Sterilität und Zytokompatibilität des Paraffins .....                       | 31        |
| 3.2.4      | Herstellung der Bakteriensuspension.....  | 32        |
| 3.2.4.1    | Bestimmung der Keimdichte.....  | 33        |
| 3.2.4.2    | Einstellung der Keimdichte für S. epidermidis ATCC35984.....                            | 33        |
| 3.2.4.3    | Einstellung der Keimdichte für S. aureus ATCC259231.....                                | 34        |
| 3.2.4.4    | Einstellung der Keimdichte für P. aeruginosa ATCC27853 .....                            | 34        |
| 3.2.5      | Inokulation der Proben mit Bakterien.....   | 34        |
| 3.2.6      | Auswertung.....   | 35        |
| 3.2.6.1    | Auswirkung freigesetzter Ionen auf die Bakteriendichte in der .....                     | 35        |
|            | Suspension (Kulturmedium).....  | 35        |
| 3.2.6.2    | Bakterienadhäsion an der Probekörperoberfläche (Oberflächenadhäsion) .....              | 36        |
| 3.2.6.3    | Statistische Auswertung.....  | 36        |
| 3.2.7      | Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilmbildung.....                     | 37        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 3.2.7.1   | Herstellung der Bakteriensuspension.....   | 37         |
| 3.2.7.2   | Fixierung der Präparate .....  | 37         |
| 3.2.7.3   | Untersuchung des Biofilms .....  | 37         |
| <b>4</b>  | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>38</b>  |
| 4.1       | Sterilisationsverfahren .....  | 38         |
| 4.2       | Optimierung des Testsystems.....   | 39         |
| 4.3       | Einstellung der Keimdichte der Bakteriensuspension .....   | 40         |
| 4.4       | Testung der antibakteriellen Wirksamkeit von silberhaltigen DLC-Beschichtungen auf Titan<br>41                   |            |
| 4.4.1     | Proben mit höherer Silberkonzentration .....   | 41         |
| 4.4.2     | Proben mit geringerer Silberkonzentration.....   | 45         |
| 4.4.3     | Rasterelektronenmikroskopie der Oberfläche.....  | 48         |
| 4.5       | Testung der antibakteriellen Wirksamkeit von silber(kupfer-)haltigen DLC-Beschichtungen<br>auf Polyethylen ..... | 49         |
| 4.5.1     | PE-Versuchsreihe 1 .....   | 49         |
| 4.5.2     | PE-Versuchsreihe 2 .....   | 50         |
| 4.5.3     | PE-Versuchsreihe 3 .....   | 51         |
| 4.5.4     | Rasterelektronenmikroskopie der Oberfläche.....  | 54         |
| <b>5</b>  | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>56</b>  |
| 5.1       | Diskussion der Methode .....   | 57         |
| 5.1.1     | Auswahl der Keime.....   | 57         |
| 5.1.2     | Wachstumshemmung von Bakterien .....   | 58         |
| 5.1.3     | Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilmbildung.....  | 59         |
| 5.2       | Bewertung der Ergebnisse .....   | 61         |
| 5.2.1     | Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren.....  | 61         |
| 5.2.2     | Antibakterielle Eigenschaften von Silber/Kupfer.....   | 61         |
| 5.2.3     | Antibakterielle silberhaltige Oberflächenbeschichtungen.....   | 67         |
| 5.2.4     | Herstellung und Verwendung von DLC und Silber-DLC Oberflächenbeschichtungen .....                                | 72         |
| 5.2.4.1   | Biokompatibilität.....   | 73         |
| 5.2.4.2   | Tribologische Eigenschaften .....  | 74         |
| 5.2.4.3   | Antibakterielle Eigenschaften.....   | 78         |
| 5.2.5     | Silber-DLC Beschichtung auf Titan .....  | 80         |
| 5.2.6     | Silber (Kupfer)-DLC Beschichtung auf Polyethylen .....   | 82         |
| <b>6</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>7</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>86</b>  |
| <b>8</b>  | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>9</b>  | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>10</b> | <b>LEBENS LAUF.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>11</b> | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>101</b> |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einsatz von Implantaten in der Medizin

Medizinische Implantate ersetzen seit vielen Jahrzehnten mechanische oder physikalische Funktionen des menschlichen Körpers nach Verletzung oder Degeneration des jeweiligen Gewebes. In der Orthopädie und Unfallchirurgie dienen temporäre Implantate beispielsweise der vorübergehenden Stabilisierung bei Knochenbrüchen. Langzeitimplantate versorgen destruierte Gelenke oder Knochenabschnitte dauerhaft und unterliegen höchsten Anforderungen an Biokompatibilität, mechanischer Festigkeit und Infektionsschutz.

Blickt man zurück in die Geschichte, finden sich bereits in frühzeitlichen Kulturen erste Hinweise auf die Verwendung körperfremder Materialien in der Medizin, meist als Teil religiöser und mystischer Kulte. Vor allem im Bereich der Zahnimplantologie gibt es hierfür frühe Belege. Unter den Ägyptern zur Zeit Ramses II. gab es Spezialisten zur Behandlung von Zähnen und der Mundhöhle mit Gold [Ehrlich 2010]. 600 Jahre vor Christus formte das Volk der Maya Zahnimplantate aus Perlmutter mit nahtloser Integration in den Knochen. Ebenso wurde in Europa in den Überresten eines Körpers von ca. 200 v. Chr. ein gut integriertes Zahnimplantat aus Eisen gefunden [Ratner *et al.* 2004]. Im Jahr 1541 ist erstmals die Implantation einer flachen Metallplatte aus Gold oder Silber durch Ambroise Paré bei einer Kieferspalte beschrieben [Baden 1955]. Allerdings blieben bis zur Entwicklung des aseptischen chirurgischen Eingriffs durch Dr. J. Lister 1860 viele Versuche der Implantation von metallenen Komponenten wie Nägel und Schrauben aufgrund von Infektionen erfolglos [Park & Lakes 2007]. 1891 war es der Berliner Chirurg Themistokles Gluck, der in einer Publikation über die Implantation eines Gelenks aus Elfenbein berichtete [Wessinghage 1991]. Dem Chirurgen Philip Wiles gelang 1938 die erste Hüft-Arthroplastik [Wiles 1958; Park & Lakes 2007]. Als Vorreiter auf dem Gebiet der heutigen Verfahren der Hüft-Totalendoprothese (TEP) gilt der britische Orthopäde Sir John Charnley, dem es 1962 gelang die erste wirklich erfolgreiche Prothese einzusetzen [Charnley 1979]. Charnley revolutionierte die Hüftoperation durch die

von ihm entwickelte Technik der „*low-frictional-torque arthroplasty*“: Zur Verwendung kamen Hüftkopf-Komponenten aus Metall mit geringem Durchmesser und geringerem Abrieb, einer Hüftpfanne aus Polyethylen (UHMWPE) und der Einsatz von Zement aus Polymethylmethacrylat (PMMA) zur besseren Verankerung der Prothese im Knochen [Learmonth *et al.* 2007]. Eine wesentliche Errungenschaft Charnleys war aber insbesondere die Etablierung der Reinraumtechnologie für die Endoprothesenimplantation, wodurch auch die Infektionsraten deutlich gesenkt werden konnten.

Heute werden weltweit etwa 1,5 Millionen orthopädische Prothesen implantiert, alleine in den USA werden jährlich mehr als eine halbe Millionen Patienten mit primären Hüft- oder Knieendoprothesen versorgt [Campoccia *et al.* 2006; Holzapfel *et al.* 2013]. Derzeitige Vorhersagen gehen davon aus, dass die Anzahl primärer Knie-TEP Implantationen in den USA bis zum Jahr 2030 auf 3,48 Millionen ansteigt (Steigerung um 673 % gegenüber 2005) und die Anzahl primärer Hüft-TEPs um 174 % auf 572.000 ansteigt. Insgesamt wären dies mehr als 4 Millionen Gelenkersätze jährlich [Kurtz *et al.* 2007]. In Deutschland werden mehr als 170.000 künstliche Hüftgelenke und etwa 150.000 Kniegelenke pro Jahr implantiert [Haaker *et al.* 2004; Kurtz *et al.* 2011]. Die Implantation einer Hüftendoprothese zählt zu den 10 häufigsten Operationen in Deutschland [Wirth *et al.* 2004].

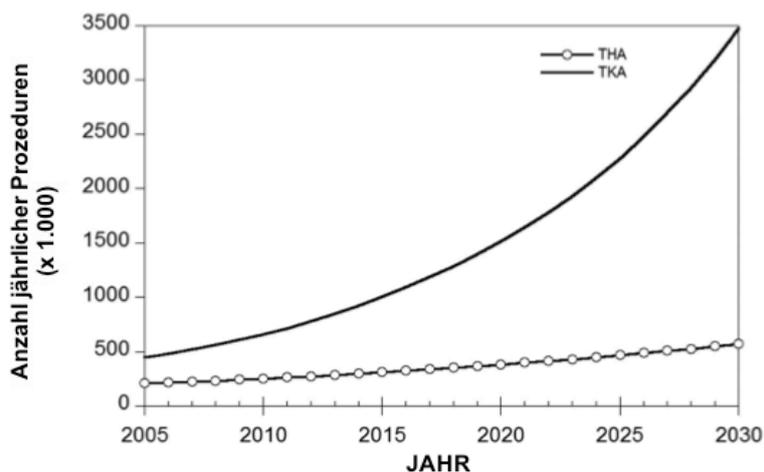


Abb. 1 Hochrechnung der absoluten Anzahl primärer Prozeduren des kompletten Hüftgelenkersatz (THA) sowie Kniegelenkersatz (TKA) in den USA von 2005 bis 2030 (modifiziert nach [Kurtz *et al.* 2007])

### **1.1.1 Biokompatibilität**

1986 definierte die Europäische Gesellschaft für Biomaterialien (ESB) ein Implantat als medizinisches Hilfsmittel, bestehend aus einem oder mehreren Materialien, welches entweder komplett oder teilweise unter einer epithelialen Schicht in den menschlichen Körper eingebracht ist. Eine Prothese ersetzt dabei eine Gliedmaße, ein Gelenk oder ein ganzes Organ des Organismus [Williams 1988].

Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz eines Implantates im menschlichen Körper ist dessen Biokompatibilität. Der Begriff beschreibt die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System [Wintermantel *et al.* 2009]. Ein Implantat muss die Fähigkeit besitzen unter engem Kontakt zu umliegenden Gewebearten für eine lange Zeit koexistieren zu können, ohne dem menschlichen Organismus in irgendeiner Weise zu schaden. Damit ein Knochenimplantat vom Körper toleriert wird, sollten weder Substanzen in toxischen Konzentrationen, noch Antigene, die Immunreaktionen hervorrufen und zu Allergien, Fremdkörperreaktionen oder Entzündungsreaktionen führen können, an das umliegende Gewebe abgegeben werden [Schenk 1986]. Die Reaktion des den Fremdkörper umgebenden Gewebes sollte angemessen ausfallen, periimplantär ist eine optimale Knochenanlagerung wünschenswert, d.h. die Proliferation von Osteozyten soll angeregt und nicht gehindert werden, damit der Einbau der Prothese in den Knochen erleichtert wird [Williams 2008]. Es wird weiterhin unterschieden zwischen biotoleranten, bioinerten und bioaktiven Materialien [Osborn 1979; Heimke 1990; Wintermantel *et al.* 2009]:

- Biotolerante Werkstoffe bewirken im Implantatlager eine Distanzosteogenese. Das Implantat wird vom Organismus als „fremd“ aber nicht schädlich erkannt und von einer Bindegewebsschicht eingekapselt.
- Ein bioinertes Implantat zeichnet sich durch Trägheit aus, d.h. es kommt weder chemisch noch biologisch zu einer Wechselwirkung zwischen Implantat und Gewebe. Es werden keine Reaktionen im umliegenden Gewebe hervorgerufen. Da keine Bindegewebsbildung erfolgt kommt es zur Kontaktosteogenese, d.h. Knochengewebe entsteht in unmittelbarer Umgebung des Implantates. Poröse inerte Werkstoffe ermöglichen das Einwachsen von Knochengewebe in die Implantatoberfläche mit der Folge einer besseren mechanischen Verankerung.

- Bioaktive Werkstoffe fördern die Bildung von Knochengewebe und führen zu einer starken Bindung zum Knochen. Die Knochenneubildung beginnt auf der Oberfläche des Implantats mit Wachstum in Richtung Empfängergewebe. Es bildet sich an der Implantatoberfläche eine Schicht carbonathaltigem Apatits, welche dieselben chemischen Eigenschaften aufweist, wie die mineralische Phase des Knochens. Dadurch bildet sich eine zugfeste Verbindung mit optimierten Integrationseigenschaften aus, welche als Verbundosteogenese bezeichnet wird.

Ein gut in den Knochen integriertes Material vermindert den Prothesenverschleiß und die Freisetzung von Korrosions- und Abbaupartikeln sowie die daraus resultierende Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes [Williams 2008].

### **1.1.2 Aseptische Prothesenlockerung**

Heute gilt die aseptische Lockerung als Hauptfaktor für die verkürzte Lebenszeit einer Prothese [Wooley & Schwarz 2004]. Ursächlich dafür können mehrere Mechanismen sein: Zum einen die Reduktion der Knochendichte in der Nähe des Implantates, verursacht durch eine veränderte Lastübertragung im Gelenk (sogenanntes „*stress shielding*“), zum anderen Mikrobewegungen an der Grenzfläche zwischen Implantat/Knochen, Implantat/Knochenzement oder Knochenzement/Knochen aufgrund mangelhafter chirurgischer Fixierung. Am bedeutendsten scheint aber die durch Abriebpartikel hervorgerufene Lockerung zu sein [Ingham & Fisher 2000; Grill 2003]. Abriebpartikel aus den artikulierenden Flächen lagern sich im periimplantären Gewebe ab und führen zu Entzündungsreaktionen. Nach Phagozytose durch Makrophagen und Riesenzellen werden pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren freigesetzt, welche Osteoklasten aktivieren und die Osteolyse induzieren [Williams 2008].

Wurden für diesen Prozess anfänglich noch kleinste Teilchen des Polymethylmethacrylat verantwortlich gemacht und von „Zement-Krankheit“ gesprochen identifizierte man später, insbesondere nach der Einführung zementfreier Prothesen, Metall- und vor allem UHMWPE-Abriebpartikel als Hauptverursacher der Entzündungsreaktion [Schmalzried *et al.* 1992; Hamadouche *et al.* 2002].

Die aseptische Lockerung kann ohne operativen Revisionseingriff nicht behandelt werden [Pivec *et al.* 2012]. Daher ist die Entwicklung neuer Oberflächenbeschichtungen die den Abrieb verringern eines der Hauptaugenmerke in der wissenschaftlichen Forschung.

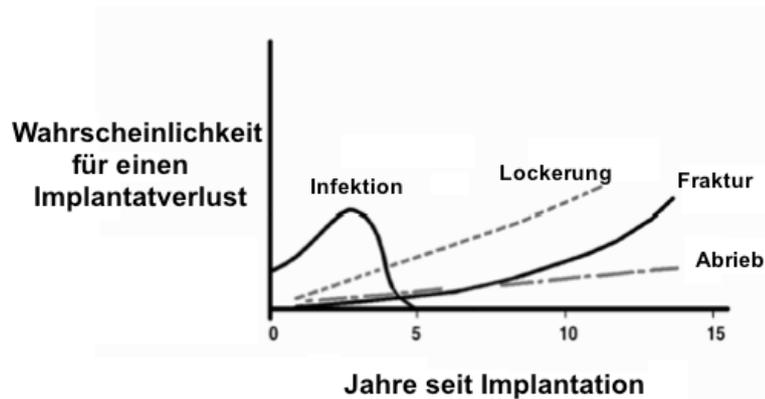


Abb. 2 Schematische Darstellung der Wahrscheinlichkeit für den Verlust eines künstlichen Hüftgelenks nach Implantation (modifiziert nach [Park & Lakes 2007])

Zusammenfassend würde das „ideale“ Material für Implantate folgende Eigenschaften vereinen [Long & Rack 1998]:

- Eine biokompatible chemische Zusammensetzung zur Vermeidung der Schädigung des Empfängergewebes
- Exzellente Korrosionsbeständigkeit zur Vermeidung korrosiver Implantatschädigung im Körper
- Mechanische Festigkeit zur Gewährleistung einer dauerhaften Kraftübertragung zwischen Implantat und Körpergewebe
- Geringes Elastizitätsmodul zur Vermeidung von Knochenresorption bei Belastung
- Hohe Verschleißfestigkeit zur Verminderung der Bildung von Abriebpartikeln

## 1.2 Materialien Endoprothetik

Bei den heutzutage implantierten künstlichen Gelenken wird meistens eine Materialkombination aus Metall/Polymer, Keramik/Polymer, Metall/Metall oder Keramik/Keramik verwendet [Hauert *et al.* 2013]. Standardmäßig besteht die femorale Komponente einer Hüft-TEP aus Hartmetall oder Keramik, die mit einer acetabulären Hüftpfanne aus ultrahochmolekulargewichtigen Polyethylen (UHMWPE) artikuliert [Ingham & Fisher 2000].

Nachfolgend sind die wichtigsten Materialien aufgeführt:

### Metalle

Der Prothesenschaft sowie die Prothesenpfanne bei Hüftprothesen sowie die Femur- und Tibiakomponenten bei Knieprothesen bestehen in der Regel aus folgenden Legierungen:

- Titan Ti6Al4V (Hüfte)
- Kobalt-Chrom-Molybdän (CoCrMo) (Hüfte und Knie)

Der Hüftgelenkskopf als lasttragende Komponente ist häufig aus CoCrMo gefertigt. Aufgrund der schlechteren tribologischen Eigenschaften eignet sich die Titanlegierung nicht für den Einsatz artikulierender Flächen [Long & Rack 1998].

### Keramik

- Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )
- Zirkoniumoxid ( $\text{ZrO}_2$ )

Seit den 1970er Jahren werden die bioinerten Keramiken in der Endoprothetik eingesetzt und haben sich aufgrund hervorragender lasttragender Eigenschaften, minimaler Reibung sowie geringer Erzeugung von Abriebpartikeln etabliert [Hernigou & Bahrami 2003; Willmann 2009; Holzapfel *et al.* 2013]. Nach anfänglichen Problemen ist die Bruchsicherheit der modernen Keramiken äußerst hoch [Ingham & Fisher 2000]. Der Hüftkopf einer Prothese ist häufig aus Keramik hergestellt, seltener auch der zugehörige Hüftpfanneneinsatz. Neuerdings wurden auch Knieprothesen aus Keramik entwickelt.

## Polymere

- Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen (UHMWPE)
- Polymethylmethacrylat (PMMA)

UHMWPE dient als Gleitpartner artikulierender Flächen. Es zeichnet sich durch hohe Biokompatibilität, geringen Reibungswiderstand und ausgezeichnete lasttragende Eigenschaften aus [Harris & Sledge 1990].

Polymethylmethacrylat, auch bekannt als „Knochen-Zement“ wird zur Fixierung der Prothese im Knochen verwendet. Stabilität und Fixierung sind entscheidend für die Implantatlebensdauer. Obwohl die Kurzzeitergebnisse zementierter femoraler Komponenten hoch sind, steigt der Anteil unzementierter Hüften in Europa [Widmer *et al.* 2009]. Grund für die zementlose Fixierung ist langfristig eine bessere Verankerung der Prothese durch Einwachsen von Knochen auf der porösen Oberfläche, relevant vor allem bei jüngeren Patienten [Harris & Sledge 1990], und das geringere Risiko für Embolien während der Implantateinbringung. Dennoch liefern beide Fixationsmethoden etwa vergleichbar gute Langzeitergebnisse [Widmer *et al.* 2009].

Der Polyethylenverschleiß ist bei der Gleitpaarung aus Metall und PE höher als bei der Kombination aus Keramik und PE [Long & Rack 1998]. Trotz der hervorragenden Materialeigenschaften des UHMWPE stellen Abriebpartikeln noch ein Problem dar.

Es zeigte sich, dass die Materialkombination aus Keramik/Keramik (Hüftkopf: Keramik – Hüftpfanne: Keramik) vergleichbar gute Resultate liefert wie Keramik/PE [Widmer *et al.* 2009]. Die Paarungen Keramik/Keramik und CoCrMo Metall/Metall für Hüftkopf und Hüftpfanne zeigten zwar im Labor den geringsten Volumenabrieb [Semlitsch & Willert 1995], allerdings zeigte sich designabhängig bei Kappenprothesen der Hüfte als auch bei sogenannten Großkopfprothesen eine hohe Komplikationsrate durch Metallabrieb, sodass die Metall-Metall-Gleitpaarungen teilweise aus dem Markt genommen wurden. Die Materialforschung hat in den letzten Jahren zudem viele weitere Oberflächenmodifizierungen hervorgebracht, welche die Oberflächeneigenschaften eines Werkstoffes verändern, nicht jedoch dessen Struktureigenschaften.

Die Metall/PE-Gleitpaarung wird aktuell weltweit wegen des etwas höheren Abriebs vor allem bei älteren Patienten mit geringerer funktioneller Belastung eingesetzt, wohingegen bei jüngeren, aktiveren Patienten vorrangig eine Keramik/PE oder

Keramik/Keramik Kombination verwendet werden sollte [Daniel *et al.* 2004; Greene *et al.* 2009; Widmer *et al.* 2009].

## **1.3 Implantatassoziierte Infektionen**

Nach Gelenkersatz entwickeln weniger als 10 % der operierten Patienten zu Lebzeiten Komplikationen in Zusammenhang mit dem Implantat. Häufigste Komplikation ist die aseptische Lockerung [Steckelberg & Osmon 2000]. Protheseninfektionen haben eine deutlich geringere Inzidenz, sind insgesamt wegen der höheren Morbidität und erheblichen Kosten für die weitere Behandlung aber als bedeutendere Komplikation einzustufen [Trampuz & Zimmerli 2005].

Es werden frühe (< 1 Monat nach dem operativen Eingriff), verzögerte (bis 24 Monate nach Operation) oder späte Infektionen (> 24 Monate nach Operation) unterschieden. Tritt eine Infektion innerhalb der ersten zwei Jahre auf, ist diese üblicherweise während der Implantation durch Kontamination im Wundgebiet erworben (früh: hochpathogene Erreger, verspätet: niedrigpathogene Erreger), im Zeitraum danach vorrangig durch Adhäsion hämatogen ausgesäter Keime [Widmer 2001; Trampuz & Widmer 2006]. Die drei häufigsten Foci einer Bakteriämie sind Haut und Weichgewebe (46%), Zähne (15%) und Urogenitaltrakt (13%) [Maderazo *et al.* 1988].

Die Infektion einer Prothese ist antimikrobiell kaum therapierbar und muss in den meisten Fällen durch eine Revisions-Operation behandelt werden. Weitere Komplikationen eines Infektes sind Osteomyelitis, Knochenresorption, Prothesenlockerung und bei ungünstigem Verlauf Amputation bis hin zum Tod [Gristina 1987].

### **1.3.1 Epidemiologie**

In den letzten Jahrzehnten gab es viele operative und technische Verbesserungen wodurch die postoperative Infektionsrate gesenkt werden konnte. Die Inzidenz von Infektionen bei Erstimplantationen in der Hüft- und Knieendoprothetik lag vor 50 Jahren noch bei 10% [Lentino 2003]. Heute infizieren sich etwa 1% der Hüft- und 2% der Knieprothesen innerhalb von zwei Jahren nach Operation. Diese Zahlen können variieren und sind direkt abhängig von der Erfahrung des Chirurgen, den

Operationszahlen des Zentrums und dem individuellen Gesundheitsstatus des Patienten. Die Infektionsrate bei Revisionsoperationen liegt mit ca. 3-5% signifikant höher, manche Autoren sprechen von bis zu 40% [Zimmerli *et al.* 2004; Trampuz & Widmer 2006; Kurtz *et al.* 2008]. Bei etwa 29-45% der Patienten tritt die Infektion früh auf, bei 23-41% verspätet und bei 30-33% spät [Giulieri *et al.* 2004; Laffer *et al.* 2004]. Trotz einer Senkung der Infektionsrate in den letzten Jahrzehnten nimmt die Gesamtanzahl der Protheseninfektionen aufgrund der steigenden Anzahl durchgeführter Operationen und der erhöhten Lebenserwartung weiter zu. Die Infektion bleibt eine Hauptkomplikation, die möglicherweise zur Entfernung des Implantats oder Funktionsverlust führt und ist mit einer Mortalitätsrate von 2,7–18% verbunden [Berbari *et al.* 1998]. Die weiteren Behandlungskosten bei infiziertem Gelenkersatz betragen pro Patient im Durchschnitt etwa 50.000 US\$, ohne dabei den wirtschaftlichen Schaden durch Arbeitsausfall mit eingerechnet zu haben [Lentino 2003; Campoccia *et al.* 2006; Kazemzadeh-Narbat *et al.* 2010]. Weitere Herausforderungen entstehen durch Patienten mit einem höheren Infektionsrisiko, beispielsweise bedingt durch Adipositas und Diabetes, sowie durch das vermehrte Auftreten antibiotikaresistenter Erreger [Jamsen *et al.* 2010].

### **1.3.2 Risikofaktoren**

Zu den Hauptrisikofaktoren für das Auftreten von Infektionen nach Gelenkersatz zählen: Das Vorliegen von Komorbiditäten (insbesondere rheumatoider Arthritis, Herzinfarkt, Vorhofflimmern und Adipositas), eine oberflächliche Wundinfektion im Operationsgebiet, sowie eine systemische Tumorerkrankung oder jede andere Form der Schwächung des Immunsystems. Die Dauer der Operation und die Länge des Krankenhausaufenthaltes gehen ebenfalls mit einer höheren Infektionsrate einher. Außerdem erhöhen die beidseitige Versorgung mit Prothesen oder eine vorausgegangene Operation am Gelenk die Anfälligkeit für eine Infektion [Berbari *et al.* 1998; Ong *et al.* 2009].

### **1.3.3 Infektionsmechanismus/Pathogenese**

Körperfremde Materialien stellen nach Einsetzen in den menschlichen Organismus eine für die Kolonisation freie Oberfläche dar. Es beginnt das sogenannte „race for the surface“ zwischen Proteinen, Gewebszellen (Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen) und Bakterien um die Besiedelung. Wird dieses Rennen von den

körpereigenen Zellen „gewonnen“ gelingt die Integration des Implantats ins Gewebe und eine bakterielle Kolonisation wird unwahrscheinlicher [Gristina 1987]. In dem die Prothese umgebenden Wundgebiet kommt es nach dem chirurgischen Eingriff zu einer lokalen Schwächung des Immunsystems, oft als „immuno-incompetent fibro-inflammatory zone“ bezeichnet, wodurch die Bakterienadhäsion erleichtert wird [Gristina 1994]. Die bakterielle Adhäsion und Anhaftung auf der Prothesenoberfläche stellt den ersten, wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer klinisch relevanten Infektion dar [Campoccia *et al.* 2006].

Nach Kontakt des Implantats mit Blut oder Plasma wird die Oberfläche von einer dünnen, glykoproteinhaltigen Schicht („conditioning film“) überzogen, welche Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen und weitere Proteine enthält [Darouiche 2004]. Die Zusammensetzung dieser Schicht wird durch die Materialeigenschaften beeinflusst, die Schicht selbst beeinflusst wiederum die Art von Zellen, die sich an ihrer Oberfläche anhaften. Die Adhäsion planktonischer Mikroorganismen geschieht entweder mithilfe unspezifischer Kräfte (Oberflächenspannung, Hydrophobizität, elektrostatische Wechselwirkungen) oder spezifischer Faktoren (Adhäsine, Rezeptoren) [Gristina 1987; Galanakos *et al.* 2009].

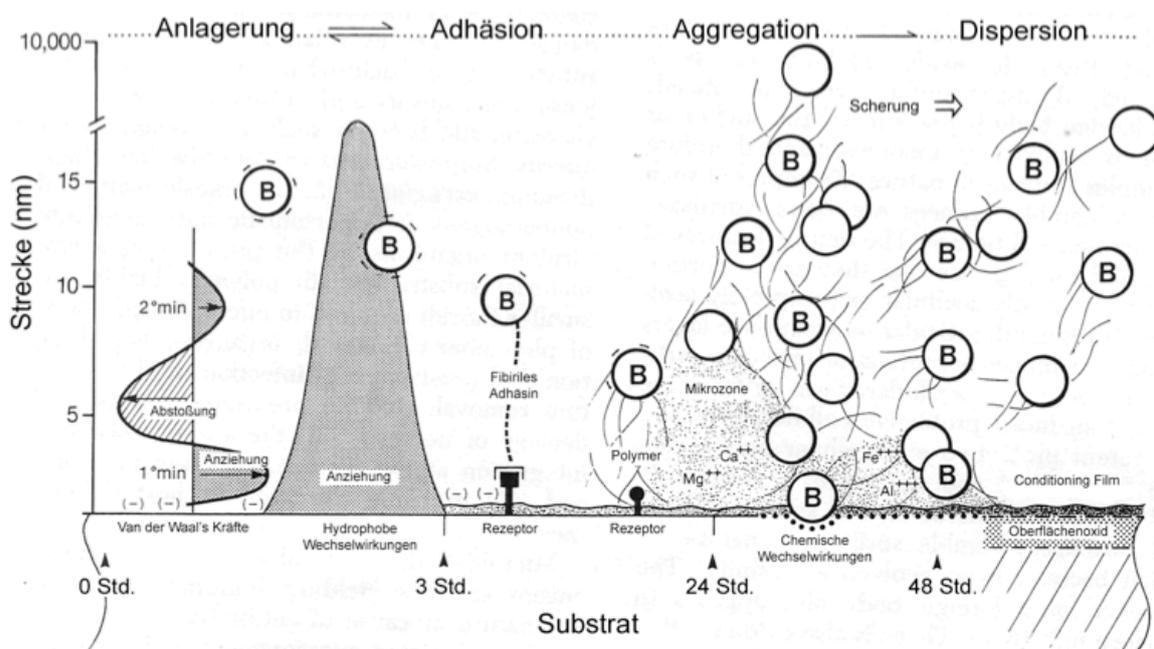


Abb. 3 Molekulare Sequenz der bakteriellen (B) Anlagerung, Adhäsion, Aggregation und Dispersion auf der Materialoberfläche (modifiziert nach [Gristina 1987])

Für die beiden häufigsten Erreger sind heute zwei verschiedene Infektionsmechanismen bekannt: Die Anhaftung von *Staphylococcus epidermidis* an

der Oberfläche geschieht rasch durch unspezifische Kräfte oder mithilfe spezifischer Adhäsine und ist abhängig von den Eigenschaften der Materialoberfläche. *Staphylococcus aureus* hingegen bindet in Gegenwart von Rezeptoren des Wirtsgewebes an Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen mithilfe mikrobieller Oberflächenproteine, bekannt als „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMM) [Rupp *et al.* 1999; Darouiche 2001; Zimmerli *et al.* 2004]. Ob nun bedingt durch eine Kontamination während des operativen Eingriffs, im Verlauf einer gestörten postoperativen Wundheilung oder später im Verlauf einer Bakteriämie, stellt die Anhaftung von Bakterien auf dem Fremdmaterial und insbesondere die Biofilmbildung einen wichtigen Virulenzfaktor dar, indem der Schutz vor dem menschlichen Immunsystem und Antibiotika gestärkt wird [Gristina & Costerton 1985; Vuong *et al.* 2003]. Die Mikrozirkulation in Implantatnähe ist aufgrund des chirurgischen Eingriffs herabgesetzt, die Versorgung mit körpereigenen Abwehrzellen und Antikörpern sowie Antibiotika somit verringert. Ein weiterer Faktor für die Pathogenität ist der Verlust von Granulozyten (Granulozytendefekt): Die Aktivierung von Neutrophilen an der Implantatoberfläche führt zur Freisetzung von Defensinen, welche Granulozyten deaktivieren [Kaplan *et al.* 1999]. Die Keimmenge, die notwendig ist um eine Infektion auszulösen, ist verringert. Das Vorhandensein eines Fremdkörpers im Organismus vermindert die nötige Anzahl von *S. aureus* Erregern zur Auslösung einer manifesten Infektion zirka um den Faktor 100.000 [Zimmerli *et al.* 1982].

Ist die Oberfläche des Fremdmaterials einmal von Bakterien besiedelt, ist es unwahrscheinlich, dass Gewebszellen diese verdrängen und das Implantat integrieren [Gristina 1987]. Ist die Adhäsion der Bakterien an der Oberfläche erfolgt, kommt es im weiteren Verlauf zur Aggregation und gegebenenfalls Biofilmbildung.

### **1.3.4 Biofilmbildung**

Der wichtigste Faktor in der Pathogenese einer Implantatinfektion ist die Formation eines Biofilms auf der Oberfläche. Infektionen bei künstlichem Gelenkersatz sind typischerweise von Bakterien hervorgerufen, die in einem Biofilm wachsen [Gristina 1987]. Zur Bildung des Biofilms kommt es durch „quorum sensing“, einem interbakteriellen Kommunikationsmechanismus zur Wahrnehmung der Populationsdichte: Ist die Anzahl adhärenter Bakterien hoch genug und die Konzentration freigesetzter Botenstoffe ausreichend, werden Gene für die

Biofilmbildung aktiviert [Vuong *et al.* 2003; Costerton *et al.* 2005; McCann *et al.* 2008]. Die Bakterien sind eingebettet in einer selbst produzierten Schicht aus polymerer Matrix, innerhalb der sich kleinste Poren zur Verteilung von Nährstoffen befinden [de Beer *et al.* 1994; Donlan & Costerton 2002].

Der Biofilm schützt die sessilen Bakterien vor dem menschlichen Immunsystem und antimikrobiellen Wirkstoffen [Trampuz & Zimmerli 2005]. Die Polymermatrix hemmt die Diffusion sowie das tiefe Eindringen von Antibiotika in den Film und inhibiert deren Wirkung teilweise. Innerhalb des Biofilms existieren Bakterien, die ein verlangsamtes Wachstum mit reduziertem Stoffwechsel aufweisen, vereinzelte Keime befinden sich sogar in Ruhestadien. Dadurch sind sie zum einen weniger anfällig gegenüber antibiotikahaltigen Substanzen, zum anderen sorgt diese Heterogenität dafür, dass unabhängig vom metabolischen Status einige Zellen im Biofilm immer überleben werden [Costerton *et al.* 1999; Donlan & Costerton 2002; Darouiche 2004]. Die sessilen Bakterien können sich jederzeit aus dem Biofilm lösen und in planktonischer Form verteilen, wodurch dann die klinisch apparente Form der Infektion (Fieber, Schüttelfrost, Bakteriämie, etc.) verursacht wird.

Die Freisetzung von Antigenen durch sessile Bakterien stimuliert die Produktion von Antikörpern, welche den Biofilm jedoch nicht penetrieren können. Diese Antikörper können Schäden im umliegenden Gewebe durch Immunkomplexe auslösen [Costerton *et al.* 1999]. Die Infektionsrate eines *S. epidermidis* Keims, der einen Biofilm ausbildet, ist dreimal so hoch wie der eines Bakterienstammes ohne diesen Virulenzfaktor [Christensen *et al.* 1983].

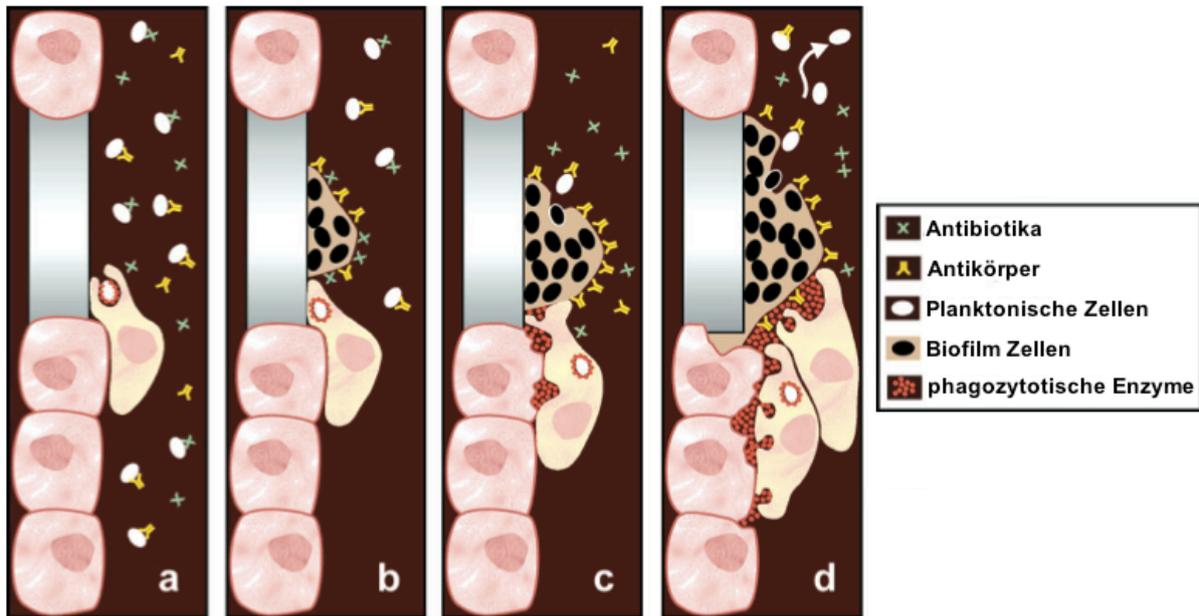


Abb. 4 Schematische Abbildung eines Biofilms. Planktonische Bakterien können von Antikörpern opsoniert und phagozytiert werden, und sind anfällig gegenüber Antibiotika (a). Sessile Bakterienzellen in einem Biofilm sind resistent gegenüber Antikörpern, Phagozyten und Antibiotika (b). Phagozyten versuchen den Biofilm aufzulösen, phagozytotische Enzyme werden freigesetzt (c). Phagozytotische Enzyme schädigen das umgebende Gewebe. Planktonische Bakterien werden aus dem Biofilm freigesetzt und führen zu akuten Entzündungsreaktionen im umgebenden Gewebe (d). (modifiziert nach [Costerton et al. 1999])

### 1.3.5 Keimspektrum

In etwa der Hälfte der Fälle lassen sich bei prothetischen Gelenkinfektionen entweder koagulase negative Staphylokokken (v.a. *S. epidermidis*) oder *S. aureus* nachweisen, gefolgt von einer Mischflora aus mehreren Keimen. Weitere Erreger sind Anaerobier (u.a. *Propionibakterium spp.*, *Bacteroides spp.*), gram-negative Keime (u.a. Enterobacteriaceae wie *E. coli*, *Proteus spp.* und nicht fermentierende Erreger wie *Pseudomonas spp.*) und v.a. bei hämatogenen Infektionen Streptokokken. In einigen Fällen lässt sich gar kein Keim mikrobiologisch nachweisen. [Widmer 2001; Geipel & Herrmann 2004; Zimmerli et al. 2004].

| Keim                              | Häufigkeit (%) |
|-----------------------------------|----------------|
| Koagulase negative Staphylokokken | 30-43          |
| <i>Staphylokokkus aureus</i>      | 12-23          |
| Streptokokken                     | 9-10           |
| Enterokokken                      | 3-7            |
| Gram-negative Keime               | 3-6            |
| Anaerobier                        | 2-4            |
| Polymikrobiell                    | 10-12          |
| Unbekannt                         | 10-11          |

Tab. 1 Die am häufigsten identifizierten Mikroorganismen bei Infektion von Gelenksprothesen (modifiziert nach [Trampuz & Zimmerli 2005])

| Infektionsart      | Auftreten nach Operation | Typische Erreger   |
|--------------------|--------------------------|--|
| früh, postoperativ | ≤ 2-4 Wochen             | <i>S. aureus</i> ,<br>Koag. neg. Staphylokokken              |
| spät, chronisch    | ≥ 1 Monat                | Koag. neg. Staphylokokken<br>Anaerobier,<br><i>S. aureus</i> |
| hämatogen          | > 2 Jahre                | Streptokokken,<br><i>S. aureus</i> ,<br>Gram-negative Keime  |

Tab. 2 Nomenklatur orthopädischer Protheseninfekte (modifiziert nach [Widmer 2001])

### **1.3.6 Prävention**

Hat eine Infektion des Implantats stattgefunden ist es nur im Frühstadium möglich die Erreger vollständig wieder loszuwerden. Bei chronischen Infektionen ist die operative Entfernung des infizierten Materials unumgänglich und geht mit erhöhter Morbidität einher [Gosheger *et al.* 2004]. Daher ist die Prävention implantatbezogener Infektionen von größtmöglicher Relevanz, getreu dem Motto: „prevention is better than cure“ [McCann *et al.* 2008]. In den letzten Jahrzehnten wurden Präventionsmethoden auf verschiedenen Ebenen etabliert um das Infektionsrisiko zu vermindern.

#### **1.3.6.1 Allgemeine Präventionsmethoden**

Neben allgemeinen Aspekten wie der Verbesserung des gesundheitlichen Zustands oder eine Fokussanierung vor einer elektiv durchgeführten Implantation gibt es seit Ende der 70er Jahre den routinemäßigen Einsatz von Antibiotika. Die Gabe von Antibiotika ist bisher die effektivste Methode um die Prävalenz einer Infektion nach Gelenkersatz zu vermindern [Marculescu & Osmon 2005]. Eine aktuelle Metaanalyse zeigte, dass absolutes und relatives Infektionsrisiko durch die Antibiotikaphylaxe um 8% bzw. 81% gesenkt werden konnten [AlBuhairan *et al.* 2008]. Das Antibiotikum sollte eine Stunde vor dem Eingriff intravenös verabreicht werden und nicht länger als 24 Stunden nach Operationsende weitergegeben werden. Idealerweise erfolgt eine Einzelgabe zum Zeitpunkt der Anästhesie [Prokuski 2008]. Als Antibiotika kommen klassischerweise Cephalosporine der ersten oder zweiten Generation zum Einsatz. Cefuroxim und Cefazolin zeigen hervorragende Wirkung gegen Streptokokken sowie Staphylokokken und sind gut gewebebegänglich. Bei Betalactam-Allergie oder dem Vorliegen von Resistenzen werden Glykopeptid-Antibiotika (Vancomycin, Teicoplanin) oder Clindamycin verwendet [Trampuz & Widmer 2006; Matar *et al.* 2010].

Um eine stärkere Antibiotikakonzentration am Ort des Geschehens zu erreichen und die Nebenwirkungen einer systemischen Gabe zu reduzieren, wird antibiotikahaltiger Knochenzement verwendet. In einer Metaanalyse von 36.033 künstlichen primären Hüftgelenks-Operationen zeigte sich eine um 50% verminderte Infektionsrate bei der Verwendung von antibiotikahaltigem Zement [Parvizi *et al.* 2008].

Eine Verkürzung der Operationszeit verringert das Risiko einer Infektion ebenso wie die Reduktion und Fluktuation der Personen im Operationssaal. Die Vorteile der

Verwendung eines OP-Belüftungssystems mit Laminar Air Flow, sowie das Tragen von Ganzkörperschutzanzügen, sind dagegen umstritten [Widmer 2001; Miner *et al.* 2007; Matar *et al.* 2010].

### **1.3.6.2 Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtungen**

Mit den Erkenntnissen der Pathogenese implantatassoziiierter Infektionen ist der Fokus zur Verhinderung einer Infektion auf die Oberfläche des Implantatmaterials gerückt. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach Operation ist die Prävention einer bakteriellen Adhäsion an der Materialoberfläche entscheidend für den Langzeiterfolg des Implantats [Hetrick & Schoenfisch 2006].

Eine effektive Prophylaxe kann erreicht werden durch die Entwicklung „intelligenter Oberflächen“, die einerseits das Bakterienwachstum hindern, andererseits aber das Wachstum von Gewebs-/Knochenzellen nicht beeinträchtigen oder sogar fördern [Heidenau *et al.* 2005]. Ziel dieser Oberflächenmodifikationen ist es, das Anhaften von Bakterien an der Oberfläche zu vermindern und das Überleben bereits anhaftender Keime zu verhindern beziehungsweise die Biofilmbildung zu stören oder nach Möglichkeit einen bereits gebildeten Biofilm wieder aufzulösen [Bruellhoff *et al.* 2010].

Ein Ansatz ist die Herstellung von antiadhäsiven Materialien durch Änderung der physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften [Hetrick & Schoenfisch 2006]. Raue, ionische und hydrophobe Oberflächen fördern die Anhaftung von Bakterien [Bruellhoff *et al.* 2010; Francolini & Donelli 2010; Soininen *et al.* 2011]. Nachteil antiadhäsiver Oberflächen ist, dass auch die Zell- und Proteinadsorption gehemmt werden muss, da diese nachfolgend die spezifische bakterielle Anhaftung erleichtert [Vacheethasane & Marchant 2000]. Die Anhaftung der körpereigenen Zellen ist jedoch wichtig für eine gelungene ossäre Integration [Gollwitzer & Gerdesmeyer 2006].

Antimikrobiell wirksame Oberflächenbeschichtungen enthalten Antibiotika, Antiseptika, antibakteriell wirksame Metalle oder andere bakterizide Stoffe, die an die Umgebung abgegeben werden können (aktiv) oder kovalent an das Material gebunden sind und die Keime bei Oberflächenkontakt abtöten (passiv) [Zhao *et al.* 2009]. Während bei aktiven Beschichtungen die antimikrobielle Wirkung durch Abgabe der Substanzen mit der Zeit nachlässt verlieren passive Beschichtungen ihre antimikrobielle Fähigkeit nicht und der gewünschte Effekt ist langanhaltend.

Die lokale Verwendung von antimikrobiellen Substanzen erhöht die Konzentration an der entscheidenden Grenzfläche zwischen Biomaterial und periimplantärem Gewebe. Die Nebenwirkungen einer hochdosierten, systemischen Antibiotikatherapie zur Erreichung eines optimalen Medikamentenspiegels im Wundgebiet können so reduziert werden [Hetrick & Schoenfisch 2006].

Wichtig ist die Verwendung eines Breitspektrum-Antibiotikums unter Beachtung der Resistenzsituation. Die Antibiotikafreisetzung sollte nach Implantation erstens rasch geschehen, um einen Gewebsspiegel zu erreichen, der oberhalb der minimalen Hemmkonzentration liegt, und zweitens über längere Zeit auf einem hohen Niveau anhalten, welches ausreichend ist um eine Infektion zu verhindern. Die längerfristige Abgabe hoher Antibiotikadosen erhöht jedoch das Risiko einer Resistenzentwicklung [Zhao *et al.* 2009]. Eine biodegradierbare Polymerbeschichtung (PDLLA) auf Titan mit kontrollierter Abgabe imprägnierter Antibiotika (Gentamicin oder Teicoplanin) zeigte eine signifikante Wirksamkeit gegen Staphylokokken. Innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgte initial eine hohe Abgabe des Antibiotikums, gefolgt von einer langsamen, konstanten Freisetzung über mehrere Wochen zur Erhaltung des Wirkspiegels [Gollwitzer *et al.* 2003; Lucke *et al.* 2005].

Betrachtet man das Risiko der Resistenzentwicklung gegen Antibiotika stellen nicht-antibiotikahaltige antimikrobielle Beschichtungen eine attraktive Alternative dar.

Metallionen wie Silber oder Kupfer sind bereits seit einigen Jahrhunderten wegen ihrer antiinfektiösen Wirkung bekannt. Anwendung finden silberhaltige Oberflächenbeschichtungen beispielsweise bei Blasenkathetern [Karchmer *et al.* 2000]. Silberionen zeigen bereits bei geringen Konzentrationen ein breites antimikrobielles Spektrum gegen gram-positive, gram-negative und sogar antibiotikaresistente Erreger. Die antibakterielle Wirkung ist langanhaltend und die Entwicklung von Resistenzen nicht bekannt. Die Imprägnierung einer Oberfläche mit Silber hemmt außerdem die bakterielle Adhäsion [Gosheger *et al.* 2004; Hetrick & Schoenfisch 2006; Monteiro *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2009]. Silber lässt sich in verschiedensten Materialien einarbeiten, auch in Form von Nanopartikeln [Zhao *et al.* 2009]. Nanopartikel sind reaktionsfreudiger, da sie in Bezug auf ihr Volumen eine vergrößerte Oberfläche bieten [Kim *et al.* 2007]. Sie können aufgrund der höheren bakteriziden Wirkung in niedrigeren Konzentrationen verwendet werden [Monteiro *et al.* 2009]. Die Zytotoxizität von Silber bzw. Silber-Nanopartikeln darf nicht

vernachlässigt werden, zeigt jedoch eine starke Abhängigkeit von der Konzentration [Gosheger *et al.* 2004; Braydich-Stolle *et al.* 2005].

Antiseptika wie beispielsweise Chlorhexidin oder Chitosan sind eine weitere Alternative zur Oberflächenbeschichtung. Chlorhexidin wird wegen seines breiten Wirkspektrums häufig im Alltag eingesetzt, beispielsweise in der Mundhygiene. Eine Beschichtung mit Chlorhexidin/Chloroxylenol auf Titan und Stahl zeigte bei Versuchen *in vivo* und *in vitro* antimikrobielle Aktivität gegen alle Keime, die üblicherweise bei Infektionen orthopädischer Implantate vorkommen [Darouiche *et al.* 1998]. Chitosan ist nicht nur antimikrobiell wirksam, sondern es stimuliert zusätzlich die Wundheilung/Osteogenese und fördert die Regeneration des Gewebes [Bumgardner *et al.* 2003].

Auch Stickstoffmonoxid (NO) ist direkt antimikrobiell. Der Mediator NO kommt natürlicherweise im menschlichen Organismus vor und wird bei Infektion sowie Zytokinstimulation von Makrophagen freigesetzt um nachfolgend oxidativen Stress auszulösen [Hetrick & Schoenfisch 2006]. Die NO-Abgabe aus Sol-Gel Beschichtungen führte zu einer verringerten bakteriellen Adhäsion [Nablo *et al.* 2005].

Neue vielversprechende Ansätze zielen darauf ab, das quorum-sensing oder die Biofilmbildung zu stören oder einen Biofilm wieder aufzulösen. Verschiedene Methoden richten sich gegen funktionale Moleküle, Gene und regulatorische Kreisläufe, welche die Biofilmarchitektur kontrollieren [McCann *et al.* 2008]. Quorum-sensing-Inhibitoren wie beispielsweise das Peptid RIP (RNAIII-inhibiting peptide) sind in der Lage die Zell-Zell Kommunikation von Staphylokokken zu unterbinden [Dell'Acqua *et al.* 2004].

Für alle Oberflächenbeschichtungen bleibt jedoch die Biokompatibilität der wichtigste Faktor für eine gelungene Integration des Implantats in den Körper und damit einer wirkungsvollen Infektprophylaxe.

## 1.4 Diamond-Like-Carbon (DLC)

Diamantähnlicher Kohlenstoff (diamond-like carbon, DLC) ist eine metastabile Form des amorphen Kohlenstoffs, welche aus einer Mischung sogenannter  $sp^3$ - sowie  $sp^2$ -hybridisierter Kohlenstoffverbindungen besteht und in den meisten Fällen zusätzlich hydrogeniert ist [Grill & Meyerson 1994].

DLC zeichnet sich durch seine hohe mechanische Härte, niedrige Reibung, geringen Verschleiß sowie chemische Reaktionsträgheit als Modifikation für Oberflächen aus [Cui & Li 2000]. Es findet weiten Einsatz als protektive Beschichtung verschiedenster Oberflächen sowohl in der Auto- als auch in der Computerindustrie. Aufgrund hervorragender Biokompatibilität findet DLC zudem Einsatz in der Medizin, beispielsweise bei Herzklappen oder als protektive Beschichtung von Gelenkprothesen [Grill 1999; Robertson 2002; Roy & Lee 2007].

Kohlenstoffbindungen existieren in drei verschiedenen Hybridisationsformen,  $sp^3$ ,  $sp^2$  und  $sp^1$ , wodurch sie in der Lage sind verschiedenste kristalline und ungeordnete Strukturen zu bilden [Robertson 2002]. Diamant besteht zu 100% aus  $sp^3$ -Bindungen, die vier Valenzelektronen des Kohlenstoffatoms sind tetraedrisch ausgerichtet und formen eine starke  $\sigma$ -Bindung zum benachbarten Atom. Graphit besteht aus  $sp^2$ -Kohlenstoffbindungen, nur drei der vier Valenzelektronen bilden  $\sigma$ -Bindungen zu benachbarten Atomen aus, welche alle in einer Ebene liegen. Das vierte Elektron liegt in einem  $\pi$ -Orbital. Das  $\pi$ -Orbital, steht orthogonal zu der Ebene der  $\sigma$ -Bindung und bildet eine schwache  $\pi$ -Bindung mit einem  $\pi$ -Orbital von einem oder mehreren benachbarten Atomen aus. Bei der  $sp^1$ -Bindung gehen nur zwei Valenzelektronen eine starke  $\sigma$ -Bindung entlang einer Achse ein, die anderen beiden Elektronen bilden  $\pi$ -Bindungen. Seine extremen physikalischen Eigenschaften gewinnt der Diamant aus seinen starken, direktionalen  $\sigma$ -Bindungen [Robertson 2002].

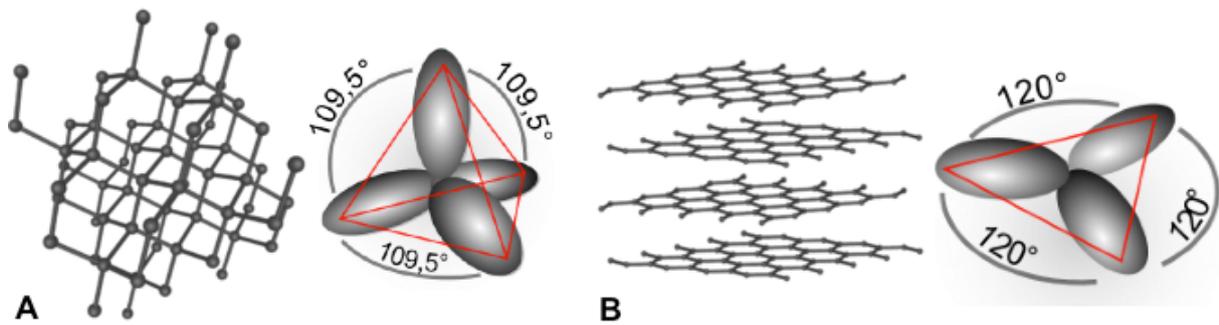


Abb. 5  $sp^3$ -hybridisierte Kohlenstoffbindung beim Diamant (A) und  $sp^2$ -hybridisierte Kohlenstoffbindung beim Graphit (B)

Die  $sp^3$  Bindungen können einerseits in kristalliner Form wie beim Diamanten vorkommen, d.h. eine weitreichende Ordnungsstruktur besitzen, aber auch in amorpher Form mit Bindungen nur weniger Atome untereinander. So wird erreicht, dass die Beschichtungen gleichzeitig flexibel sind und sich dem Grundmaterial anpassen, ohne dass Risse entstehen [Grill & Meyerson 1994].

Die Eigenschaften einer Beschichtung aus DLC lassen sich durch das Verhältnis von  $sp^3$  zu  $sp^2$  Verbindungen verändern. Je höher der  $sp^3$ -Anteil ist, desto eher tendieren die physikalischen Eigenschaften des Materials in Richtung Diamant. Erreicht der  $sp^3$ -Gehalt 60-80%, spricht man von tetraedrischen amorphen Kohlenstoff (ta-C), überwiegt der  $sp^2$ -Anteil in der Beschichtung von amorphen Kohlenstoff (a-C) [Marks *et al.* 1996]. Zudem besteht die DLC-Beschichtung nicht nur aus Kohlenstoffatomen (a-C, ta-C), sondern enthält auch einen unterschiedlich großen Anteil an Wasserstoffatomen (a-C:H, ta-C:H). Veranschaulicht wird die Klassifizierung in Abbildung 6, wo die verschiedenen Formen von DLC in einem ternären Diagramm Anhand ihres  $sp^3$ ,  $sp^2$  und H-Gehalts aufgetragen sind. Tabelle 3 vergleicht die wesentlichen physikalischen und chemischen Materialeigenschaften der DLCs in Bezug auf Bindungsart und Wasserstoffgehalt.

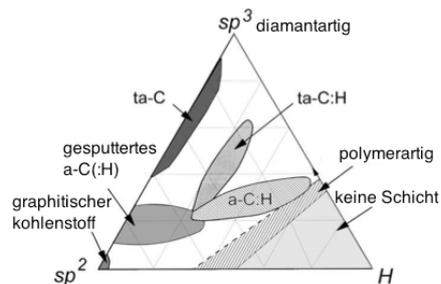


Abb. 6 Ternäres Phasendiagramm der Bindungen bei amorphem Kohlenstoff (modifiziert nach [Robertson 2002])

|                                  | c[ $sp^3$ ]<br>% | c[H]<br>at% | Dichte<br>g/cm <sup>3</sup> | Härte<br>GPa |
|----------------------------------|------------------|-------------|-----------------------------|--------------|
| <b>Graphit</b>                   | 0                | 0           | 2,27                        | 8            |
| <b>Diamant</b>                   | 100              | 0           | 3,52                        | 100          |
| <b>Polyethylen (PE)</b>          | 100              | 67          | 0,92                        | <1           |
| <b>Polyvinylpyrrolidon (PVP)</b> | 83               | 53          | 1,1                         | <1           |
| <b>a-C</b>                       | 20-30            | 0           | 2,2                         | 10-20        |
| <b>ta-C</b>                      | 60-80            | 0           | 3,1                         | 60-80        |
| <b>a-C:H</b>                     | 30-40            | 20-40       | 1,6-2,2                     | 10-20        |
| <b>ta-C:H</b>                    | 70               | 30          | 2,4                         | ca. 50       |

Tab. 3 Vergleich der wichtigsten Eigenschaften verschiedener DLC-Typen mit den Referenzmaterialien Diamant, Graphit, Polyethylen und Polyvinylpyrrolidon

Aufgrund seiner amorphen Struktur können verschiedenste Elemente wie Silber, Kupfer oder andere Ionen in die Schicht eingearbeitet werden und ihr so in einem gewissen Rahmen neue Funktionen verleihen, ohne dass die hervorragenden physikalischen Eigenschaften verloren gehen [Hauert 2003; Roy & Lee 2007]. Die Anzahl von Ionen, die mittels Implanter auf eine bestimmte Oberfläche eingebracht wird, bezeichnet man als Fluenz (Anzahl Ionen/Fläche  $\times \text{m}^{-2}$ ).

Der Nachteil von DLC-Schichten ist die innere Druckspannung, die durch den Ionenbeschuss zur Erzeugung von  $\text{sp}^3$ -Bindungen entsteht [Paul *et al.* 2011]. Die Druckspannung limitiert die maximale Schichtdicke, die wiederum benötigt wird um das Material vor Abrieb zu schützen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem  $\text{sp}^3$ -Anteil bzw. der Härte der Schicht und der Druckbelastung nachgewiesen werden [Grill 1999; Robertson 2002].

Die innere Verspannung des Materials kann dazu führen, dass sich die Beschichtung plötzlich ablöst, wenn die Haftung zur Grundfläche nicht ausreichend ist. Dadurch geht nicht nur der Effekt der Beschichtung verloren, die herausgelösten Partikel verstärken auch den Abrieb, ein Umstand der gerade bei orthopädischen Implantaten fatal wäre. Es gibt verschiedene Versuche die Haftung zu verbessern, beispielsweise durch Einarbeitung verschiedener Ionen oder durch Benutzung einer Zwischenschicht mit erhöhter Haftungsfähigkeit [Mounier & Pauleau 1997; Roy & Lee 2007].

DLC Beschichtungen weisen eine große Diversität in Bezug auf anatomische Bindungsverhältnisse auf, zudem sind die Materialeigenschaften abhängig von dem Herstellungsverfahren. Daher sind die verschiedenen Ergebnisse, die in der Literatur präsentiert werden schwer zu interpretieren und zu vergleichen [Roy & Lee 2007].

## 2 Motivation und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die aseptische Lockerung infolge von Abriebpartikeln der artikulierenden Flächen ist ein Hauptproblem beim künstlichen Gelenkersatz. Aufgrund der höheren Mortalitätsrate und hohen Folgekosten bei der weiteren Behandlung gilt die Protheseninfektion als Hauptkomplikation. Obwohl die Infektionsrate in den letzten Jahrzehnten deutlich gesenkt werden konnte und die Anzahl der Infektionen heute auf einem niedrigen Niveau stagniert (etwa 1-2% innerhalb von 2 Jahren nach Operation), steigt die Gesamtzahl infizierter Gelenksprothesen, da sich immer mehr Patienten einer elektiven Arthroplastik unterziehen. Bedingt durch die wachsende Anzahl jüngerer Patienten, steigen die Anforderungen an Materialanglebigkeit und Infektionsschutz. Da Resistenzen gegen Antibiotika immer weiter verbreitet sind, stellt die Verwendung von Metallionen als breitwirksames antimikrobielles Agens, eine mögliche Alternative dar.

Insbesondere existieren bisher keine antimikrobiell wirksamen Oberflächenbeschichtungen für tribologisch belastete Materialien, während in der Knieendoprothetik ca. 50 % der Implantatoberfläche tribologisch belastet ist.

Die zentrale Aufgabe der hergestellten DLC-Schichten besteht

- in einem verbesserten Infektionsschutz der beschichteten Implantate und insbesondere in einer antibakteriellen Ausrüstung tribologisch beanspruchter Oberflächen
- bei gleichzeitig verbessertem stabilen Einwachsen von Knochen in die Implantatoberfläche im Sinne einer optimierten Osseointegration der Knochen-Implantat Grenzfläche
- reduziertem tribologischen Verschleiß von Gelenkendoprothesen der Implantat-Implantat Grenzfläche

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit von DLC-Oberflächenbeschichtungen auf Titan und UHMWPE mit verschiedenen Konzentrationen antimikrobiell wirksamer Metallionen (hauptsächlich Silber, ansatzweise Kupfer)

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Ag-DLC Beschichtungen auf Titan

Es wurden runde, korundgestrahlte TiAl6V4-Plättchen (d=10 mm, h=2 mm) mit einer Oberflächenrauheit von  $R_a=5\mu\text{m}$  verwendet, welche an der Universität Augsburg, Experimentalphysik IV mittels Dip-Coating und ioneninduzierter Polymerumwandlung beschichtet worden sind. Die folgenden Oberflächen wurden untersucht:

- Vergleichsprobe TiAl6V4, unbeschichtet (Titan)
- TiAl6V4, beschichtet mit Ag-freiem DLC (DLC)
- TiAl6V4, beschichtet mit Ag-haltigem DLC (Ag:PVP im Verhältnis 1:1)
- TiAl6V4, beschichtet mit Ag-haltigem DLC (Ag:PVP 1:2)
- TiAl6V4, beschichtet mit Ag-haltigem DLC (Ag:PVP 1:10)
- TiAl6V4, beschichtet mit Ag-haltigem DLC (Ag:PVP 1:20)

#### 3.1.2 Ag-DLC + Cu-DLC Beschichtungen auf Polyethylen

Es wurden runde Plättchen (d=10 mm, h=2 mm) aus ultrahochmolekularem Polyethylen (UHMWPE) verwendet, die ebenfalls von der Experimentalphysik IV der Universität Augsburg in verschiedenen Verfahren beschichtet worden sind. Als Vergleichsprobe diente jeweils ein Plättchen reines Polyethylen (UHMWPE)

- 1. PE-Versuchsreihe: Silber-/(Kupfer-)implantierte Probensätze mit maximaler Fluenz ( $1\cdot 10^{17}\text{ cm}^{-2}$  bzw.  $1\cdot 10^{16}\text{ cm}^{-2}$ ) und verschiedenen Implantationsenergien
  - Ag 100 keV  $1\cdot 10^{17}\text{ cm}^{-2}$
  - Ag 80 keV  $1\cdot 10^{16}\text{ cm}^{-2}$
  - Ag 60 keV  $1\cdot 10^{17}\text{ cm}^{-2}$
  - Cu 55 keV  $1\cdot 10^{17}\text{ cm}^{-2}$
- 2. PE-Versuchsreihe: Zuerst Umwandlung der UHMWPE Oberfläche durch Implantation mit 40 keV,  $1\cdot 10^{16}\text{ cm}^{-2}$  Stickstoff zu DLC, dann Implantation von Silber bei niedriger Energie in die Oberfläche

- DLC + Ag 10 keV  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$
  - DLC + Ag 10 keV  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$
  - DLC + Ag 10 keV  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$
- 3. PE-Versuchsreihe: Silberionenimplantation bei verschiedenen Energien und unterschiedlicher Fluenz
    - Ag 10 keV  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$
    - Ag 10 keV  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$
    - Ag 20 keV  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$
    - Ag 20 keV  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$
    - Ag 5 kV  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  (PIII)

### **3.1.3 Bakterienstämme**

Referenzkeime der American Type Culture Collection (ATCC).

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ferner wurde ein etablierter Referenzstamm mit starker Biofilmbildung untersucht:

- *Staphylococcus epidermidis* RP62a

### **3.1.4 Medien**

- Nährmedien:
  - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (+1g/L D-Glucose; + Pyruvat; - L-Glutamin; - Phenol) + 10% fetales Kälberserum (FCS) der Firma life technologies<sup>TM</sup>, Paisley, Großbritannien
  - Tryptic Soy Broth (TSB) der Firma Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland
- PBS Pufferlösung: (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
  - 8,0 g Natriumchlorid (NaCl)
  - 0,2 g Kaliumchlorid (KCl)
  - 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
  - 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
  - mit destilliertem Wasser auffüllen auf 1000 ml

- Neutralisationslösung:
  - 100 mg Natriumthioglykolat ( $\text{HSCH}_2\text{COONa}$ ) der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
  - 146 mg Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
  - mit destilliertem Wasser auffüllen auf 100 ml
  
- Destilliertes Wasser der Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), Gehalt  $\geq 99,8$  % der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
  
- REM-Präparation:
  - Lösung A: 22,6g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  auf 1000ml destilliertes Wasser (Natriumhydrogenphosphat der Firma Merck Darmstadt, Deutschland)
  - Lösung B: 25,2g  $\text{NaOH}$  auf 1000ml destilliertes Wasser (Natriumhydroxyd der Firma Merck Darmstadt, Deutschland)
  - Glutaraldehyd 25% der Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
  - Fixierlösung: 24 Teile Puffer (830ml Lösung A + 170ml Lösung B) + 1 Teil Glutaraldehyd

### **3.1.5 Materialien**

- Pipettenspitzen:
  - Pipettenspitzen 100  $\mu\text{l}$ , gelb der Firma Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
  - Pipettenspitzen Premium Tips 1 ml, farblos der Firma Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
  - Serologische Pipette 2 ml, 5 ml und 10 ml der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
  - COMBITIPS PLUS 10 ml der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
  
- Versuchsgefäße:

- Sterile Reaktionsgefäße, 1.6 ml (Eppendorfcups) der Firma Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
  - Ratiolab® Halbmikro CUVETTES, UV der Firma Ratiolab, Dreieich, Deutschland
  - Falcon™ BLUE MAX™ 15 ml + 50 ml Konisches Röhrchen, Polypropylen der Firma Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
  - Zellkulturplatte, 24 Vertiefungen, Flachboden, mit Deckel für geringe Verdunstung der Firma Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
  - Sterile Reagenzgläser des Instituts für Mikrobiologie
- Agarplatten:
    - Columbia Agar mit 5% Schafsblut der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
    - Trypticase™ Soy Agar (TSA) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
  - Sterilfilter MILLEX® GP Filter Unit 0,22 µm der Firma Millipore, Corrightwohill, Irland
  - Sterile Impföse 10 µl der Firma Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Ungarn
  - Sterile Pinzette, Zentralsterilisation Klinikum Rechts der Isar

### **3.1.6 Geräte**

- GeneQuant *pro*™ UV/Vis Spektrophometer der Firma Biochrom Ltd., Cambridge, England
- MacFarland Densimat™ der Firma bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
- Vortex, REAX 2000 der Firma Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Brutschrank B6200 der Firma Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Pipetten: Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
  - Eppendorf Reference® (fix) 100 µl
  - Eppendorf Reference® (variabel) 200 - 1000 µl
  - Eppendorf Multipette® plus, manueller Handdispenser
  - Eppendorf Easypet®, elektronische Pipettierhilfe
- Elmasonic S 60 H Ultraschallgerät der Firma Elma, Singen, Deutschland

- HERAsafe HS12 Sicherheitswerkbank der Firma Heraeus, Hanau, Deutschland
- Präzisionswaage SBC 32 der Firma Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland
- Varioklav® Dampfsterilisator, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
- Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) des Instituts für Experimentalphysik IV, Uni Augsburg; Typenbezeichnung ESEM XL 30 FEG, der Firma FEI, Hillsboro, Oregon, USA
- Magnetrührer RCT basic der Firma IKA®, Staufen, Deutschland

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellungsverfahren DLC**

Die unterschiedlichen DLC-Versuchsplättchen wurden am Lehrstuhl für Experimentalphysik IV der Universität Augsburg hergestellt. Dabei diente als Grundlage das Verfahren der ioneninduzierten Polymerumwandlung [Schwarz & Stritzker 2010].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DLC Beschichtungen enthalten verschiedene Konzentrationen von Silbernanopartikeln (Kupfernanopartikeln) zur Erzielung einer antimikrobiellen Wirksamkeit. Das beschichtete Material ist Titan (TiAl6V4) oder Polyethylen (UHMWPE).

Die Titanprobe wurde zuerst mit einer Polymerschicht, in der die Nanopartikel gelöst vorlagen, überzogen, bevor die Umwandlung des Polymers in DLC via Ionenimplantation erfolgte. Beim Polyethylen wurde die oberste Schicht des UHMWPE durch Ionenbeschuss direkt in DLC umgewandelt, sodass es sich streng genommen nicht um eine Beschichtung, sondern um eine Oberflächenmodifikation handelt.

#### **3.2.1.1 Herstellung von Ag-nanopartikelhaltigen DLC-Schichten auf Metallsubstraten**

Zuerst wurde eine kolloidale Dispersion von Silbernanopartikeln durch die UV-lichtinduzierte Reduktion von Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) in Ethanol und Benzoin hergestellt. Als Stabilisator wurde Polyvinylpyrrolidon (PVP),  $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})]_n$  verwendet, welches gleichzeitig die Matrix für den Silber-Polymer-Nanokomposit bildet und das

Ausgangsmaterial für die Polymer-zu-DLC Transformation darstellt. Im Rahmen der Versuche wurden kolloidale Polymerlösungen mit verschiedenen Metallkonzentrationen hergestellt (Ag:PVP 1:1, Ag:PVP 1:2, Ag:PVP 1:10, Ag:PVP 1:20). Anschließend erfolgte die Tauchbeschichtung (Dip-Coating) der Titanprüfkörper. Diese wurden in die Polymer-Lösung eingetaucht und nach einer Verweildauer von einer Sekunde mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit wieder herausgezogen, wobei eine dünne Polymerschicht auf der Oberfläche des Titanplättchens zurückblieb.

Anschließend wurde die Polymerschicht durch Ionenimplantation zu amorphem, diamantähnlichem Kohlenstoff umgewandelt. Als Verfahren wurde die Plasma-immersions-Ionenimplantation (PIII) verwendet.

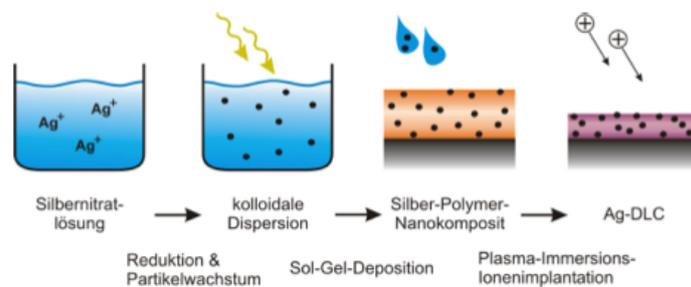


Abb. 7 Prinzipieller Ablauf der Silber-DLC-Herstellung durch Ionenimplantation eines Nanokomposits auf Titanoberflächen (aus [Schwarz & Stritzker 2010])

### 3.2.1.2 Herstellung reiner sowie metallpartikelhaltiger DLC-Schichten auf Polyethylen mittels Ionenimplantation

Die Umwandlung der UHMWPE-Oberfläche zu DLC erfolgte durch Stickstoff- oder Metallionenimplantation nach bekannter Literatur mit einem herkömmlichen Ionenimplanter [Marcondes *et al.* 2004; Bertoti *et al.* 2007]. Die Stickstoffimplantation wurde aufgrund der in der Literatur beschriebenen guten Umwandlung zu amorphem Kohlenstoff gewählt.

Für eine erste Versuchsreihe wurden silber- und kupferimplantierte Probesätze mit einer Fluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  bzw.  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  und verschiedenen Implantationsenergien (Ag: 60, 80 und 100 keV; Cu: 55 keV) hergestellt.

Für eine zweite Versuchsreihe wurde die Umwandlung des UHMWPE zu DLC zuerst durch Implantation von Stickstoff mit einer Energie von 40 keV und einer Fluenz von  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  durchgeführt. Anschließend wurden Silberionen bei 10 keV und unterschiedlichen Fluenzen ( $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ ) implantiert.

Bei der dritten Versuchsreihe erfolgte die Transformation zu DLC wieder direkt durch Silberionenimplantation bei verschiedenen Energien und Fluenzen (10 keV:  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ,  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ; 20 keV:  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ ). Zusätzlich wurde eine weitere Probe via Plasmainmersions-Ionenimplantation (PIII) bei einer Pulsspannung von 5 kV und einer Fluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  hergestellt.

### **3.2.2 Grundsätzliche Methoden und Versuchsaufbau**

Die Planung und Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen erfolgte im S2-Labor für Bakteriologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dirk H. Busch) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Miethke.

Die im folgenden beschriebenen Methoden zur Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften verschiedener Oberflächenbeschichtungen wurden unter exakt äquivalenten Versuchsbedingungen an verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt um eine gute Vergleichbarkeit zu erhalten. Dabei diente als Grundlage ein in der Literatur beschriebenes Vorgehen [Heidenau *et al.* 2005]. Alle Nährmedien wurden mindestens alle zwei Monate frisch angesetzt und je Versuchsdurchgang wurden 100µl der Nährlösung auf Blutagarplatten ausplattiert, 24h bei 37°C bebrütet und auf Keimfreiheit untersucht. Sämtliche verwendete Bakterienstämme wurden bei -80°C gelagert und zunächst auf einem geeigneten Nährboden (Columbia Agar mit 5% Schafsblut (COL-S), Trypticase™ Soy Agar (TSA)) mittels einer sterilen Impföse ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C zu sichtbaren kleinen Kolonien angezüchtet. Die Agarplatte ließ sich bei 4°C im Kühlschrank als Dauerkultur mehrere Wochen lagern. Als Nährmedium diente, sofern nicht anders angegeben, DMEM ohne Phenol, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS). Inkubiert wurden alle Proben im Brutschrank B6200 der Firma Haereus. Die Abbildung 8 fasst den viertägigen Versuchsablauf zusammen.

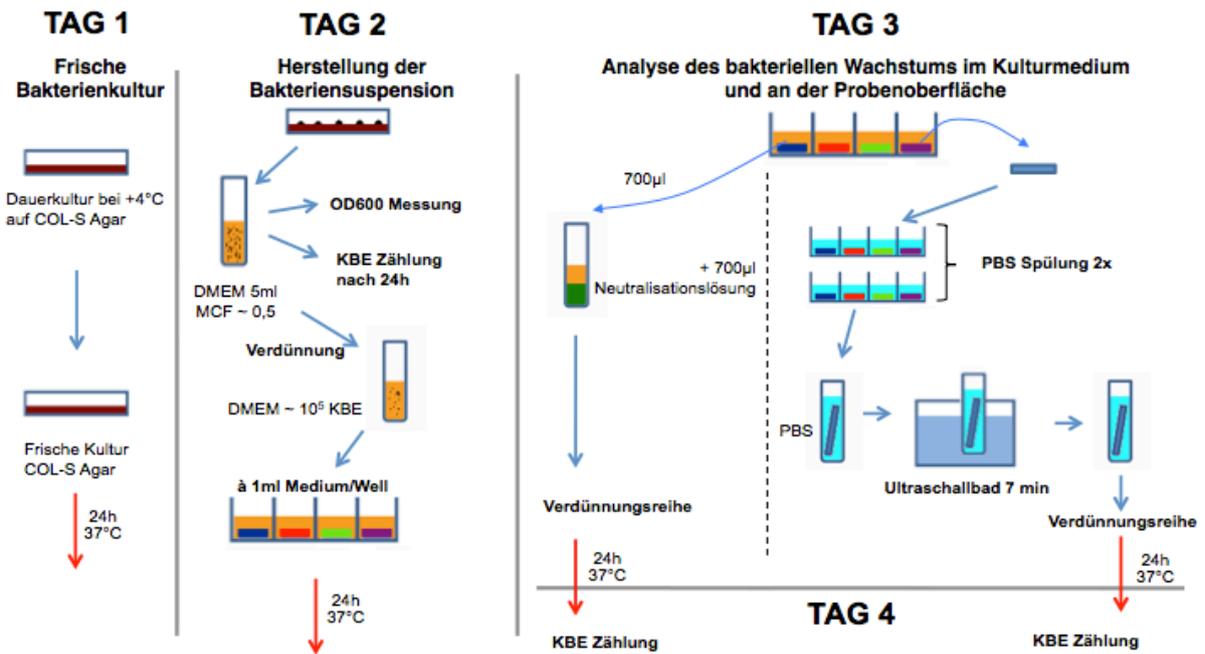


Abb. 8 Arbeitsschema zur Quantifizierung des bakteriellen Wachstums an der Probekörperoberfläche sowie im umgebenden Kulturmedium

### 3.2.2.1 Befüllen der Versuchsgefäße

Für die Durchführung der Versuche wurden jeweils vor Beginn eines Durchlaufs folgende Gefäße mit Lösungen unter der Sterilbank (HERAsafe HS12 Sicherheitswerkbank) mit Pipetten befüllt:

- Eppendorfcups 1,6 ml mit 900 µl sterilem PBS
- Eppendorfcups 1,6 ml mit 700 µl Neutralisationslösung
- Falcon-Röhrchen 15ml mit 3 ml sterilem PBS

### 3.2.3 Sterilisation der Proben und Versiegelung der unbeschichteten Fläche mit Paraffin

Die Probekörper wurden mit destilliertem Wasser für 10 min unter ständigem Schütteln gespült, in der Laminar-Flow-Bank luftgetrocknet und danach mit 26,5 kGy gammasterilisiert (Isotron Deutschland GmbH, Allershausen, Deutschland).

Die zu testenden Plättchen wurden am 1. Tag in eine 24er-Well Platte überführt. Da die Probekörper herstellungsbedingt an der Unterseite unbehandelt sind musste diese „unbeschichtete“ Fläche für die Bakteriensuspension unzugänglich gemacht werden. Für diesen Zweck wurde histologisches Paraffin verwendet. Die Probekörper wurden kurz in geschmolzenem Paraffin (65 °C), welches zuvor bei 120°C für 20

Minuten in einem Glasbehälter autoklaviert worden ist (Varioklav, H+P Labortechnik), eingetaucht, sodass die Unterfläche mit einem dünnen Paraffinfilm benetzt wurde. Im Anschluss wurden die Proben sofort in den Zellkulturwells platziert und durch das noch flüssige Paraffin am Boden fixiert. Mit einer Schmelztemperatur von ca. 60 °C erstarrt Paraffin bei Raumtemperatur sofort und behält seine Festigkeit bei 37 °C. Zudem ist Paraffin wasserabweisend. Dadurch wurde die Versiegelung der Unterfläche gegen die Bakteriensuspension während der Inkubation gewährleistet. Ein zusätzlicher Vorteil der Methode ist, dass der Probekörper am Boden des Wells befestigt wird. Von großer Bedeutung ist dies v.a. bei den Probekörpern aus UHMWPE, die aufgrund der relativ niedrigen Dichte (0,93-0,97 g/cm<sup>3</sup>) in Wasser bzw. Zellkulturmedium schwimmen.

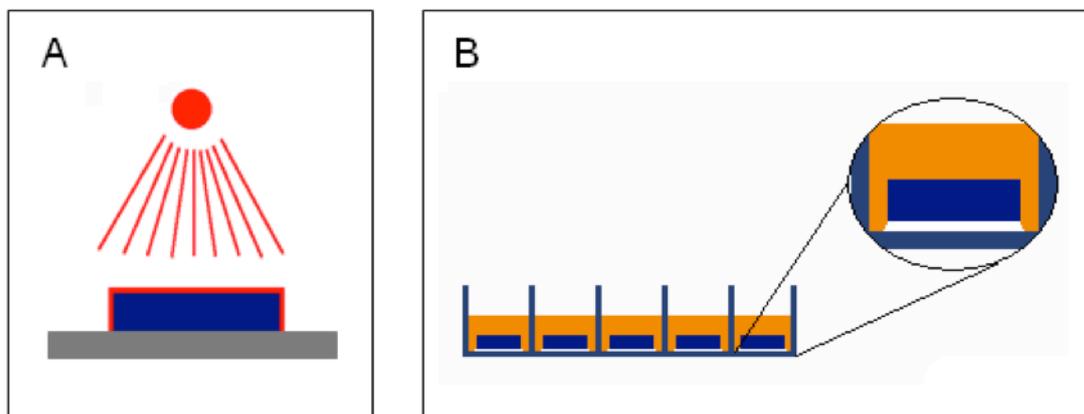


Abb. 9 Während der Ionenimplantation müssen die Probekörper auf eine Halterung befestigt werden. Dadurch kann auf die Unterfläche keine DLC-Schicht erzeugt werden (A). Vor Beginn der Versuche werden die Probekörper mit Paraffin in den Zellkulturwells geklebt, um die unbeschichtete Unterfläche zu isolieren (B)

### 3.2.3.1 Sterilisationsverfahren

Sterilisationsverfahren können die physikochemischen Eigenschaften von Werkstoffen verändern und dadurch die Interaktionen zwischen Zellen und deren Oberfläche beeinflussen. Daher wurde zu Beginn der mikrobiologischen Charakterisierung der Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren auf das Bakterienwachstum untersucht. Zylindrische Probekörper aus korundgestrahltem Ti6Al4V (d= 10 mm, h= 2 mm) mit und ohne DLC Beschichtung wurden mit den folgenden Verfahren sterilisiert:

- Autoklavieren (121 °C, 20 min, Varioklav, H+P Labortechnik)
- Gammasterilisation (26,5 kGy, Isotron Deutschland GmbH, Allershausen)
- Formaldehyd-Dampf (60 °C, 30 min, ZSVA Klinikum rechts der Isar)

- Sterilisation mit UV Strahlung (2 h, UV-Lichtquelle, Zellkulturbank Heracell, Heraeus)

Für den Vergleichstest wurde der klinisch relevante Bakterienstamm *S. epidermidis* ATCC35984 herangezogen. Die Probekörper wurden mit einer Bakteriensuspension von  $10^5$  KBE/ml in Zellkulturmedium (DMEM) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienwachstum über die Anzahl der KBE der adhärennten sowie planktonischen Bakterien ermittelt.

### **3.2.3.2 Testung von Sterilität und Zytokompatibilität des Paraffins**

Um überhaupt Paraffin in dem Versuchsaufbau einsetzen zu können, muss dieses zum einen steril sein, zum anderen darf es keine antimikrobiellen Eigenschaften aufweisen. Da histologisches Paraffin nicht steril angeboten wird, wurde das Paraffin in einem Glasbehälter autoklaviert (121 °C, 20 min, Varioklav, H+P Labortechnik) und bis zum Gebrauch bei 60 °C geschlossen aufbewahrt.

Die Testung der Sterilität und Kompatibilität erfolgte gleichzeitig in einem Versuchsaufbau (Abbildung 10). Die Sterilität vom Paraffin wurde getestet indem ein Paraffinfilm auf dem Boden der Zellkulturwells aufgetragen wurde, wobei native Wells als Kontrolle dienten. Alle Wells wurden mit Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS) befüllt. Für die Kompatibilitätstestung wurde der klinisch relevante Bakterienstamm *S. epidermidis* ATCC35984 herangezogen. In der ersten Testgruppe wurde ein Paraffinfilm auf dem Boden der Zellkulturwells aufgetragen. Als weitere Testgruppe wurde ein sterilisierter Probekörper (autoklaviert bei 121 °C, 20 min) aus Titan mit Paraffin in dem Well wie unter 3.2.3 beschrieben befestigt. Als Kontrolle diente ein Well ohne Fremdmaterial. Die Wells für diese drei Gruppen wurden mit einer Bakteriensuspension von  $10^5$  KBE/ml in Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS) befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurde das Bakterienwachstum über die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) der planktonischen Bakterien ermittelt.

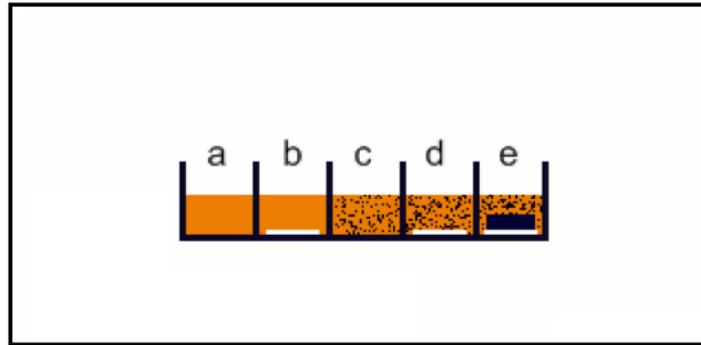


Abb. 10 Plattenbelegungsschema für den Sterilitäts- und Biokompatibilitätsversuch vom Paraffin. Well mit Medium (a), Well mit Paraffin und Medium (b), Well mit Bakteriensuspension in Medium (c), Well mit Paraffin und Bakteriensuspension in Medium (d), Well mit Paraffin, Titanprobekörper und Bakteriensuspension in Medium (e)

### 3.2.4 Herstellung der Bakteriensuspension

Für die standardisierte Durchführung der Versuche galt es im ersten Schritt eine Bakteriensuspension mit einer definierten Keimdichte von etwa 100.000 KBE/ml als Ausgangslösung herzustellen. Dazu wurden am 1. Versuchstag einige Kolonien der Dauerkultur aus dem Kühlschrank auf Columbia Agar frisch angesetzt und für 24 Stunden bei 37°C angezüchtet. Am folgenden Tag wurden mittels einer sterilen Impföse etwa 3-4 Kolonien gleicher Größe von der Agarplatte entnommen und in ein steriles Reagenzglas überführt, welches 5 ml Nährmedium (DMEM ohne Phenol + 10%FCS) enthielt. Zur Einstellung der Keimdichte (KBE/ml) diente dabei der McFarland Standard, ein Verfahren um die Trübheit einer Bakteriensuspension einzustellen. Es wurden so viele Kolonien der Blutagarkultur mit der Impföse in das Reagenzglas übertragen bis sich eine Trübheit von 0,5 McFarland (McF) Einheiten einstellte (MacFarland Densimat™). Zusätzlich wurde anschließend 1 ml der Bakteriensuspension mit einem Messwert von  $\text{McF} = 0,5$  in eine Küvette pipettiert und die optische Dichte bei 600µm Wellenlänge (OD600) bestimmt (GeneQuant pro™ UV/Vis Spektrophometer). Durch die zusätzliche photometrische Bestimmung, welche ein genaueres Verfahren ist um die Dichte einer Lösung zu bestimmen, konnte die Schwankbreite der Keimdichte der Bakteriensuspension noch weiter verringert werden.

Bei zahlreichen Vorversuchen zur Einstellung der Keimdichte konnte so bei einem McFarland Wert von 0,5 und einem schmalen Korridorbereich für die OD600 eine stabile Keimdichte in der Bakteriensuspension bestimmt werden, die keimabhängig war und nun durch weitere Zugabe von Nährmedium auf etwa 100.000 KBE/ml verdünnt werden konnte.

#### **3.2.4.1 Bestimmung der Keimdichte**

Zur Bestimmung der Keimdichte (KBE/ml) wurden 100 µl der jeweiligen Bakteriensuspension auf Columbia Blutagarplatten ausgestrichen und für 24h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurden die gebildeten Kolonien auf einer Agarplatte gezählt und die Anzahl auf den Milliliter hochgerechnet angegeben (KBE/ml). Im Allgemeinen musste die Bakterienlösung zuerst verdünnt werden um einen Bakterienrasen auf den Agarplatten bei der Auszählung zu vermeiden. Dazu wurden Verdünnungsreihen verwendet und die Proben in Zehnerpotenzen soweit verdünnt, dass sich für die Auswertung der KBE etwa 25 bis 250 Kolonien pro Nährplatte befanden und somit mit dem bloßen Auge leicht zu zählen waren. Für die erste Verdünnungsstufe V1 (1:10) wurden 100 µl der Bakteriensuspension in ein mit 900µl PBS gefülltes Eppendorf-Gefäß pipettiert und gut vermischt (Vortex, REAX 2000). Für die zweite Verdünnungsstufe V2 (1:100) wurden 100µl der Verdünnung V1 in ein weiteres, mit 900µl PBS gefülltes Eppendorf-Gefäß, pipettiert und wiederum gut vermischt. Diese Reihe ließ sich bis zu einer bestimmten Verdünnung fortführen: V3 (1:1.000), V4 (1:10.000), V5 (1:100.000), V6 (1:1.000.000), V7 (1:10.000.000). Von der gewünschten Verdünnungsstufe wurden dann 100 µl auf einer Blutagarplatte ausplattiert und für 24 Stunden bebrütet. Nach Auszählung der gebildeten Kolonien ließ sich die Bakteriendichte (KBE) dann wieder auf den Milliliter hochgerechnet bestimmen.

#### **3.2.4.2 Einstellung der Keimdichte für *S. epidermidis* ATCC35984**

In der angesetzten Bakteriensuspension bei McF = 0,5 und einer photometrisch bestimmten optischen Dichte von  $0,063 \pm 0,002$ , gemessen bei 600 Nanometer Wellenlänge (OD600, GeneQuant *pro*<sup>TM</sup> UV/Vis Spektrophometer), befanden sich im Mittel etwa  $3,7 \times 10^7$  KBE/ml. 1 ml der Suspension wurden daraufhin zusammen mit 3 ml Nährmedium (DMEM ohne Phenol + 10% FCS) in ein Falcon BLUE MAX<sup>TM</sup> 15 ml konisches Röhrchen gefüllt und vermischt (Vortex, REAX 2000). Zur weiteren Verdünnung wurden aus dieser Mischung 200 µl entnommen und zu 19,8 ml Nährmedium in einem 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und erneut vermischt. Dies ergab 20 ml Bakterienkonzentration mit etwa 100.000 KBE *S. epidermidis*/ml Medium. Die Keimdichte der Bakteriensuspension wurde bei jedem Versuchsdurchgang vor der Inkubation der Proben bestimmt.

#### **3.2.4.3 Einstellung der Keimdichte für *S. aureus* ATCC259231**

Die Bakteriensuspension mit *Staphylococcus aureus* enthielt bei einem McFarland Wert von 0,5 und einer optischen Dichte von  $0,063 \pm 0,002$ , gemessen bei 600 Nanometern, durchschnittlich  $9,2 \times 10^7$  KBE/ml Nährmedium. Um wiederum 20 ml Bakteriensuspension mit einer Keimdichte von etwa 100.000 KBE/ml herzustellen wurde 1 ml der Suspension mit 9 ml Nährmedium in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vermischt. Davon wurden 200 µl entnommen und zu 19,8 ml Nährmedium in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert.

#### **3.2.4.4 Einstellung der Keimdichte für *P. aeruginosa* ATCC27853**

Der klinisch bedeutende Keim *Pseudomonas aeruginosa* hatte bei einem McFarland Wert von 0,5 und einer optischen Dichte von  $0,064 \pm 0,002$  bei 600 Nanometern ein Wachstum von durchschnittlich  $7,6 \times 10^7$  KBE/ml. Zu 1 ml dieser Bakterienlösung wurden 6 ml Nährmedium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und vermischt. Anschließend wurden 200 µl mit der Pipette entnommen und zu 19,8 ml Nährmedium in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und erneut vermischt. Die eingestellte Bakterienkonzentration betrug etwa 100.000 KBE/ml.

#### **3.2.5 Inokulation der Proben mit Bakterien**

Die Testplättchen wurden unter der Zellkulturbank (Heracell, Heraeus) aus ihrer sterilen Verpackung entnommen und wie unter 3.2.3 beschrieben, in eine 24er Wellplatte (Becton Dickinson Labware) überführt.

Nach Eintrocknen des Paraffins wurde jeweils 1 ml der frisch angesetzten Bakteriensuspension (100.000 KBE/ml) pro Well pipettiert, in dem sich ein Probekörper befand und die 24er Wellplatte daraufhin verschlossen bei 37° Celsius für 24 Stunden bebrütet.

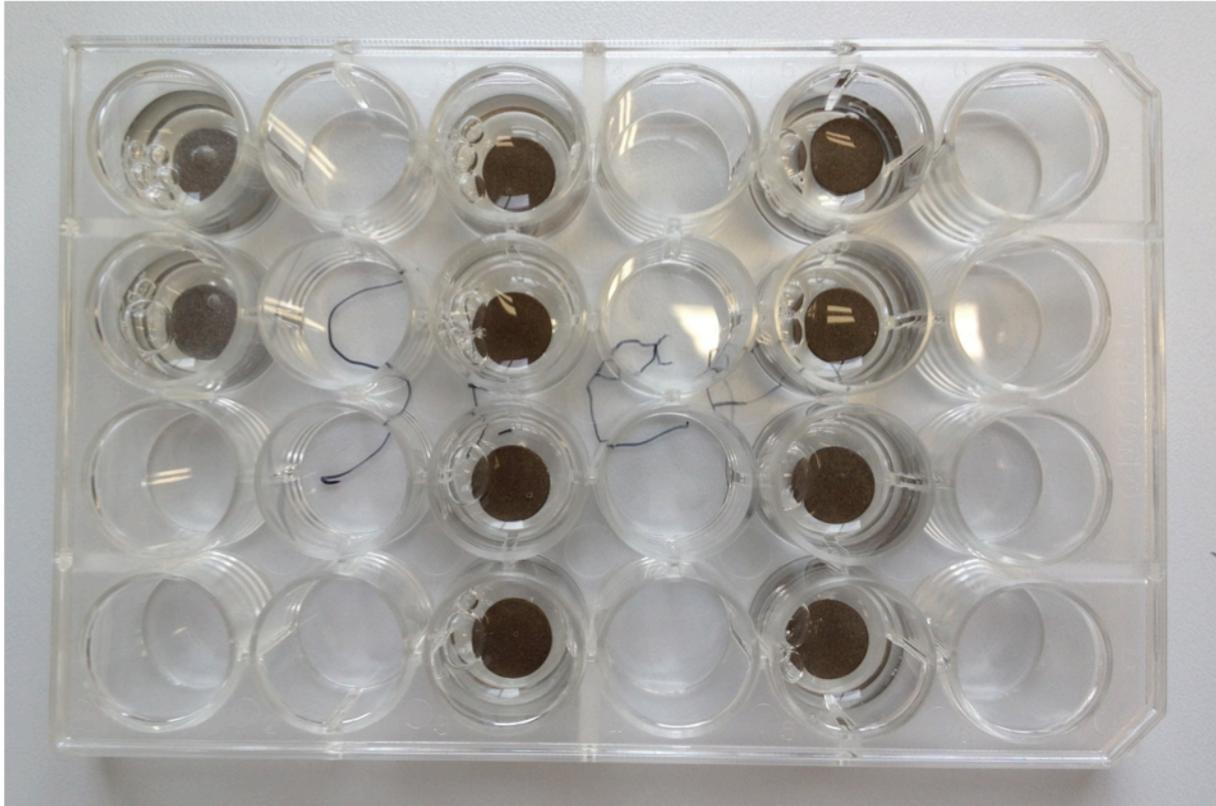


Abb. 11 24er Wellplatte mit Probekörpern und jeweils 1 ml der Bakteriensuspension vor der 24 stündigen Bebrütung bei 37° Celsius

### **3.2.6 Auswertung**

Das bakterielle Wachstum wurde nach einem Tag im Brutschrank in zweierlei Hinsicht ausgewertet:

- Das planktonische Wachstum der Bakterien im Nährmedium wurde gemessen und mit der Keimkonzentration vor Inkubation verglichen (Kulturmedium).
- Die klinisch wichtige Besiedelung der Keime an der Oberfläche der Probekörper wurde bestimmt, welche zu Beginn des Versuchs steril waren (Oberflächenadhäsion).

#### **3.2.6.1 Auswirkung freigesetzter Ionen auf die Bakteriendichte in der Suspension (Kulturmedium)**

Mit einer Pipette wurden 700 µl der Bakteriensuspension nach mehrmaligem Aufziehen der Pipette zur Durchmischung der Suspension aus dem Well entnommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben, gefüllt mit 700 µl Neutralisationslösung. Die Neutralisationslösung bindet die von der Beschichtung in die Suspension abgeschiedenen Silber-/Kupferionen und beendet damit die antimikrobielle Wirkung dieser Ionen im Medium [Tilton & Rosenberg 1978]. Das Gemisch wurde gevortext

und vor der Ausplattierung auf Columbia Blutagarplatten anhand der unter 3.2.4.1 beschriebenen Methode verdünnt. Nach 24 stündiger Bebrütung bei 37°C konnten die Kolonie bildenden Einheiten auf der Agarplatte gezählt und auf den Milliliter Medium hochgerechnet, angegeben werden.

### **3.2.6.2 Bakterienadhäsion an der Probekörperoberfläche (Oberflächenadhäsion)**

Nach Entnahme der Bakteriensuspension aus dem Well wurde der Probekörper mit einer sterilen Pinzette (121 °C, 20 min, Varioklav, H+P Labortechnik) durch leichten Druck vom Boden gelöst und anschließend zwei Mal in sterilem PBS gespült. Dazu wurde die Probe kurz nacheinander in zwei Wells einer weiteren 24er Wellplatte eingelegt, jeweils mit 1 ml PBS gefüllt, und leicht in der Flüssigkeit bewegt um nichtadhärente Bakterien zu entfernen. Anschließend wurde der Probekörper zu 3 ml sterilem PBS in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und dieser in ein Ultraschallbad (Elmasonic) gelegt. Es folgte eine siebenminütige Behandlung des Probekörpers bei Raumtemperatur mit einer Frequenz der Ultraschallwellen von 37 kHz, wodurch die adhärennten Bakterien von der Oberfläche gelöst wurden. Aus der Salzlösung (PBS) wurden nach mehrfachem schütteln und vortexen 100 µl mit einer Pipette entnommen und entweder direkt oder nach Verdünnung auf einer Blutagarplatte ausplattiert und im Anschluss für 24 Stunden bei 37° Celsius bebrütet. Am nächsten Tag folgte die Auszählung der Kolonie bildenden Einheiten.

### **3.2.6.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Messwerte wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 22 der Firma IBM durchgeführt. Anhand nichtparametrischer Tests für unabhängige Stichproben erfolgte die Prüfung auf statistische Signifikanz der Ergebnisse (Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test). Hierbei wurden Werte mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

### **3.2.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilmbildung**

Als Referenzkeim diente der starke Biofilmbildner *S. epidermidis* RP62a, ein typischer Erreger Implantat-assoziiertes Infektionen. Die Herstellung der Bakteriensuspension unterscheidet sich im Vergleich zu den vorherigen Versuchen aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsanforderungen des Keimes.

#### **3.2.7.1 Herstellung der Bakteriensuspension**

Einige Kolonien einer Dauerkultur aus dem Kühlschrank wurden mit einer Impföse auf eine TSA Platte (mit 0,25% Glukose supplementiert) überführt und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Darauf wurden 2-3 Kolonien der TSA Platte in 5 ml TSB in einem Falcon-Röhrchen eingepflegt und wiederum bei 37 °C für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Lösung wurde anschließend 1:100 verdünnt, d.h. 50 µl der Lösung in ein neues Falcon-Röhrchen mit 5 ml TSB pipettiert und danach jeweils 1 ml der fertigen Suspension mit einer Keimdichte zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  KBE/ml zu einem Prüfkörper in eine 24er Wellplatte gegeben. Die Proben mit der Bakteriensuspension kamen im Anschluss für 24 Stunden in den Brutschrank bei 37°C.

#### **3.2.7.2 Fixierung der Präparate**

Die Prüfkörper wurden am nächsten Tag aus der Bakteriensuspension mit einer sterilen Pinzette herausgenommen und in frisch angesetzter Fixierlösung bei 4 °C für 24 Stunden eingelegt. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 15 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Dazu wurden sie jeweils in ein Well mit 1 ml destilliertem Wasser gelegt. Danach folgte die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (50-70%-80%-90%-100%) für jeweils 20 Minuten.

#### **3.2.7.3 Untersuchung des Biofilms**

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem ESEM der Experimentalphysik IV, Uni Augsburg. Die Präparate wurden aus der Alkohollösung genommen und auf einem Träger befestigt in die Vakuumkammer des Gerätes gebracht und mehrere Aufnahmen des gebildeten Biofilms bei 100 bis 5000facher Vergrößerung angefertigt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Sterilisationsverfahren

Es wurden drei unabhängige Versuchsdurchläufe durchgeführt ( $n = 2$ ). Alle getesteten Proben waren zu Beginn steril. Die Ergebnisse der vier verschiedenen verwendeten Sterilisationsverfahren in Bezug auf die Oberflächenadhäsion und das planktonische Wachstum nach 24 stündiger Inkubation mit *S. epidermidis* ATCC 35984, können der Abbildung 12 entnommen werden. Es zeigte sich kein relevanter Einfluss des Sterilisationsverfahren auf das bakterielle Wachstum.

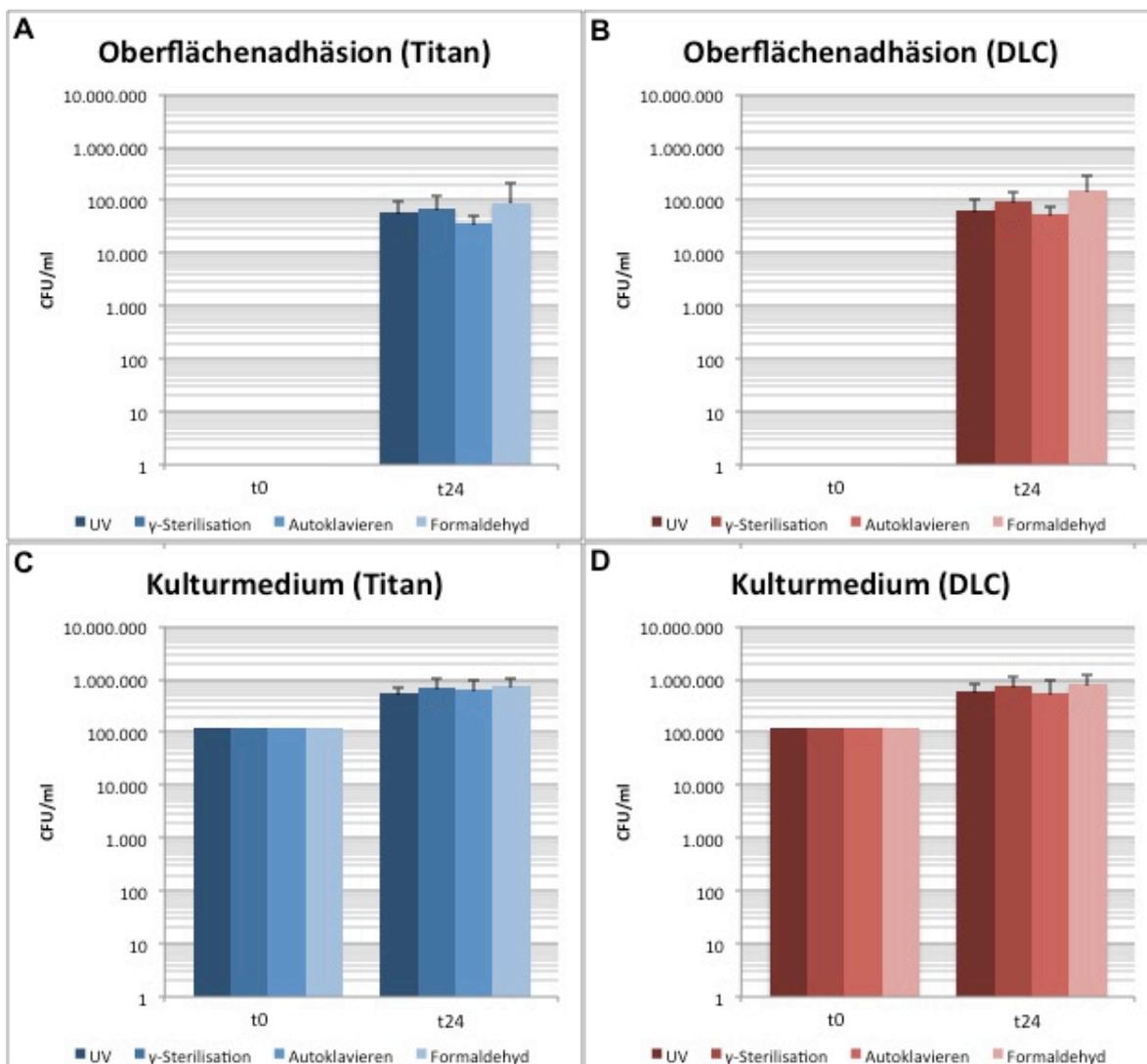


Abb. 12 Adhärentes Wachstum von *S. epidermidis* auf Titan (A) und DLC (B) sowie planktonisches Wachstum in Kontakt zu Titan (C) und DLC (D) nach unterschiedlichen Sterilisationsverfahren. Die Graphiken zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

## 4.2 Optimierung des Testsystems

In zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils vier Proben konnte kein Bakterienwachstum in den paraffinbeschichteten Wells nach Inkubation mit Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Daher stellte sich das Autoklavieren als geeignete Methode zur Sterilisation von histologischem Paraffin heraus. Zudem wurde kein Unterschied im Bakterienwachstum in den Wells ohne Paraffinbeschichtung, mit Paraffinbeschichtung sowie mit Titanprobekörper und Paraffin festgestellt. Somit zeigte sich Paraffin im Rahmen dieses Versuchsaufbaus als nicht zytotoxisch gegenüber *S. epidermidis*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst.

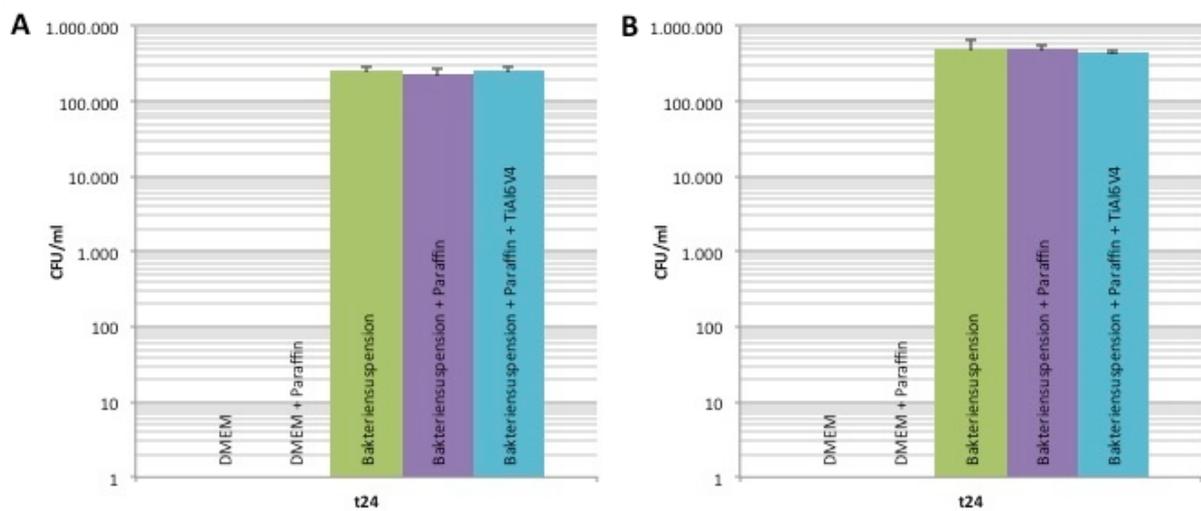


Abb. 13 Mittelwerte + Standardabweichungen des ersten (A) und zweiten (B) Versuchs (jeweils  $n = 4$ ). Kein Bakterienwachstum in den paraffinbeschichteten Wells inkubiert mit Zellkulturmedium. Kein Unterschied im Bakterienwachstum in den Wells ohne Paraffinbeschichtung, mit Paraffinbeschichtung sowie mit Titanprobekörper und Paraffin.

### 4.3 Einstellung der Keimdichte der Bakteriensuspension

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Einstellung einer konstanten Konzentration von etwa 100.000 KBE/ml in der Bakteriensuspension zeigt Abbildung 14. Die dargestellten Werte der optischen Dichte entsprechen einem McFarland Wert von 0,5. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde bei *S. epidermidis* und *S. aureus* eine optische Dichte von  $0,063 \pm 0,002$  und bei *P. aeruginosa* von  $0,064 \pm 0,002$  verwendet.

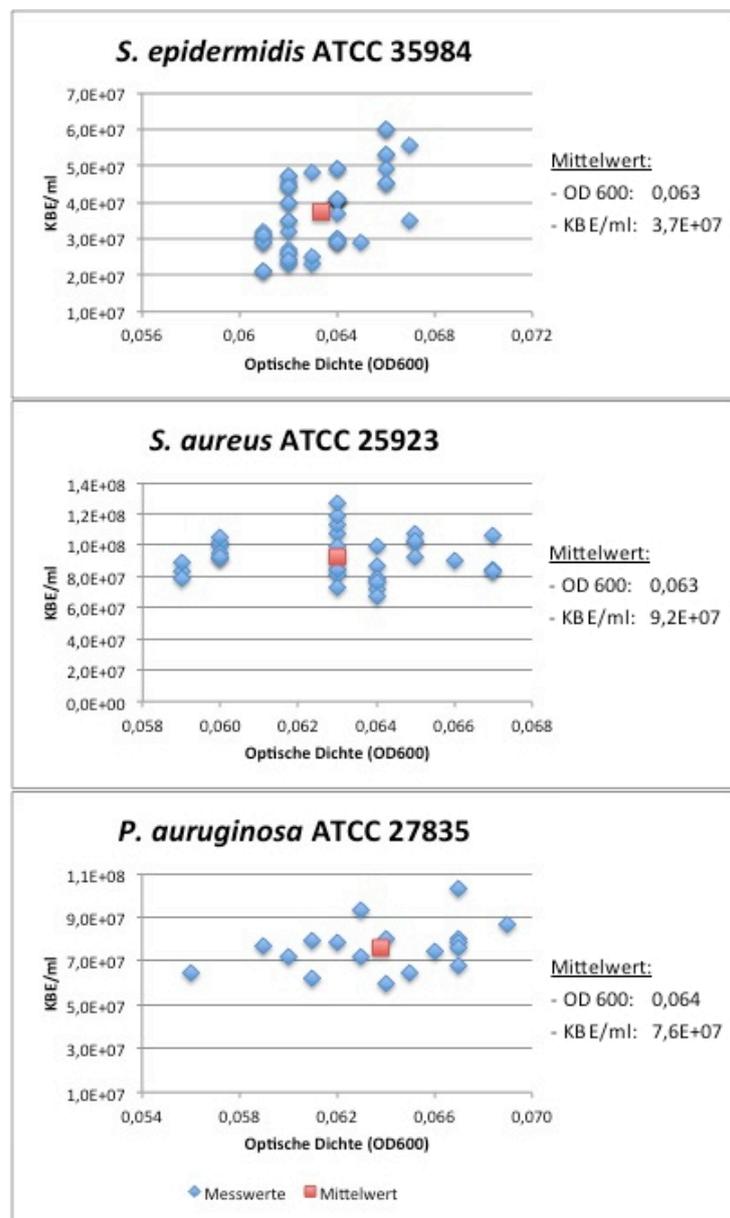


Abb. 14 Ergebnisse der Vorversuche zur Einstellung einer konstanten bakteriellen Ausgangssuspension. Die Tabellen zeigen die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) bei einem McFarland-Wert von  $McF=0,5$ . Ausgehend von einem bestimmten Wert für die optischen Dichte konnte die durchschnittliche Keimdichte der Suspension abgeschätzt und ein Verdünnungsfaktor bestimmt werden um eine Konzentration von 100.000 KBE/ml in der Suspension zu erhalten.

## 4.4 Testung der antibakteriellen Wirksamkeit von silberhaltigen DLC-Beschichtungen auf Titan

Wie bereits unter 3.2.5 beschrieben wurden die verschiedenen Prüfkörper mit jeweils 1 ml der mit etwa 100.000 KBE infizierten Nährlösung für 24 Stunden inkubiert. Für den Vergleichstest wurden die klinisch relevanten Bakterienstämme *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 herangezogen und anschließend das Keimwachstum auf der Probenoberfläche sowie im umgebenden Nährmedium quantifiziert. Es wurden je vier unabhängige Versuchsdurchläufe mit jeweils vier Proben durchgeführt.

Die Oberflächenbesiedelung wird als Anzahl anhaftender Bakterien pro Prüfkörper angegeben. Für die Berechnung wurde zuerst die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten einer Verdünnungsstufe mit dem Faktor der Verdünnung multipliziert. Anschließend wurde das Ergebnis noch verdreifacht, da die ultraschallvermittelte Ablösung der Keime von den Testplättchen in 3 ml PBS erfolgte.

### 4.4.1 Proben mit höherer Silberkonzentration

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen zuerst ein unterschiedlich starkes Wachstum der verschiedenen Bakterienstämme unter den gegebenen Bedingungen auf einheitlichen Oberflächen ohne Silbergehalt. Auf Titan adhärten im Schnitt  $2,1 \times 10^5$  Erreger des *S. epidermidis*,  $7,3 \times 10^6$  Keime *S. aureus* sowie  $1,6 \times 10^6$  Erreger vom Typ *P. aeruginosa*.

Auf allen silberdotierten Beschichtungen ließ sich eine signifikante und klinisch relevante Verminderung des Bakterienwachstums um mehrere Logarithmusstufen (lg-Stufen) im Vergleich zu den nicht silberhaltigen Oberflächen beobachten (siehe Abbildung 15).

Im Vergleich zu den unbeschichteten Titanoberflächen war die KBE-Anzahl von *Staphylococcus epidermidis* sowohl auf Ag:PVP 1:2 als auch auf Ag:PVP 1:1 um 4,4 lg-Stufen reduziert. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *Staphylococcus aureus* eine etwas schwächere Reduktion der KBE, um 2,6 lg-Stufen auf den Ag:PVP 1:2 Proben und um 4,2 lg-Stufen auf Ag:PVP 1:1. Die Oberflächenadhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* war auf den Ag:PVP 1:2 Oberflächen um 5,6 lg-Stufen reduziert und damit von allen drei Testkeimen am stärksten. Da sich in weiteren

werkstofftechnischen Versuchen der Universität Augsburg, Experimentalphysik IV, die Ag:PVP 1:1-Beschichtung als nicht ausreichend stabil erwies, wurde sie für die mikrobielle Untersuchung nicht mehr verwendet. Die bakterielle Oberflächenadhäsion wies auf den reinen DLC-Beschichtungen keimabhängig geringe und klinisch nicht relevante Unterschiede im Vergleich zur unbeschichteten Titanfläche auf. Während *S. epidermidis* eine leicht verstärkte Adhäsion aufwies (+ 0,2 Ig-Stufen), war die Besiedelung durch *S. aureus* auf beiden Oberflächen in etwa gleich stark (+ 0,03 Ig-Stufen). Die Anhaftung von *P. aeruginosa* zeigte sich auf reinem DLC hingegen leicht vermindert (- 0,09 Ig-Stufen).

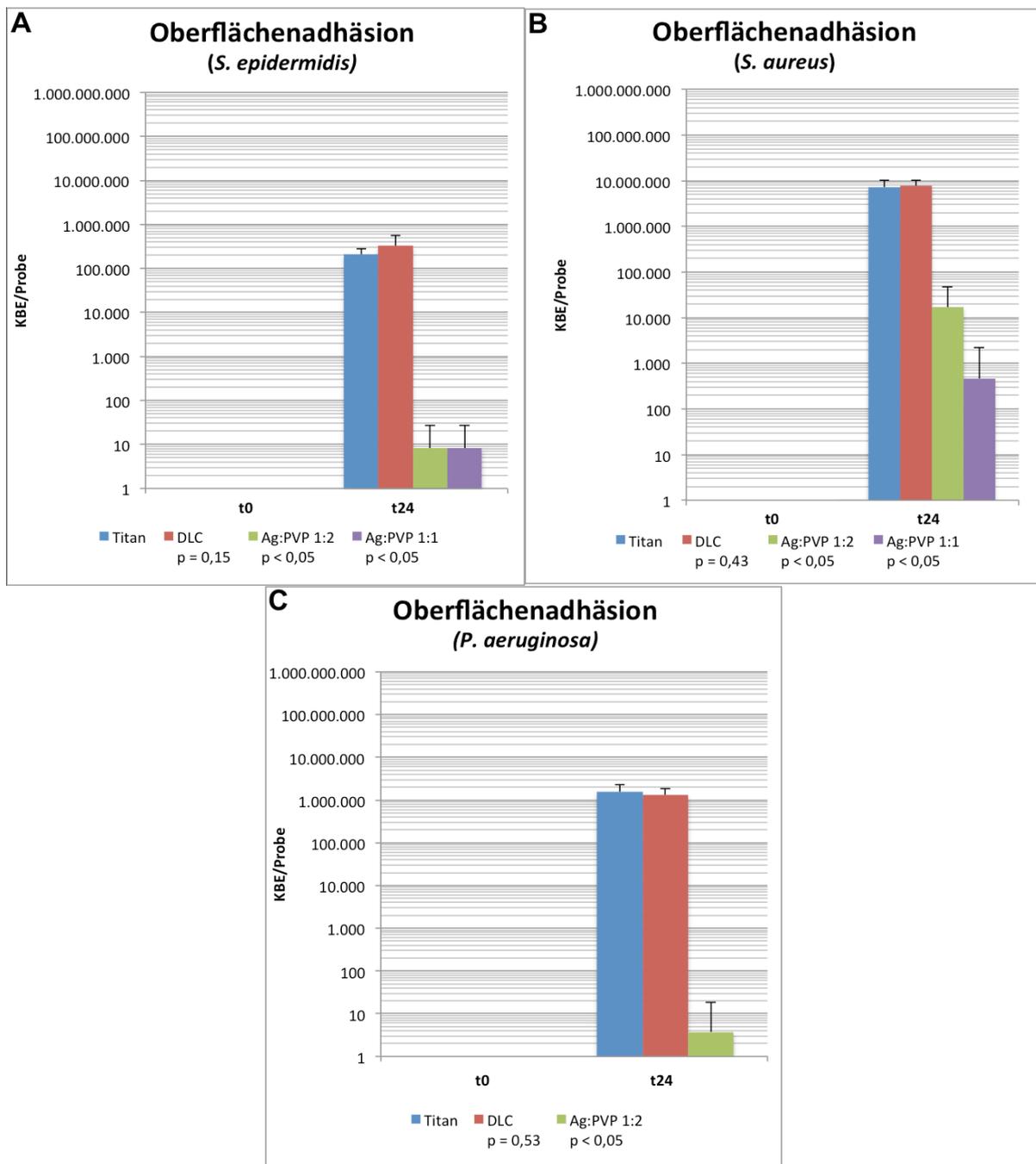


Abb. 15 Vergleich des Bakterienwachstums von *S. epidermidis* (A), *S. aureus* (B) und *P. aeruginosa* (C) auf Titan, DLC-beschichteten Titan und Silber-DLC-beschichteten Titan zur Zeit t=0 und t=24h

Auch im Kulturmedium zeigte sich das unterschiedlich starke Wachstumsverhalten der drei verschiedenen Keime. Die Ausgangssuspension von 100.000 KBE/ml verdichtete sich nach 24-stündiger Bebrütung in der Titan-Kontrollgruppe, ohne antimikrobiell wirksame Substanzen, bei *S. epidermidis* auf  $4,5 \times 10^5$  KBE/ml, bei *S. aureus* auf  $1,1 \times 10^8$  KBE/ml und bei *P. aeruginosa* auf  $2,4 \times 10^8$  KBE/ml. Für die silberfreie DLC-Beschichtung ergaben sich ähnliche Wachstumswerte im Nährmedium wie bei den Titanproben. Bei *S. epidermidis* war die Keimdichte 0,3 lg-

Stufen höher, bei *S. aureus* 0,1 lg-Stufe niedriger und bei *P. aeruginosa* war der Unterschied kaum zu sehen (-0,06 lg-Stufen).

Neben der Reduktion der bakteriellen Adhäsion zeigte sich auch im Kulturmedium eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums silberhaltiger DLC-Oberflächenmodifikationen (siehe Abbildung 16). Somit wurde die antibakterielle Wirkung nicht nur in direktem Oberflächenkontakt nachgewiesen, sondern es wurden auch antibakteriell wirksame Mengen an Silberionen in das umgebende Nährmedium freigesetzt.

Bei *S. epidermidis* zeigte sich in Gegenwart der Beschichtung vom Typ Ag:PVP 1:2 eine Reduktion um 2,8 lg-Stufen und bei Ag:PVP 1:1 um 3,1 lg-Stufen im Vergleich zu den unbeschichteten TiAl6V4-Oberflächen. Bei *S. aureus* bewirkte die Ag:PVP 1:2 eine Reduktion der KBE/ml um 2,5 lg-Stufen und die Ag:PVP 1:1 von 4,8 lg-Stufen. Der *P. aeruginosa* Keim zeigte bei der Ag:PVP 1:2 Beschichtung eine Reduktion der Bakteriendichte um 5,5 lg-Stufen. Damit ergab sich für *Pseudomonas aeruginosa* als gram-negativen Keim einerseits das stärkste Wachstum auf der Probenoberfläche sowie im Kulturmedium, andererseits zeigte sich der höchste silberioneninduzierte antimikrobielle Effekt.

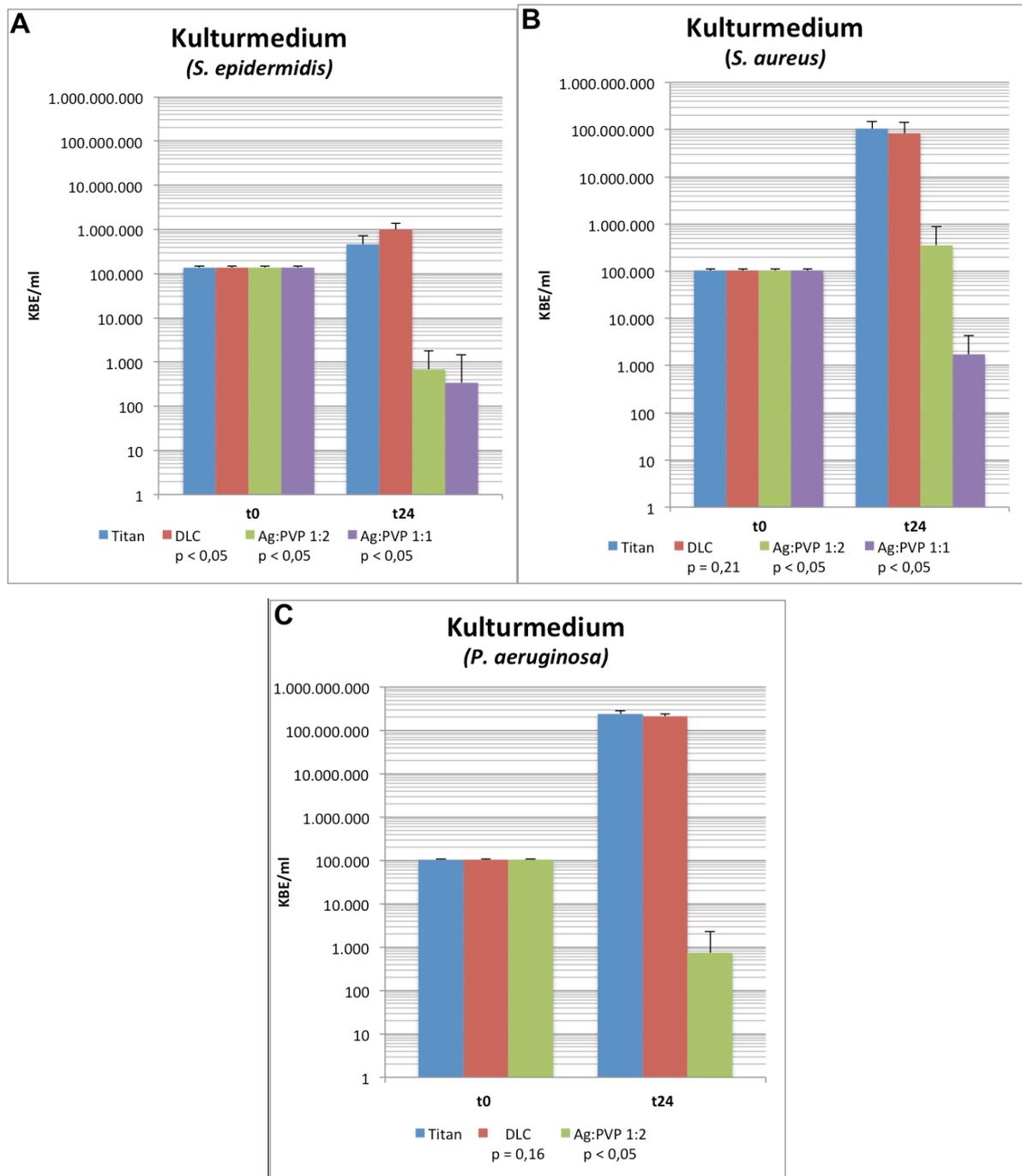


Abb. 16 Vergleich des Bakterienwachstums im Kulturmedium von *S. epidermidis* (A), *S. aureus* (B) und *P. aeruginosa* (C) bei Titanprobekörpern, DLC-beschichteten Probekörpern und Silber-DLC-beschichteten Probekörpern zur Zeit t=0 und t=24h

#### 4.4.2 Proben mit geringerer Silberkonzentration

Zur Reduktion der Zytotoxizität und Nachweis der minimal notwendigen Silberionenkonzentration in den Oberflächen wurden als weitere Prüfobjekte Testkörper untersucht, die im Verhältnis Ag:PVP 1:10 sowie 1:20 beschichtet wurden. Als Testkeim wurde *S. epidermidis* (ATCC 35984,  $10^5$  KBE/ml) eingesetzt. Bei einem Ag:PVP Verhältnis von 1:10 und 1:20 war die bakterizide Wirkung deutlich

geringer ausgeprägt, als bei Ag:PVP 1:1 und 1:2. Dennoch konnte auch mit der niedrigeren Silberkonzentration eine signifikante antibakterielle Wirkung in Bezug auf Oberflächenbesiedelung und das Bakterienwachstum im Nährmedium erreicht werden. Die bakterielle Oberflächenadhäsion zeigte sich bei der Ag:PVP 1:20 Beschichtung um 0,7 Ig-Stufen und bei Ag:PVP 1:10 um 1,1 Ig-Stufen reduziert. Im Kulturmedium erfolgte eine Reduktion der Keimdichte bei Ag:PVP 1:20 um 0,3 Ig-Stufen und bei Ag:PVP 1:10 um 0,8 Ig-Stufen.

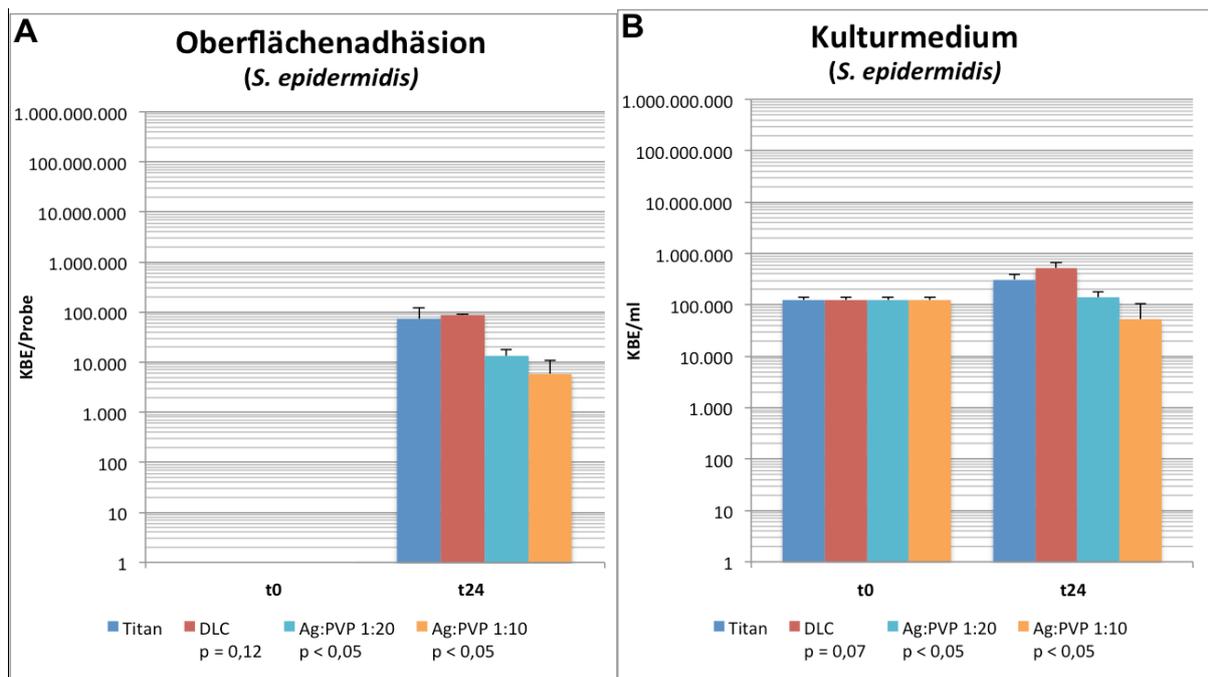


Abb. 17 Bakterienwachstum auf der Oberfläche der Prüfkörper (A) und im Medium (B) bei einem Beschichtungsverhältnis von Ag:PVP 1:10 und 1:20 zur Zeit t=0 und t=24h

Eine Reduktion um etwa 0,3 Ig-Stufen spricht für eine Halbierung der Bakterienzellzahl (KBE). Die Tabellen 4, 5 und 6 fassen die Ergebnisse der silberhaltigen DLC-Schichten auf Titan in Bezug auf den antimikrobiellen Effekt noch einmal übersichtlich zusammen. Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die verschiedenen Versuche signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Das Signifikanzniveau der jeweiligen Beschichtung im Vergleich gegenüber der unbeschichteten Titanprobe ist in der Tabelle wiedergegeben.

| <i>S. epidermidis</i>                      | Titan               | DLC                  | Ag:PVP 1:20          | Ag:PVP 1:10          | Ag:PVP 1:2           | Ag:PVP 1:1           |
|--|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Oberflächenadhäsion</b>                 |                     |                      |                      |                      |                      |                      |
| KBE/Probe                                  | 2,1x10 <sup>5</sup> | 3,3x10 <sup>5</sup>  | 1,3x10 <sup>4</sup>  | 5,9x10 <sup>3</sup>  | 8,1x10 <sup>0</sup>  | 8,1x10 <sup>0</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | +0,2                 | -0,7                 | -1,1                 | -4,4                 | -4,4                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 0,149                | 3,7x10 <sup>-4</sup> | 3,8x10 <sup>-4</sup> | 2,6x10 <sup>-6</sup> | 2,6x10 <sup>-6</sup> |
| <b>Kulturmedium</b>                        |                     |                      |                      |                      |                      |                      |
| KBE/ml                                     | 4,5x10 <sup>5</sup> | 1,0x10 <sup>6</sup>  | 1,4x10 <sup>5</sup>  | 5,2x10 <sup>4</sup>  | 6,9x10 <sup>2</sup>  | 3,4x10 <sup>2</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | +0,3                 | -0,3                 | -0,8                 | -2,8                 | -3,1                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 2,5x10 <sup>-4</sup> | 5,2x10 <sup>-4</sup> | 3,8x10 <sup>-4</sup> | 2,0x10 <sup>-6</sup> | 1,2x10 <sup>-6</sup> |

Tab. 4 Anzahl, logarithmische Veränderung und Signifikanz der KBE von *S. epidermidis* bei verschiedenen Oberflächen

| <i>S. aureus</i>                           | Titan               | DLC                 | Ag:PVP 1:2           | Ag:PVP 1:1           |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Oberflächenadhäsion</b>                 |                     |                     |                      |                      |
| KBE/Probe                                  | 7,3x10 <sup>6</sup> | 7,8x10 <sup>6</sup> | 1,7x10 <sup>4</sup>  | 4,7x10 <sup>2</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | +0,03               | -2,6                 | -4,2                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 0,428               | 2,1x10 <sup>-6</sup> | 8,3x10 <sup>-7</sup> |
| <b>Kulturmedium</b>                        |                     |                     |                      |                      |
| KBE/ml                                     | 1,1x10 <sup>8</sup> | 8,4x10 <sup>7</sup> | 3,6x10 <sup>5</sup>  | 1,7x10 <sup>3</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | -0,1                | -2,5                 | -4,8                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 0,213               | 3,2x10 <sup>-6</sup> | 2,1x10 <sup>-6</sup> |

Tab. 5 Anzahl, logarithmische Veränderung und Signifikanz der KBE von *S. aureus* bei verschiedenen Oberflächen

| <i>P. aeruginosa</i>                       | Titan               | DLC                 | Ag:PVP 1:2           |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Oberflächenadhäsion</b>                 |                     |                     |                      |
| KBE/Probe                                  | 1,6x10 <sup>6</sup> | 1,3x10 <sup>6</sup> | 3,8x10 <sup>0</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | -0,09               | -5,6                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 0,533               | 3,5x10 <sup>-7</sup> |
| <b>Kulturmedium</b>                        |                     |                     |                      |
| KBE/ml                                     | 2,4x10 <sup>8</sup> | 2,1x10 <sup>8</sup> | 7,4x10 <sup>2</sup>  |
| Veränderung gegenüber Titan (in Ig-Stufen) |                     | -0,06               | -5,5                 |
| p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test           |                     | 0,161               | 1,2x10 <sup>-6</sup> |

Tab. 6 Anzahl, logarithmische Veränderung und Signifikanz der KBE von *P. aeruginosa* bei verschiedenen Oberflächen

### 4.4.3 Rasterelektronenmikroskopie der Oberfläche

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Ag-dotierten DLC-Schichten die Biofilmbildung auf der Implantatoberfläche ebenfalls hemmen können. Dazu wurden die entsprechend modifizierten Titanprüfkörper mit *S. epidermidis* RP62a, einem starken Biofilmbildner, inkubiert, und die Biofilmbildung auf den Oberflächen qualitativ mittels ESEM analysiert. Die Abbildung 18 zeigt links oben die Aufnahme einer sterilen, korundgestrahlten Titanoberfläche. Nach 24 stündiger Inkubation bildete sich auf TiAl6V4 und reinem DLC ein flächendeckender, dichter, dreidimensionaler Biofilm aus. Dagegen zeigte sich bei der Ag:PVP 1:2 Oberfläche eine reduzierte Biofilmbildung mit lediglich punktueller Ausbildung von Biofilmwolken.

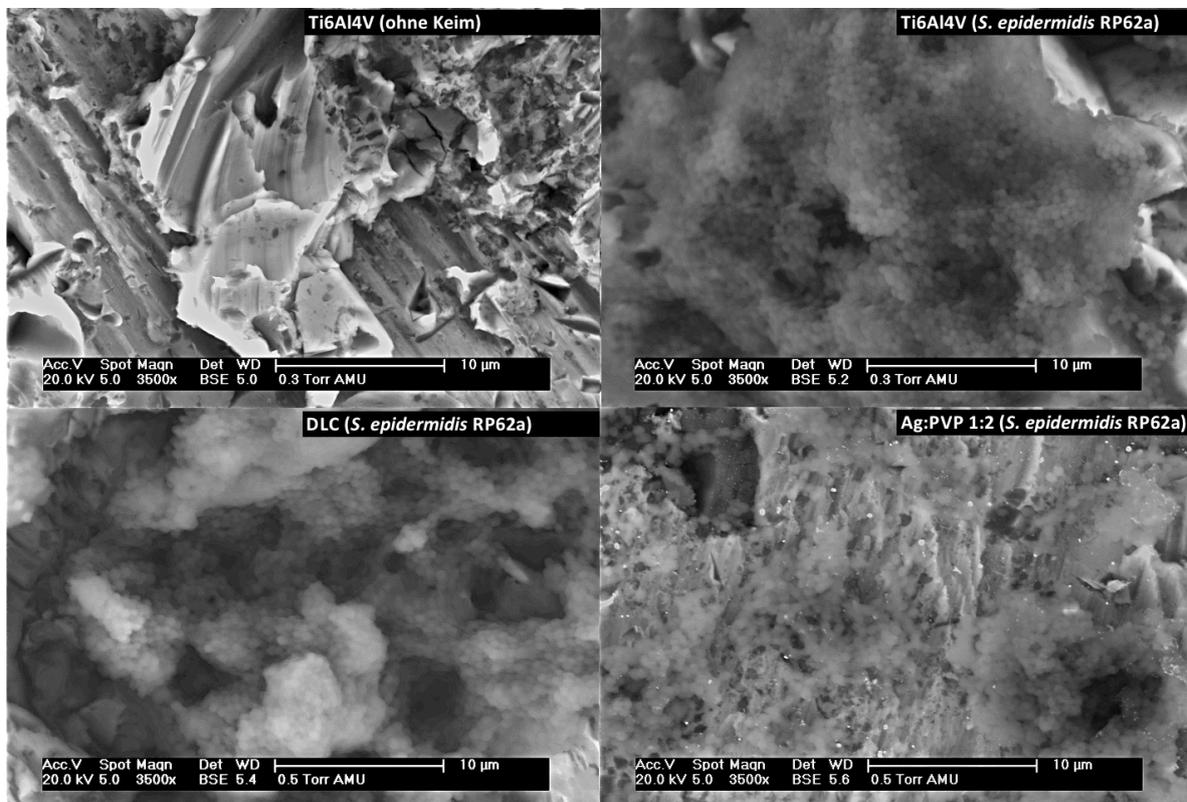


Abb. 18: Biofilmbildung auf der Oberfläche der Titanprüfkörper. Sterile, korundgestrahlte Ti6Al4V Oberfläche (links oben). Während sich auf Ti6Al4V (rechts oben) und reinem DLC (links unten) ein flächendeckender, dichter Biofilm ausbildete, zeigte sich auf Ag:PVP 1:2 beschichteten Proben (rechts unten) nur punktuell ein wolkiger Film

## **4.5 Testung der antibakteriellen Wirksamkeit von silber(kupfer-)haltigen DLC-Beschichtungen auf Polyethylen**

Für die antimikrobiellen Untersuchungen von DLC-Schichten auf Polyethylen (PE) wurden zylindrische Testkörper aus UHMWPE eingesetzt und diese durch die Ionenimplantation von Stickstoff und Silber bzw. Kupfer wie bereits beschrieben direkt zu DLC umgewandelt (siehe 3.2.1.2). Als Kontrolle wurde das unbehandelte Polymer verwendet. Als Testkeim diente *S. epidermidis* ATCC 35984 mit einer Suspension von  $10^5$  KBE/ml, die Inkubation erfolgte über 24 Stunden.

### **4.5.1 PE-Versuchsreihe 1**

Anhand verschiedener Implantationsparameter wurden in einer ersten Versuchsserie zunächst drei Ag-dotierte und eine Cu-dotierte DLC-Beschichtungen erzeugt. Die UHMWPE Umwandlung in DLC erfolgte in nur einem Schritt durch die Silberionenimplantation. Die Implantationsenergien lagen in dieser Versuchsreihe zwischen 100 keV und 55 keV bei konstanten Metallfluenzen von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  (Bei 80 keV Ag wurde später festgestellt, dass lediglich  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  implantiert wurden). Als Kontrolle wurde das unbehandelte Polymer verwendet. Als Testkeim diente *S. epidermidis* ATCC 35984 in einer Suspension von 100.000 KBE/ml, die Inkubation erfolgte über 24 Stunden. Im Gegensatz zu den silberdotierten Titanbeschichtungen zeigte sich bei den verwendeten Beschichtungen auf Polyethylen eine geringere antimikrobielle Wirksamkeit (siehe Abbildung 19).

Die Oberflächenadhäsion nahm bei den mit 100 keV implantierten Proben im Vergleich zu reinem Polyethylen um 0,25 lg-Stufen zu, bei 80 keV war sie in etwa gleich hoch (-0,02 lg-Stufen) und bei der kupferimplantierten Probe mit 55 keV verringerte sich die Adhäsion um 0,3 lg-Stufen. Lediglich bei einer Implantationsenergie von 60 keV konnte eine klinisch relevante Reduktion der bakteriellen Besiedelung um 0,8 log-Stufen erreicht werden.

Im Kulturmedium zeigte sich keine Reduktion des bakteriellen Wachstums, d.h. es ist davon auszugehen, dass nicht genügend antibakteriell wirksame Mengen an Silber- bzw. Kupferionen freigesetzt wurden. Bei den Proben mit 100 keV erhöhte sich die

Keimdichte im Nährmedium um 0,5 lg-Stufen. Bei 80 keV erhöhte sich das Wachstum um 0,3 lg-Stufen, bei 60 keV um 0,05 lg-Stufen sowie bei der kupferimplantierten 55 keV Probe um 0,03 lg-Stufen.

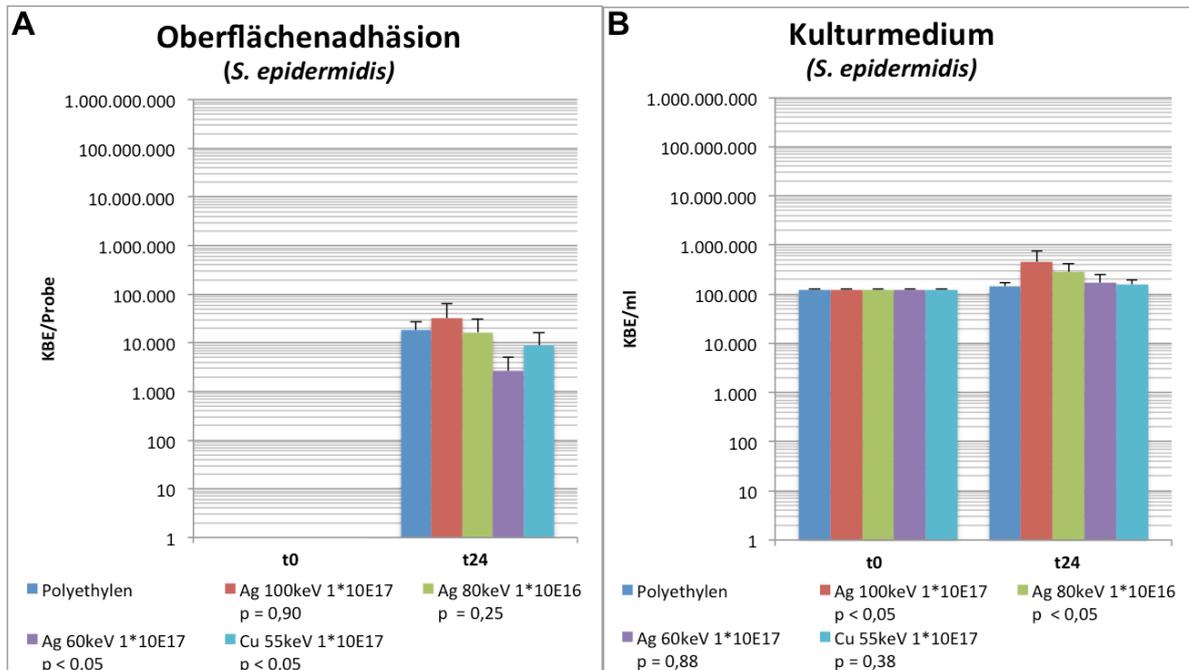


Abb. 19: Wachstum von *S. epidermidis* auf der PE-Prüfkörperoberfläche (A) und im Kulturmedium (B) bei verschiedenen Implantationsenergien von Silber- oder Kupferionen (PE-Versuchsreihe 1) zur Zeit t=0 und t=24h

#### 4.5.2 PE-Versuchsreihe 2

Nachdem in der ersten Versuchsreihe die mit niedrigeren Energien implantierten Silberionen bessere Ergebnisse zeigten, wurden in einer zweiten Versuchsreihe Prüfkörper untersucht, bei denen die Silberionen mit einer Implantationsenergie von 10 keV in das PE eingebracht wurden. Zusätzlich wurde die Oberfläche dieser Proben zuerst durch die Implantation von  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  Stickstoffionen (40 keV) zu DLC umgewandelt. Anschließend erfolgte die Implantation von Silber in drei verschiedenen Fluenzen von  $1 \cdot 10^{16}$ ,  $5 \cdot 10^{16}$  und  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ . *In vitro* zeigte sich nach analoger Inkubation dieser Testkörper mit *S. epidermidis* im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe eine deutliche und klinisch relevante Reduktion des Keimwachstums auf der Probenoberfläche. Bei einer Fluenz der Silberionen von  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  reduzierte sich die Anzahl adhätierender Bakterien um 0,03 lg-Stufen, bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  um 0,6 lg-Stufen sowie bei der höchsten Fluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  um 1,5 lg-Stufen.

Im Kulturmedium ließ sich nun ebenfalls eine Reduktion der Keimdichte/ml bei der Probe mit der höchsten Fluenz an Silberionen erkennen. Die Veränderung der

Anzahl von KBE/ml im Vergleich zu reinem Polyethylen ergab bei einer Fluenz von  $1 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  eine Steigerung um 0,3 Ig-Stufen, bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  eine Reduktion von 0,3 Ig-Stufen sowie bei der Fluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  eine Reduktion von 1,3 Ig-Stufen. (vergleiche Abbildung 20).

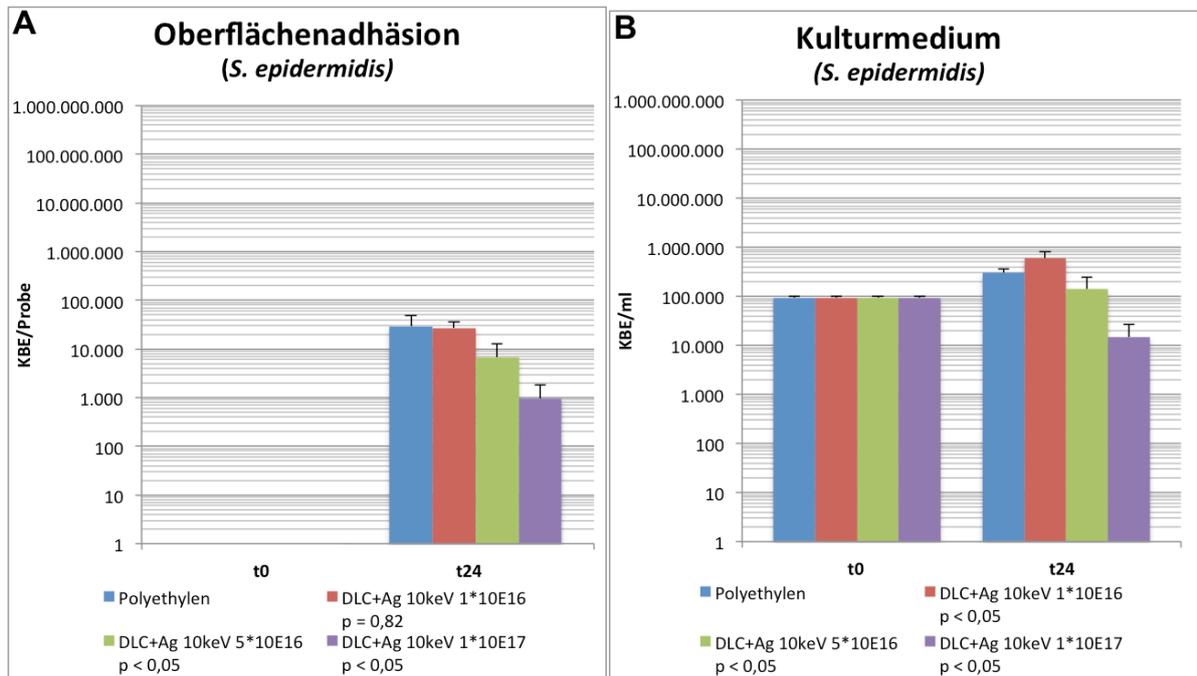


Abb. 20: Wachstum von *S. epidermidis* auf der PE-Prüfkörperoberfläche (A) und im Kulturmedium (B) bei DLC-Umwandlung durch Stickstoff-Implantation und anschließender Implantation von Silberionen bei 10 keV und verschiedenen Fluenzen (PE-Versuchsreihe 2) zur Zeit t=0 und t=24h

Die wesentlich niedrigere Implantationsenergie der 2. Versuchsreihe bewirkte, dass die Silberionen vermehrt an der Oberfläche des umgewandelten Polymers eingelagert wurden, wodurch sich die antimikrobielle Wirksamkeit deutlich verbesserte.

### 4.5.3 PE-Versuchsreihe 3

Der positive Effekt einer niedrigeren Implantationsenergie ließ sich anhand einer weiteren Versuchsserie belegen. Die Umwandlung der UHMWPE-Oberfläche in DLC erfolgte erneut direkt durch Silberimplantation. Es wurden Prüfkörper untersucht, bei denen die Silberionen mit Implantationsenergien von 20 keV und 10 keV in das Polyethylen eingebracht wurden. Zum Einsatz kamen dabei auch unterschiedliche Silberfluenzen (Ag 20 keV mit  $5 \cdot 10^{16}$  und  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  sowie Ag 10 keV mit  $5 \cdot 10^{16}$  und  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ , dabei konnte bei der letzten Probe eine Fluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$

aufgrund eines Ionenimplanterausfalls nicht erreicht werden). Zudem wurde eine UHMWPE-Vergleichsserie untersucht, welche mit einer Silberionenfluenz von  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  und einer Implantationsspannung von 5 kV mittels Plasmainmersions-Ionenimplantation hergestellt wurde.

Bei der Bestimmung der Oberflächenadhäsion zeigte sich bei allen untersuchten Proben eine Reduktion der Keimzahl. Bei den mit 20 keV implantierten Proben reduzierte sich die Anzahl adhärenter Keime bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  um 1 lg-Stufe und bei  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  um 1,3 lg-Stufen. Die mit 10 keV implantierten Proben zeigten bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  ebenfalls eine Reduktion um 1 lg-Stufe und bei  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  um 1,2 lg-Stufen.

Im Nährmedium zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei den mit 20 keV implantierten Proben reduzierte sich die Keimzahl/ml bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  um 0,4 lg-Stufen und bei  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$  um 0,6 lg-Stufen. Die mit 10 keV implantierten Proben zeigten bei einer Fluenz von  $5 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  eine Reduktion um 0,3 lg-Stufen und bei  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  um 0,6 lg-Stufen.

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Reduktion des bakteriellen Wachstums im Zusammenspiel von Implantationsenergie und Konzentration der Silberionen. Bei niedrigen Implantationsenergien, wie in diesem Fall 10 keV und 20 keV, scheint die Silberionenkonzentration den stärkeren Einfluss zu haben.

Bei der PIII-Methodik zeigte sich trotz vergleichbarer Silberfluenz eine noch stärkere Reduktion des bakteriellen Wachstums. Die bakterielle Oberflächenbesiedelung verringerte sich mit dieser Implantationsmethode um 2,2 lg-Stufen im Vergleich zum unbeschichteten PE, im Kulturmedium reduzierte sich das Bakterienwachstum ebenfalls relevant um 1,1 lg-Stufen (siehe Abbildung 21).

Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der metallionenhaltigen DLC-Oberflächen auf UHMWPE bezogen auf den antimikrobiellen Effekt noch einmal kurz zusammen. Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die verschiedenen Versuchsreihen signifikante Unterschiede. Das Signifikanzniveau der jeweiligen Beschichtung im Vergleich zu unbeschichtetem Polyethylen ist in der Tabelle wiedergegeben.

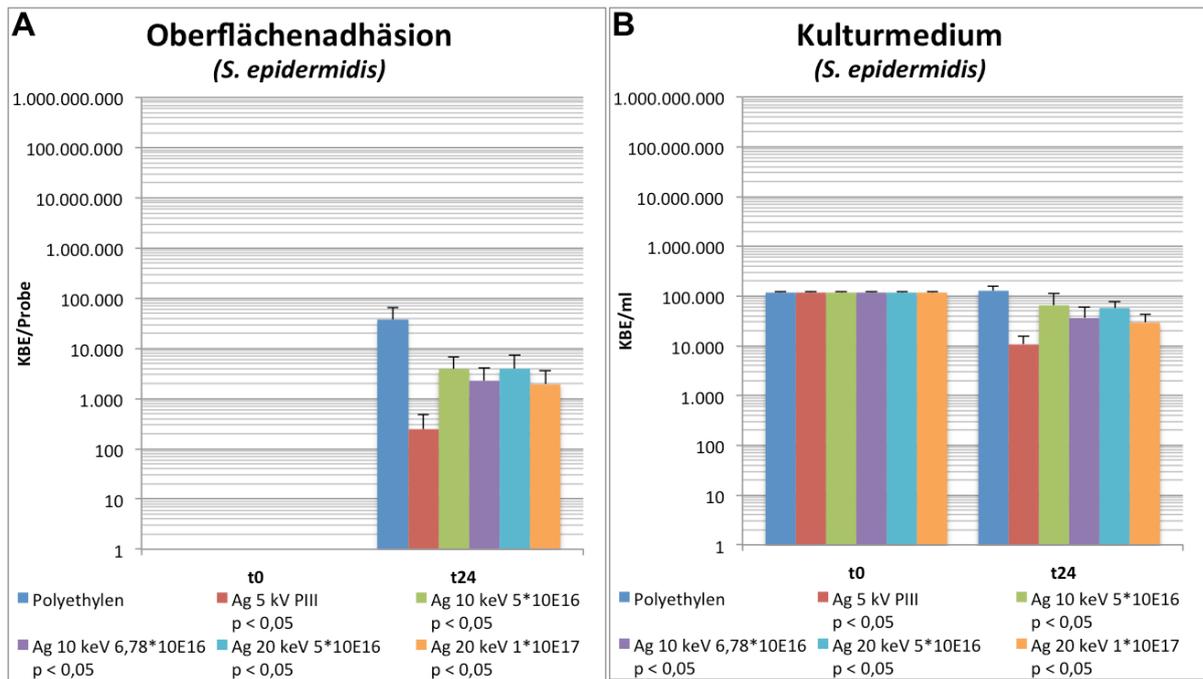


Abb. 21: Wachstum von *S. epidermidis* auf der PE-Prüfkörperoberfläche (A) und im Kulturmedium (B) bei verschiedenen Implantationsenergien und Fluenzen von Silberionen (PE-Versuchsreihe 3) zur Zeit t=0 und t=24h

| Beschichtung                        | Adhäsion<br>KBE/Probe | Adhäsion<br>Vergleich<br>zu PE<br>(in Ig-<br>Stufen) | p-Werte<br>nach<br>Mann-<br>Whitney-<br>U-Test | Kulturmedium<br>KBE/ml | Kulturmedium<br>Vergleich zu<br>PE<br>(in Ig-Stufen) | p-Werte<br>nach<br>Mann-<br>Whitney<br>-U-Test |
|-------------------------------------|-----------------------|--|--|------------------------|--|--|
| Ag 100 keV<br>1x10 <sup>17</sup>    | 3,2x10 <sup>4</sup>   | +0,25  | 0,901  | 4,5x10 <sup>5</sup>    | +0,5   | 4,1x10 <sup>-5</sup>                           |
| Ag 80 keV 1x10 <sup>16</sup>        | 1,7x10 <sup>4</sup>   | -0,02  | 0,252  | 2,8x10 <sup>5</sup>    | +0,3   | 8,0x10 <sup>-4</sup>                           |
| Ag 60 keV 1x10 <sup>17</sup>        | 2,6x10 <sup>3</sup>   | -0,8   | 4,8x10 <sup>-6</sup>                           | 1,7x10 <sup>5</sup>    | +0,05  | 0,884  |
| Cu 55 keV 1x10 <sup>17</sup>        | 9,0x10 <sup>3</sup>   | -0,3   | 0,005  | 1,6x10 <sup>5</sup>    | +0,03  | 0,379  |
| DLC+Ag 10 keV<br>1x10 <sup>16</sup> | 2,7x10 <sup>4</sup>   | -0,03  | 0,821  | 6,1x10 <sup>5</sup>    | +0,3   | 1,8x10 <sup>-5</sup>                           |
| DLC+Ag 10 keV<br>5x10 <sup>16</sup> | 6,8x10 <sup>3</sup>   | -0,6   | 1,5x10 <sup>-4</sup>                           | 1,4x10 <sup>5</sup>    | -0,3   | 3,6x10 <sup>-5</sup>                           |
| DLC+Ag 10 keV<br>1x10 <sup>17</sup> | 9,6x10 <sup>2</sup>   | -1,5   | 1,4x10 <sup>-6</sup>                           | 1,5x10 <sup>4</sup>    | -1,3   | 1,4x10 <sup>-6</sup>                           |
| Ag 20 keV 5x10 <sup>16</sup>        | 4,0x10 <sup>3</sup>   | -1,0   | 1,1x10 <sup>-3</sup>                           | 5,8x10 <sup>4</sup>    | -0,4   | 1,3x10 <sup>-3</sup>                           |
| Ag 20 keV 1x10 <sup>17</sup>        | 2,0x10 <sup>3</sup>   | -1,3   | 7,5x10 <sup>-4</sup>                           | 3,0x10 <sup>4</sup>    | -0,6   | 7,7x10 <sup>-4</sup>                           |
| Ag 10 keV 5x10 <sup>16</sup>        | 3,9x10 <sup>3</sup>   | -1,0   | 7,8x10 <sup>-4</sup>                           | 6,4x10 <sup>4</sup>    | -0,3   | 0,018  |
| Ag 10 keV<br>6,78x10 <sup>16</sup>  | 2,3x10 <sup>3</sup>   | -1,2   | 7,8x10 <sup>-4</sup>                           | 3,6x10 <sup>4</sup>    | -0,6   | 1,6x10 <sup>-3</sup>                           |
| Ag 5 kV PIII                        | 2,5x10 <sup>2</sup>   | -2,2   | 7,6x10 <sup>-4</sup>                           | 1,1x10 <sup>4</sup>    | -1,1   | 7,7x10 <sup>-4</sup>                           |

Tab. 7 Anzahl, logarithmische Veränderung und Signifikanz der KBE von *S. epidermidis* bei verschiedenen PE-Oberflächen

#### **4.5.4 Rasterelektronenmikroskopie der Oberfläche**

Äquivalent zu den Titanprüfkörpern wurde die Biofilmbildung durch *S. epidermidis* RP62a auch auf reinen und modifizierten PE-Proben untersucht. Zum Einsatz kamen silberhaltige DLC-Oberflächenmodifikationen der 2. und 3. PE-Versuchsreihe (Ag 5 kV PIII, Ag 10 keV mit  $1 \cdot 10^{16}$ ,  $5 \cdot 10^{16}$ ,  $6,78 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ ). Erneut war bei allen silberdotierten Oberflächen eine deutliche Hemmung der Biofilmbildung im Vergleich zum unmodifizierten Polyethylen zu beobachten. Anstatt eines zusammenhängenden, großen, dreidimensionalen Biofilms, wie er bei der unveränderten PE-Probe zu sehen war, zeigten sich kleinere, nicht konfluierende Bakterienwolken. Die qualitativ stärkste Reduktion zeigte sich bei der mit der PIII hergestellten Probe, die Ausbildung dreidimensionaler Formationen scheint am stärksten gehemmt zu sein, es zeigten sich lediglich vereinzelte dichtere Keimansammlungen auf der Oberfläche. Exemplarisch sind die Ergebnisse in Abbildung 22 dargestellt.

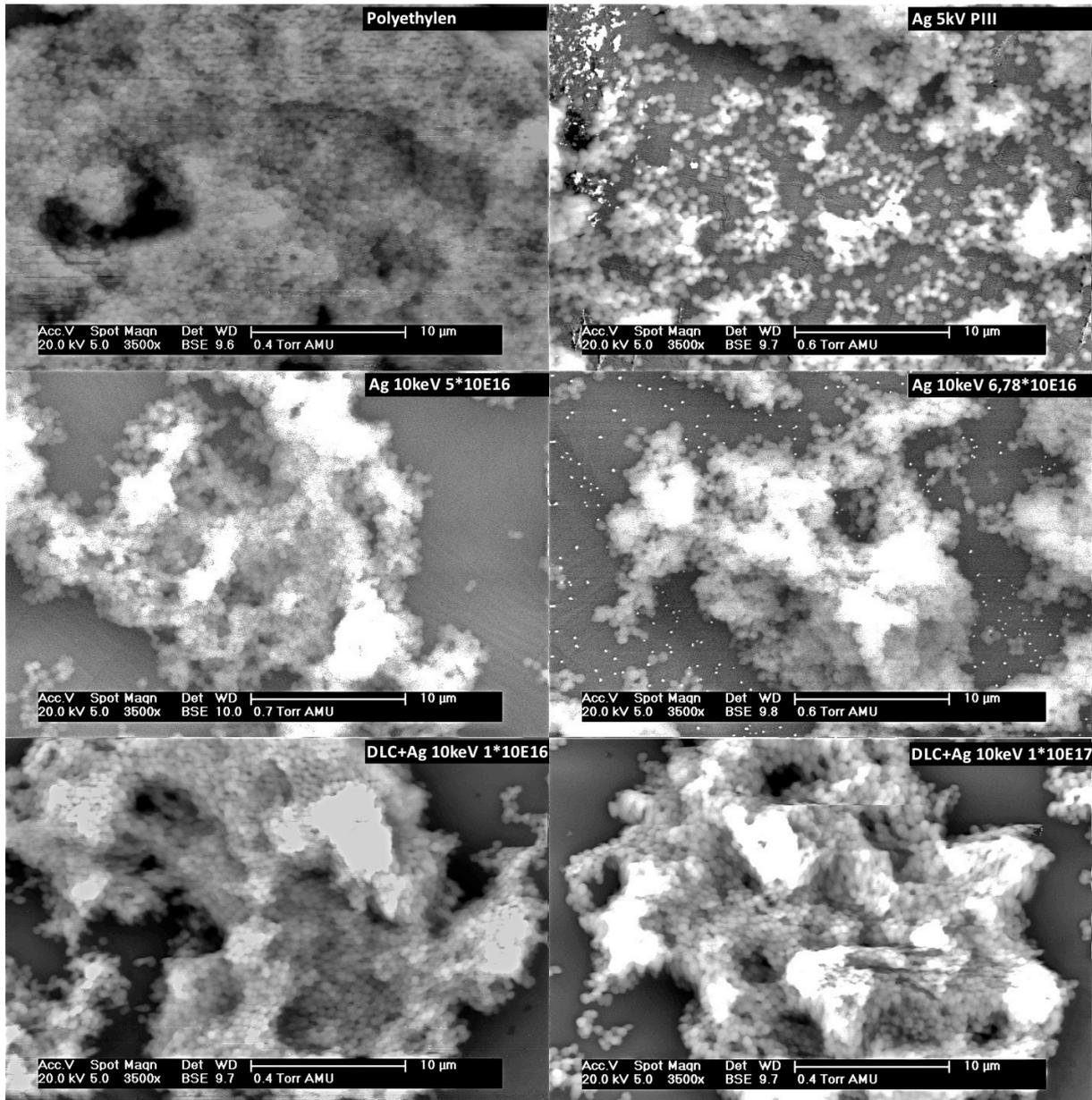


Abb. 22 Ungehemmte Biofilmbildung auf PE (links oben) und reduzierte Biofilmbildung auf antibakteriell modifiziertem PE-Proben, Ag 5kV PIII (rechts oben), Ag 10 keV  $5 \times 10^{16}$  (links mittig), Ag 10 keV  $6,78 \times 10^{16}$  (rechts mittig), Ag 10 keV  $5 \times 10^{16}$  (links mittig), DLC+Ag 10 keV  $1 \times 10^{16}$  (links unten), DLC+Ag 10 keV  $1 \times 10^{17}$  (rechts unten)

## 5 DISKUSSION

Die Entwicklung modifizierter („intelligenter“) Oberflächen auf unterschiedlichen Materialien für die medizinische Verwendung hat hohe Bedeutung in der heutigen Forschung, um in verschiedensten Anwendungsgebieten gewünschte Eigenschaften zu erreichen, welche den jeweiligen Anforderungen an das Material entsprechen und im Gesamtorganismus des menschlichen Körpers optimal funktionieren.

In der Orthopädie, v.a. in der Endoprothetik, sind neben der Tragfähigkeit des Werkstoffs die Oberflächeneigenschaften Biokompatibilität, geringe Reibung, Verschleißfestigkeit, Korrosionsschutz sowie ein möglicher Infektionsschutz von entscheidender Bedeutung [Long & Rack 1998].

Es wurde bereits eine Vielzahl unterschiedlicher antiinfektiöser Oberflächenbeschichtungen entwickelt, einige davon befinden sich bereits in klinischem Einsatz.

Die im Rahmen dieser Arbeit mit dem Prinzip der Ionenimplantation hergestellten DLC-Beschichtungen auf Titan (TiAl6V4) sowie Polyethylen (UHMWPE) enthalten eingelagerte Silber- bzw. Kupfernanopartikel als bakterizides Agens. Bei den *in vitro* durchgeführten Versuchen zur antimikrobiellen Wirksamkeit beider Beschichtungen zeigte sich eine von der Metallionenkonzentration abhängige signifikante Verminderung der bakteriellen Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* an der Oberfläche. Außerdem ergab sich eine Reduktion der Bakteriendichte im umgebenden Nährmedium durch Herauslösen der Metallionen aus der Beschichtung und Verteilung in der Lösung. In weiteren Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bildung eines Biofilms durch den Schleimbildner *Staphylococcus epidermidis* RP62a auf der Probekörperoberfläche durch den Silberanteil in der Beschichtung gehemmt wird. Diese Ergebnisse ließen sich in mehreren Versuchsdurchgängen reproduzieren.

## 5.1 Diskussion der Methode

Die mikrobiologischen Tests wurden am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene allesamt eigenhändig in Anlehnung an Verfahren aus der Literatur durchgeführt. Untersuchungen der bakteriellen Besiedelung reflektieren das Zusammenspiel von vier Hauptfaktoren: Neben dem untersuchten Material sind dies der eingesetzte Keim, das verwendete Nährmedium sowie die Bebrütungsdauer [Christensen *et al.* 1995].

### 5.1.1 Auswahl der Keime

*Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* sind die beiden Keime, welche bei Implantatinfektionen am häufigsten isoliert werden und welche die Fähigkeit gezeigt haben, auf verschiedensten Oberflächen zu adhären und einen Biofilm auszubilden [Zimmerli *et al.* 2004]. Zur Durchführung der Versuche wurde der Referenzkeim *S. epidermidis* ATCC35984 benutzt. Der gleiche Keim wurde bereits häufig in der Literatur im Zusammenhang mit Implantatinfektionen genannt und für Untersuchungen *in vitro* verwendet [Heidenau *et al.* 2005; Katsikogianni *et al.* 2006; Soininen *et al.* 2011; Del Prado *et al.* 2012]. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ist der internationale Referenzkeim für die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und bereits häufiger zur Testung antimikrobieller Substanzen herangezogen worden [Endrino *et al.* 2010; Flores *et al.* 2013]. Um auch den Effekt der Beschichtung auf gram-negative Erreger zu untersuchen wurde *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 verwendet. Dieser Keim dient in der Mikrobiologie ebenfalls als Kontroll- und Referenzkeim. Protheseninfektionen mit *P. aeruginosa* sind schwer zu behandeln und benötigen häufig eine Revisionsoperation in zwei Schritten [Trujillo *et al.* 2012]. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilmbildung wurde in Anlehnung an bekannte Literatur mit dem starken Schleimbildner *Staphylococcus epidermidis* RP62a durchgeführt [Trujillo *et al.* 2012]

Die verwendeten Keime wurden bei -80° Celsius in einer Lösung bestehend aus TSB (70%) und 50%igen Glycerol (30%) gelagert [Katsikogianni *et al.* 2006; Soininen *et al.* 2011].

### **5.1.2 Wachstumshemmung von Bakterien**

Die Grundsätze der Methode der bakteriellen Kultivierung und Auswertung haben sich bereits in anderen Studien zur Untersuchung der antibakteriellen Effektivität einer Beschichtung bewährt [Heidenau *et al.* 2005; Katsikogianni *et al.* 2006; Soininen *et al.* 2011].

Als Flüssignährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) verwendet. DMEM ähnelt der menschlichen Flüssigkeitszusammensetzung, es wurde bereits in ähnlichen Studien als Nährmedium für Bakterien verwendet [Endrino *et al.* 2010]. Zwar handelt es sich dabei klassischerweise um ein Zellkulturmedium, allerdings erlaubt der äquivalente Versuchsaufbau für Zell- und Bakterienkultur eine vergleichbare Einstellung der freien Metallionenkonzentration und damit einen Vergleich von antibakterieller Wirksamkeit und Zytotoxizität [Heidenau *et al.* 2005]. Aus diesem Grund wurde wie in früheren Versuchsreihen auch in der vorliegenden Arbeit auf dieses Nährmedium zurückgegriffen.

Zur besseren und konstanteren Einstellung der Keimdichte in der Ausgangslösung wurde auf die beschriebene Zentrifugation der Lösung zur Gewinnung der bakteriellen Zellen mit anschließender Resuspension in PBS verzichtet. Mit den verwendeten Labormaterialien gestaltete es sich als schwierig, eine konstante Bakteriendichte mit der McFarland-Methode herzustellen. Die Resuspension der zentrifugierten Zellen gelang nicht vollständig. Stattdessen wurde die Übernachtskultur in DMEM weiter verdünnt, bis sich der gewünschte McFarland Wert einstellte. Zusätzlich wurde anschließend unter Verwendung enger Grenzbereiche die optische Dichte der Bakterienlösung bestimmt. Dieses Vorgehen stellte sich als genaueste Methode heraus um die Dichte der bakteriellen Zellen auf 100.000 KBE/ml einzustellen.

Die Auszählung der KBE zur Bestimmung der bakteriellen Keimdichte ist ein etabliertes, direktes Verfahren und ermöglicht die Quantifizierung anhand eines konkreten Zahlenwertes [Christensen *et al.* 1995]. Wie bei Liu und Kollegen wurde versucht, die jeweilige bakterienhaltige Lösung soweit zu verdünnen, dass sich für eine optimale Auszählung nach Bebrütung etwa 25-250 KBE auf den ausplattierten Agarplatten formten [Liu *et al.* 2012]. Durch die Verwendung der Verdünnungsreihen konnten mehrere Verdünnungsstufen gleichzeitig untersucht werden. Die Ergebnisse der einzelnen Verdünnungen zeigten sich untereinander konform. Um den

antimikrobiellen Effekt der freigesetzten Metallionen nach der 24 stündigen Inkubationszeit im Nährmedium zu untersuchen, wurde eine Neutralisationslösung verwendet um die anhaltende antimikrobielle Aktivität der Ionen zu stoppen [Tilton & Rosenberg 1978].

Die Bestimmung der bakteriellen Adhäsion erfolgte ebenfalls durch Auszählen der KBE. Zuerst erfolgte die Spülung der Proben in PBS um nichtadhärente Bakterien zu entfernen. Wie in der Literatur beschrieben diente das Ultraschallbad als Methode der Wahl um adhärente Bakterien von der Oberfläche abzulösen [Furno *et al.* 2004; Heidenau *et al.* 2005]. Christensen und Kollegen beschrieben diese Methode einerseits als präzise und sensitiv, andererseits bleibt die Frage ob alle Bakterien von der Oberfläche abgelöst werden oder die Methode schädlich für die bakteriellen Zellen ist [Christensen *et al.* 1995]. Flores und Kollegen konnten zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl lebender Bakterien, die einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt wurden sind und einer Kontrollgruppe gab. Zudem konnte die komplette Ablösung der anhaftenden Bakterien bestätigt werden [Flores *et al.* 2013].

### **5.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilmbildung**

Die elektronenmikroskopische Untersuchung ist eine qualitative Methode und ermöglicht die detaillierte Betrachtung der Anhaftung von Mikroorganismen auf der Oberfläche sowie deren Organisation in einem Biofilm [Christensen *et al.* 1995]. Mehrere Autoren beschrieben diese Methode zur Analyse des bakteriellen Biofilms auf verschiedenen Oberflächen für das Rasterelektronenmikroskop (REM) [Katsikogianni *et al.* 2006; Trujillo *et al.* 2012].

Die Untersuchung der DLC und Ag-DLC Oberflächen sowie einer jeweiligen Kontrolloberfläche (TiAl6V4 und UHMWPE) erfolgte mit dem Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM). Das ESEM ist eine spezielle Variante der Rasterelektronenmikroskopie. Der Vorteil des ESEMs liegt darin, dass für die Visualisierung wasserhaltiger Proben (in diesem Falle Bakterien) keine aufwendige Vorbehandlung notwendig ist [Choi *et al.* 2007]. Die Elektronenmikroskopie zeigt alle Bakterien auf der Oberfläche, unabhängig davon, in welchem metabolischen Status sich die einzelnen Keime befinden. Im Gegensatz dazu werden bei dem Vorgehen durch Auszählen der KBE nur lebende, teilungsfähige Zellen berücksichtigt [Katsikogianni *et al.* 2006].

Aus diesem Grund eignet sich die Methode sehr gut für die Evaluation eines Biofilms, da nicht alle Bakterien in einem metabolisch aktiven Zustand in der polymeren Matrix vorliegen. Der Nachteil dieser Technik ist, dass eine quantitative Auszählung der Mikroorganismen aufgrund der teilweise dichten Aggregation nicht möglich ist [Christensen *et al.* 1995].

## 5.2 Bewertung der Ergebnisse

### 5.2.1 Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren

Vier verschiedene Verfahren zur Sterilisation der Oberfläche wurden verglichen. Beim Autoklavieren wird Dampf unter hohem Druck bei 121°C verwendet. Mikroorganismen werden durch irreversible Koagulation und Denaturierung von Enzymen und Strukturproteinen abgetötet. Bei der Methode der UV-Bestrahlung schädigt die kurze Wellenlänge des UV-Lichts (ca. 265 nm) die Struktur der Nukleotide der DNA oder RNA durch die Bildung von Thymin-Dimeren. Dadurch geht die Reproduktionsfähigkeit der Keime verloren. Die  $\gamma$ -Sterilisation erfolgt bei niedrigen Temperaturen, energiereiche Photonen töten Mikroorganismen durch direkte und indirekte Effekte auf die DNA/RNA-Moleküle ab. Es ist eine sichere und günstige Methode für die Sterilisation medizinischer Produkte. Formaldehyd ist chemisch sehr reaktiv und inaktiviert Mikroorganismen durch Alkylierung von Proteinen, DNA sowie RNA. [Qiu *et al.* 2011; McKeen 2012].

Weder auf der Titanoberfläche noch auf DLC ließ sich das Bakterienwachstum von den verschiedenen Sterilisationsverfahren beeinflussen. Infolge dessen wurde für die Durchführung der Experimente die  $\gamma$ -Sterilisation gewählt, da dieses Verfahren üblicherweise bei der industriellen Herstellung von Implantaten eingesetzt wird. Zudem lassen sich auch thermolabile Materialien, wie z.B. Polyethylen, mit dieser Methode sterilisieren. Viele Kunststoffe werden durch UV-Strahlung geschädigt. Die Verwendung von Formaldehyd ist zudem toxisch, mutagen und karzinogen [Qiu *et al.* 2011].

### 5.2.2 Antibakterielle Eigenschaften von Silber/Kupfer

Es sollte die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber/Kupfer gegen häufig bei Implantatinfektionen vorkommende Bakterienstämme (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) untersucht werden.

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Silber waren schon zur Zeit der Antike und in anderen frühzeitlichen Kulturen bekannt (Ägypter, Römer, Mesopotamier) [Vasilev *et al.* 2009]. Heute schätzt man das breite Wirkspektrum gegenüber vielen verschiedenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Viren) und insbesondere die Wirksamkeit auch gegen antibiotikaresistente Erreger [Marambio-Jones & Hoek

2010]. Silber als antibakterielles Agens findet vielseitigen Einsatz in unterschiedlichsten Anwendungen und Produkten. In der Medizin wird es zur Verhinderung von Infektionen auf verschiedenen Materialien und bei der Behandlung von Brandwunden verwendet [AshaRani *et al.* 2009; Trujillo *et al.* 2012].

Die antimikrobielle Aktivität von Silber ist direkt proportional zur Konzentration freier Silberionen [Schierholz *et al.* 1998]. Silberionen ( $\text{Ag}^+$ ) können durch freie Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ) komplexiert werden ( $\text{AgCl}_2$ ) und ausfällen, was zu einem großen Verlust der antimikrobiellen Fähigkeit führen kann [Vasilev *et al.* 2009]. Hingegen scheint die Entwicklung von Resistenzmechanismen der Bakterien gegenüber Silber gering zu sein [Pratten *et al.* 2004].

Silbernanopartikel sind Ansammlungen metallischer Silberatome ( $\text{Ag}^0$ ) im Nanometerbereich (bis 100nm) [Marambio-Jones & Hoek 2010]. Untersuchungen von Ag-Nanopartikeln innerhalb einer Kohlenstoff-Matrix zeigten einerseits eine Agglomeration der Nanopartikel in der Trägersubstanz, andererseits eine signifikante Freisetzung von Nanopartikeln an das umgebende Medium [Morones *et al.* 2005]. Dieses Ergebnis ist konform zu Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen DLC Oberflächen an der Universität Augsburg. Es zeigte sich ebenfalls eine Agglomeration der implantierten Nanopartikel nahe der Oberfläche (siehe Abbildung 23). Daraus lässt sich schließen, dass die Silberionen nicht in die Polymerstruktur eingebaut werden und somit die für eine antimikrobielle Wirksamkeit wichtige Silberionenfreisetzung möglich ist.

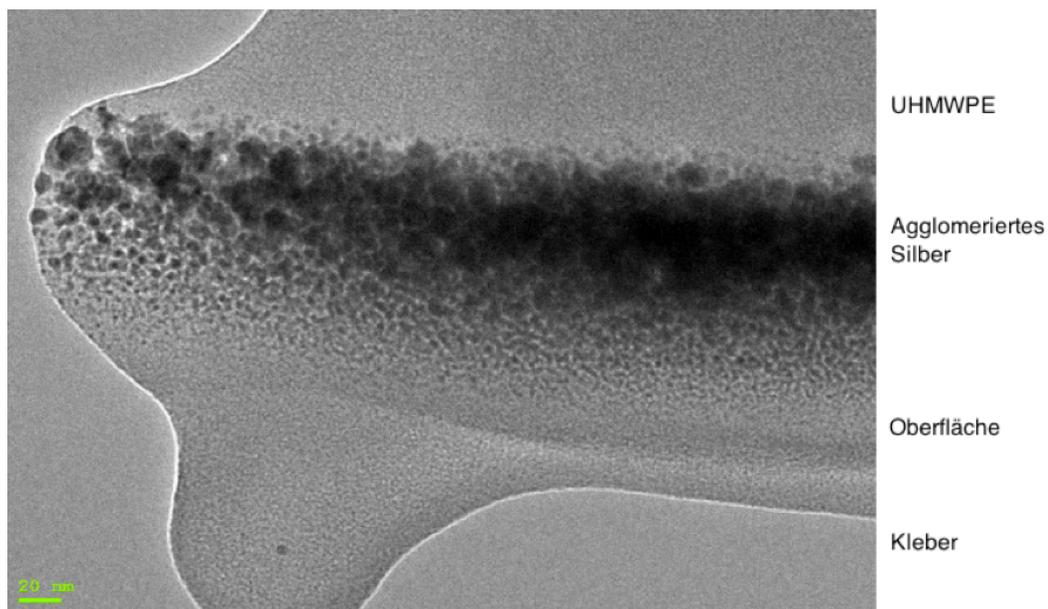


Abb. 23 TEM-Aufnahme: Unter der Oberfläche agglomeriertes Silber zu Nanopartikeln nach Implantation mit 60 keV in UHMWPE (R. Kmeth, Universität Augsburg)

In den vorliegenden Versuchen des silberimplantierten Polyethylen zeigte sich, dass eine niedrige Implantationsenergie aufgrund der Oberflächennähe des implantierten Silbers vorteilhaft für die antimikrobielle Wirksamkeit ist. Bei höheren Implantationsenergien werden die Silberionen tiefer implantiert und damit langsamer bzw. in geringerer Menge freigesetzt.

Nanopartikel zeigen aufgrund des größeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eine erhöhte Reaktionsfreudigkeit und somit auch einen stärkeren antibakteriellen Effekt [Lok *et al.* 2007; AshaRani *et al.* 2009].

Die Wirkung von Silber auf Mikroorganismen ist bis heute nicht genau verstanden. Es wird vermutet, dass Silbernanopartikel direkt die Zellwand schädigen können [Marambio-Jones & Hoek 2010]. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen zeigten, dass Silbernanopartikel an der Zellmembran von *Escherichia coli* anhaften, diese durchdringen und sogar zu Löchern führen [M.Raffi 2008]

Dies deckt sich mit Untersuchungen von Morones und Kollegen, die verdeutlichten, dass die Silbernanopartikel nicht nur auf der Oberfläche der Zellmembran zu finden waren, sondern auch in der Zelle verteilt. Dabei ist nicht genau bekannt, wie die Nanopartikel in die Zellen gelangen, vermutet wird ebenfalls eine höhere Permeabilität der Membran durch Nanopartikel [Morones *et al.* 2005].

Im Inneren der Zelle binden die Nanopartikel oder auch freigesetzte Silberionen ( $\text{Ag}^+$ ) mit hoher Affinität an Schwefel- und Phosphorgruppen. Dort können sie mit wichtigen Enzymen interagieren und diese inaktivieren, beispielsweise Enzyme der Atmungskette. Die Folge ist eine Unterbrechung der ATP-Synthese. Über Bindungen an die phosphorhaltige DNA kann die Replikationsfähigkeit der Zelle verloren gehen. [Morones *et al.* 2005; Marambio-Jones & Hoek 2010]. Zudem führen Silberionen/Silbernanopartikel zur Freisetzung sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche nachfolgend zu Schäden an der DNA, Zellmembran und Zellmembranproteinen führen [Vasilev *et al.* 2009; Marambio-Jones & Hoek 2010]. Vor kurzem konnten Dibrov und Häse demonstrieren, dass niedrige  $\text{Ag}^+$ -Konzentrationen zu einem massiven Protonenverlust durch die Membran von *Vibrio cholerae* führen können mit der Folge eines Zusammenbruchs des elektrochemischen Protonengradienten [Lok *et al.* 2007]. Diese Mechanismen führen letztlich gemeinsam zum Zelltod [Hetrick & Schoenfisch 2006]. Aufgrund

dieser unspezifischen Wirkmethoden ist die Entwicklung bakterieller Resistenzmechanismen schwierig [Percival *et al.* 2005].

An den dargestellten Ergebnissen erkennt man, dass eine bestimmte Silberkonzentration einen unterschiedlich starken antibakteriellen Effekt auf verschiedene Bakterienstämme hat. Dabei verdeutlichte sich, dass die bakterizide Wirkung umso stärker ausfällt, je höher der Silberanteil in der Beschichtung ist. Die Silberbeschichtung zeigte in Bezug auf Oberflächenadhäsion und planktonisches Wachstum den stärksten Effekt bei *P. aeruginosa*, einem gram-negativen Erreger. Die antimikrobielle Wirkung des Silbers gegen *S. epidermidis* sowie *S. aureus* ist ähnlich, jedoch geringer als bei *P. aeruginosa*. Dies kann einerseits von verschiedenen Wachstumsbedingungen und Generationszeiten der Stämme abhängig sein, andererseits an der unterschiedlichen Suszeptibilität der Keime gegenüber Silber aufgrund der andersartigen Zellmorphologie liegen. In der Literatur wird die höhere Anfälligkeit gram-negativer Bakterien gegenüber Silber der weniger starren Zellwand zugeschrieben [Taglietti *et al.* 2012; Flores *et al.* 2013]. Auch bei der Arbeitsgruppe um Trujillo war der antibakterielle Effekt gegen *P. aeruginosa* stärker als bei *S. epidermidis* [Trujillo *et al.* 2012]. Kim und Kollegen berichteten von einer keimabhängigen minimalen Hemmkonzentration der Silbernanopartikel (unter 6,6 nM bei *Escherichia coli* und über 33 nM bei *Staphylococcus aureus* [Kim *et al.* 2007]. Die bakterielle Adhäsion auf silberbeschichteten Oberflächen zeigte sich bei *Pseudomonas aeruginosa* geringer als bei *Staphylococcus epidermidis* bzw. *Staphylococcus aureus* [Trujillo *et al.* 2012; Flores *et al.* 2013]. Auch Morones und Kollegen postulierten, dass die Konzentration an Silbernanopartikeln, welche benötigt wird um das bakterielle Wachstum zu hemmen, von der Keimart abhängig ist. Eine höhere Konzentration erwies sich dabei als bakterizid gegenüber allen getesteten Stämmen [Morones *et al.* 2005]. In einer anderen Studie konnte das Wachstum von *E. coli* mit Silber ebenfalls komplett inhibiert werden [M.Raffi 2008]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Silber konzentrationsabhängig einen sehr starken bakteriziden Effekt auf Bakterien aufweist, bis hin zur kompletten Inhibition des bakteriellen Wachstums.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit bakterieller Organismen gegenüber menschlichen Zellen bleibt die Zytotoxizität von Silber bzw. Silbernanopartikeln zu klären. Es stellt sich die Frage ob Silberionen in gleichem Maße mit menschlichen

Zellen und Gewebe interagieren. Es finden sich Hinweise in der Literatur, dass Ag-Nanopartikel verschiedene zytotoxische und genotoxische Effekte auf Zellen in höhergradigen Organismen ausüben können.

Eine häufige Nebenwirkung bei Personen, welche hohen Silberkonzentrationen ausgesetzt sind, ist eine systemische Argyrose (grau-blaue Verfärbung der Gewebe, beispielsweise der Haut) [Gosheger *et al.* 2004]. Bei der Behandlung von Brandwunden mit einem topischen, silberhaltigen Verband zeigten sich bei einem Patienten Argyrose-ähnliche Symptome, eine Hepatotoxizität, sowie deutlich erhöhte Silberspiegel in Serum und Urin [Trop *et al.* 2006]. In den meisten Fällen führt eine Silberbeschichtung zu leicht erhöhten Silberspiegeln im Körper ohne greifbaren Krankheitswert [Rosenman *et al.* 1979; Steininger *et al.* 1990].

Eine große klinische Studie zu silberbeschichteten Herzklappen beschreibt chronische Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe, welche zu einem schlechten Einwachsen und sogar Lösen der künstlichen Klappen führten. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Silberfreisetzung zu einer Inhibition der normalen Fibroblasten-Reaktion führt [Schaff *et al.* 2002]. In der Literatur finden sich noch weitere Quellen, welche eine Inhibition von Fibroblasten durch silberhaltige Wundverbände beschreiben [McCauley *et al.* 1989]. Auch die Inhibition von Osteoblasten durch elementares Silber kann nicht ausgeschlossen werden und damit eine gute Integration einer orthopädischen Prothese in den Knochen [Gosheger *et al.* 2004]. Im Gegensatz zu diesen Aussagen gibt es andere Autoren die von einer guten Biokompatibilität sprechen und keine toxischen Effekte nachweisen konnten [Greil *et al.* 1999; Liu *et al.* 2012]. Bosetti und Mitarbeiter zeigten, dass silberbeschichtete Fixateur-externe Pins im Vergleich mit rostfreiem Stahl weder zytotoxische noch genotoxische Interaktionen mit Gewebszellen aufwiesen. Zytokompatibilitäts-Untersuchungen verdeutlichten außerdem eine gute Osteoblastenaktivität auf silberhaltigen Oberflächen, vor allem bei längeren Inkubationszeiten [Bosetti *et al.* 2002].

Diese teils widersprüchlichen Aussagen in der Literatur zur Zytokompatibilität lassen sich auf einen Dosis-abhängigen Effekt von Silber auf verschiedene Zelltypen zurückführen. Wie auch bei der antimikrobiellen Wirksamkeit, ist die Zytotoxizität von Silber konzentrationsabhängig.

Auch speziell Silbernanopartikeln, welche eine höhere biochemische Aktivität aufweisen, wurden in Hinblick auf mögliche Zytotoxizität untersucht. Die Testung der

Zytotoxizität von Ag-Nanopartikeln gegenüber Osteoblasten (Zelllinie UMR-106, Osteosarkom Zellen von Ratten) ergab, dass die zytotoxische Konzentration weit oberhalb der antibakteriellen Konzentration liegt [Flores *et al.* 2013].

Asharani und Kollegen untersuchten die Wirkung von Silber-Nanopartikeln auf menschliche Lungenfibroblasten (IMR-90) sowie Glioblastom-Zellen (U251). Die Zytotoxizität wurde bewertet durch Änderungen in der Zellmorphologie, Funktionsfähigkeit der Zelle, metabolischen Aktivität und der Höhe von oxidativen Stress. Es zeigte sich eine konzentrations-abhängige Zytotoxizität (niedrige metabolische Aktivität), Änderungen in der Zellmorphologie, Genotoxizität (DNA Schäden und chromosomale Aberrationen) sowie ein Zellzyklusarrest. Bereits eine niedrige Dosis von Silber-Nanopartikeln hatte das Potential zytotoxisch zu wirken. Als möglichen Mechanismus der Zellschädigung stellten sie folgende Hypothese auf: Silber-Nanopartikel beeinflussen die Atmungskette, führen zur Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) und stören die ATP-Produktion, mit der Folge von DNA-Schädigungen [AshaRani *et al.* 2009]. DNA-schädigende Substanzen können im Allgemeinen zu Genominstabilitäten führen und somit möglicherweise zur Karzinogenese [AshaRani *et al.* 2009].

Studien mit menschlichen Fibrosarkom- und Hautkrebszellen, welche mit einem oberflächlichen, Ag-Nanopartikelhaltigem Agens behandelt worden sind, legten nahe, dass in Anwesenheit der Nanopartikel die zelluläre Glutathion-Konzentration vermindert ist. Diese Tatsache deutet auf das Vorhandensein eines hohen Levels von oxidativem Stress in der Zelle hin, welcher zu Zellschäden und Lipidperoxidation führt [Arora *et al.* 2008].

Allerdings wird die Toxizität von Silber-Nanopartikeln von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie Partikelgröße und Partikelform, Oberflächenladung und Kristallausprägung sowie durch Faktoren der umgebenden Lösung, wie pH-Wert, Redox-Potential, ionische Stärke und ionische Zusammensetzung [Marambio-Jones & Hoek 2010]. In den meisten Studien wurden in den Laboren einfache Zellkulturmedien bzw. destilliertes Wasser verwendet, welche jedoch nicht die komplexen Bedingungen des menschlichen Organismus adäquat widerspiegeln. Daher mag sich das Verhalten der Nanopartikel in Bezug auf Toxizität und antimikrobiellen Eigenschaften *in vivo* anders darstellen als *in vitro* [Marambio-Jones & Hoek 2010]. Um genauere Aussagen in Bezug auf antimikrobiellen Effekt und Zytotoxizität von Silber-Nanopartikeln zu erlangen und die Auswirkungen auf die

Gesundheit des Menschen zu verstehen, ist weitere extensive Forschung auf diesem Gebiet unbedingt notwendig. Bis dahin sollte der Einsatz von silberhaltigen Beschichtungen kritisch gesehen und genau beobachtet werden.

Eine Versuchsreihe auf Polyethylen wurde mit implantiertem Kupfer durchgeführt. In einer Studie von Heidenau und Kollegen zeigten Kupferionen den besten Kompromiss zwischen antibakterieller Effektivität und Zytotoxizität [Heidenau *et al.* 2005]. Wie bei den Silberionen ist die antimikrobielle Wirkung des Kupfers nicht genau verstanden. In der Literatur werden ähnliche Mechanismen vorgeschlagen: Steigerung der Permeabilität der Plasmamembran und Peroxidation von Fettsäuren, Denaturierung von Nukleinsäuren durch Bindung oder Vernetzung helikaler Strukturen sowie die Änderung der Struktur und biologischen Funktion/Aktivität von Proteinen [Borkow & Gabbay 2004].

Die verwendete kupfernanopartikelhaltige Polyethylen-Probe zeigte einen geringeren antimikrobiellen Effekt als eine vergleichbare, silberimplantierte Schicht. Daher wurde Kupfer im weiteren Verlauf der Versuche nicht weiter verwendet. Zudem gelang die Herstellung kupferhaltiger DLC-Schichten auf Titan nicht. Aufgrund der deutlich geringeren Löslichkeit der Kupfersalze in der ethanolbasierten Lösung konnten keine ausreichend hoch dosierten kolloidalen Lösungen für die Dip-Coating Beschichtung hergestellt werden. Kupfer agglomerierte in der PVP-Matrix zu großen Partikeln [Schwarz *et al.* 2009].

### **5.2.3 Antibakterielle silberhaltige Oberflächenbeschichtungen**

Die antibakterielle Wirksamkeit bzw. mögliche zytotoxische Nebeneffekte von Silberbeschichtungen verschiedener medizinischer Produkte wurden in der Literatur in verschiedenen Studien *in vitro* sowie *in vivo* untersucht. Silberbeschichtete medizinische Materialien für den Einsatz im menschlichen Organismus wie beispielsweise Herzklappen, intravaskuläre Katheter, Stents, urologische Katheter und orthopädische Implantate bewiesen ihre Effektivität durch eine Reduktion der Infektionsrate [Politano *et al.* 2013]. Die Verhinderung einer initialen bakteriellen Adhäsion ist der entscheidende Schritt um die folgende, mögliche Biofilmbildung zu verhindern [Trujillo *et al.* 2012].

In einer ersten Studie zu silberionenhaltigen Blasenkathe tern zeigte sich eine effektive Verringerung von Bakteriurie und Symptomen einer Urethritis während der

Langzeitkatheterisierung [Akiyama & Okamoto 1979]. Eine Metaanalyse, basierend auf acht klinischen Versuchen mit silberbeschichteten urologischen Kathetern ergab einen signifikanten Benefit für Patienten mit einer Reduktion des Risikos für eine Bakteriurie (OR 0.59; 95% CI 0.42, 0.84) [Saint et al. 1998].

Gosheger et al. untersuchten den antibakteriellen Effekt sowie mögliche toxikologische Nebenwirkungen einer silberbeschichteten Megaendoprothese *in vivo*. 15 silberbeschichtete- sowie 15 Titanendoprothesen wurden im Kaninchen mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Die Silbergruppe zeigte eine signifikant geringere Infektionsrate als die Titangruppe (7% gegenüber 47%). Außerdem waren die Anzeichen einer Inflammation (Anstieg von CRP und Leukozyten, Temperaturanstieg) deutlich geringer. Es zeigte sich zwar eine erhöhte Silberkonzentration im Blut und in peripheren Organen, jedoch ohne pathologische Veränderungen der Laborparameter oder histologischen Veränderungen in den Organen [Gosheger et al. 2004]. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass auch im Menschen die Implantation einer silberbeschichteten Megaendoprothese nicht mit lokalen oder systemischen toxischen Nebenwirkungen assoziiert war. Diese Prothese wurde 20 Patienten bei Knochenmetastasen eingesetzt. Allerdings sind die Anzahl der Patienten sowie der Beobachtungszeitraum von 19 Monaten zu gering um eine definitive Bewertung abgeben zu können. Zudem war der im Knochen verankerte Prothesenstiel nicht silberbeschichtet und somit fehlt die wichtige Aussage über die Wirkung des Silbers auf Osteoblasten und damit die Folgen für die Osseointegration [Harden et al. 2007]. Eine silbernanopartikelhaltige/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Schicht auf rostfreiem Stahl (SNPSA) zeigte eine starke antibakterielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa in vitro* und *ex vivo*. Dabei war der antibakterielle Effekt abhängig vom Silberanteil in der Beschichtung. Die 2%ige-Silbernanopartikel/PLGA Beschichtung verhinderte effektiv die bakterielle Anhaftung sowie Biofilmbildung. Des weiteren erwies sich die Beschichtung als osteoinduktiv durch Förderung der Osteoblasten-Proliferation und Maturation [Liu et al. 2012].

Trujillo und Kollegen untersuchten den antibakteriellen Effekt von silberhaltigen Hydroxyapatit-Beschichtungen auf Titanoberflächen. Die Anhaftung und das Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* sowie dem starken Biofilmbilder *Staphylococcus epidermidis* (RP62a) waren abhängig von der Silberkonzentration in der Beschichtung. Die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* war nach 8 und 24

Stunden signifikant geringer gegenüber reinen Titanoberflächen, bei *Staphylococcus epidermidis* war der Unterschied nur geringfügig. Allerdings erwies sich die Oberflächenanhaftung beider Bakterienstämme nach 32 bzw. 48 Stunden gleich stark wie auf Titan. Als mögliche Erklärung für diesen Wirkverlust wurde die rasche Abgabe von Silberionen in das umgebende Medium diskutiert. Für die Freisetzung von  $\text{Ag}^+$ -Ionen spricht auch, dass sich das bakterielle Wachstum im umgebenen Medium (Suspension) bei den silberhaltigen Beschichtungen signifikant verringerte. Die Oberflächenbesiedelung wurde zudem bei 5000-facher Vergrößerung rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Wie in der vorliegenden Arbeit auch zeigte sich auf der Titanoberfläche ein starkes dreidimensionales Wachstum von *Staphylococcus epidermidis* RP62a mit beginnender Biofilmbildung. Auf den silberhaltigen Oberflächen formten sich hingegen nur vereinzelt kleine Kolonien, analog zu den eigenen Untersuchungen. Trotzdem zeigte sich auch an einigen Stellen der behandelten Oberfläche größeres, dreidimensionales Bakterienwachstum. Die Autoren führten die Tatsache darauf zurück, dass an diesen Stellen bereits eine Delamination der Beschichtung stattgefunden hatte und die Silberkonzentration nicht mehr ausreichend hoch genug war, um das Bakterienwachstum zu verhindern [Trujillo *et al.* 2012].

Eine aktuelle Studie untersuchte die Wirkung von Ag-nanopartikelhaltigen Titanoberflächen auf klinisch relevante Keime (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) in der gleichen Hinsicht wie in der vorliegenden Dissertation: einerseits wurde die bakterielle Oberflächenadhäsion verglichen mit reinen Titanproben, andererseits wurde die Wirkung freigesetzter Silbernanopartikel auf das planktonische Wachstum im umgebenden Medium untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bakterienadhäsion als auch das planktonische Wachstum der Ag-nanopartikelhaltigen Probe geringer war als in der Kontrollgruppe. Zudem konnte gezeigt werden, dass der antimikrobielle Effekt Ag-nanopartikelhaltiger Titanoberflächen identisch ist zu dem einer reinen Silberbeschichtung. Durch die Implantation eines verhältnismäßig geringen Anteils von Silber-Nanopartikeln in die Oberfläche bleiben die bereits beschriebenen, hervorragenden mechanischen Eigenschaften und gute Biokompatibilität von Titan erhalten. Die Konzentration silberhaltiger Nanopartikel mit zytotoxischem Effekt auf Osteoblasten erwies sich als viel höher, als diejenige Konzentration, welche für eine bakterizide Wirkung gegenüber beiden Bakterienstämmen nötig war. Daher kommen

die Autoren zu dem Schluss, dass es ein Konzentrationsfenster für die antibakterielle Verwendung silberhaltiger Nanopartikel gibt, in welchem die Zellen in der Nachbarschaft des Implantats nicht geschädigt werden [Flores *et al.* 2013].

Allerdings sind die Aussagen zur antibakteriellen Wirksamkeit silberbeschichteter, medizinischer Produkte in der Literatur häufig kontrovers. Viele aktuelle Studien bewiesen einen guten antimikrobiellen Effekt *in vitro*, jedoch müssen diese Ergebnisse *in vivo* noch verifiziert werden. Größere klinische Studien zeigten keinen Unterschied zwischen silberbeschichteten und unbeschichteten urologischen und zentralvenösen Kathetern [Dahlberg *et al.* 1995; Riley *et al.* 1995; Srinivasan *et al.* 2006]. Auch silberhaltige Herzklappen zeigten nicht die klinisch gewünschte antiinfektiöse Wirkung und waren antibiotikabeschichteten Produkten deutlich unterlegen [Darouiche *et al.* 1998]. Eine *in vivo* Studie mit silberbeschichteten Fixateur-externe Pins erbrachte keine signifikante Reduktion der Infektionsrate und musste wegen erhöhter Silberwerte im Serum sogar abgebrochen werden [Massè *et al.* 2000]. Auch silberbeschichtete Modell-Prothesen (Kirschner Drähte) im Kaninchen zeigten keinen statistischen Unterschied hinsichtlich der bakteriellen Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* [Sheehan *et al.* 2004].

Daraouiche konstatierte, dass der fehlende antibakterielle Effekt bei einigen Silberbeschichtungen *in vivo* auf eine fehlende oder zu geringe Freigabe von Ag<sup>+</sup>-Ionen an das umgebende Gewebe zurückzuführen ist. Es stellte sich heraus, dass auf metallischem Silber basierende Beschichtungen weniger effizient sind. Dagegen sind Implantate, bei welchen die Silberabgabe von der Oberfläche möglich ist (aktive Beschichtung), eher resistent gegenüber einer bakterieller Besiedelung *in vivo* [Darouiche 1999].

Zu der gleichen Aussage kommen auch Kumar und Munstedt. Aktive Beschichtungen wirken dabei als Silberreservoir mit der Fähigkeit über einen langen Zeitraum bakterizide Silberionen abzugeben [Kumar & Munstedt 2005].

Eine andere Erklärung für die teilweise schlechte antimikrobielle Effektivität von Silberbeschichtungen *in vivo* könnte die Bildung einer glykoproteinhaltigen Schicht (conditioning film) auf der Materialoberfläche im lebenden Organismus sein. Silberionen binden mit hoher Affinität an Proteine. Der proteinhaltige conditioning film könnte durch Ag<sup>+</sup>-Bindung zu einer Inaktivierung der freigesetzten Silberionen führen [Schierholz *et al.* 1998]. Furno und Kollegen zeigten *in vitro*, dass Silberionen fähig

sind den conditioning film zu durchdringen. Dazu bedarf es allerdings genügend freigesetzter  $\text{Ag}^+$ -Ionen über einen ausreichen langen Zeitraum, um den Verlust durch Proteinbindung zu übertreffen [Furno *et al.* 2004].  $\text{Ag}^+$ -Ionen können, wie bereits erwähnt, durch  $\text{Cl}^-$ -Ionen komplexiert werden und ausfällen und dadurch antimikrobielle Wirksamkeit verlieren. Die Stabilisation von Silbernanopartikeln durch Komplexion mit Albumin ist ebenfalls beschrieben und hat einen Verlust der antimikrobiellen Aktivität zur Folge [Lok *et al.* 2007].

Die teilweise konträren Aussagen zur antibakteriellen Wirksamkeit in der Literatur sind auch bedingt durch die unterschiedliche Größe und Form der Silbernanopartikel bei verschiedenen Herstellungsmethoden [Morones *et al.* 2005; Pal *et al.* 2007]. Sortiru und Kollegen fanden heraus, dass kleinere Nanopartikel ( $< 10 \text{ nm}$ ) mehr  $\text{Ag}^+$ -Ionen freisetzen und daher eine stärkere bakterizide Wirkung besitzen [Sotiriou & Pratsinis 2010].

In vielen Fällen führte eine zu schnelle Freisetzung der Silberionen beziehungsweise Silbernanopartikel, wie es auch bei Trujillo und Kollegen beschrieben ist, zu einer Verkürzung des Infektionsschutzes der Beschichtung. Die Abgabe von Silber sollte demnach lange genug anhalten um eine sinnvolle Infektionsprophylaxe zu gewährleisten [Vasilev *et al.* 2009].

Die Abgabe großer Mengen von Silberionen, vor allem über einen längeren Zeitraum, lässt wiederum Zweifel an der Biokompatibilität aufkommen. Nur durch eine gute Integration in den Knochen wird die bakterielle Kolonisation unwahrscheinlicher und die Voraussetzung für den Langzeiterfolg einer Prothese ist gegeben [Gristina 1987]. Daher ist es unabdingbar Silberkonzentrationen in der Oberfläche von Implantaten zu erzeugen, welche die bakterielle Adhäsion adäquat reduzieren, jedoch gering genug sind um lokale oder systemische toxische Effekte im menschlichen Organismus zu erzeugen.

Nach den Daten aus der Literatur in Bezug auf antimikrobiellen Effekt und Zytotoxizität von Silber bleibt zu untersuchen, wie hoch die initiale Abgabe von Silber in den ersten Stunden der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten DLC-Silber Beschichtungen ist und wie lange diese anhält. Es ist allgemein anerkannt, dass die bakterielle Kontamination und damit Infektion eines Implantates in den meisten Fällen iatrogen während des operativen Eingriffs bei der Implantation des Biomaterials stattfindet und unmittelbar postoperativ eine Immuninkompetenz im periimplantären Gewebe vorliegt [Gristina 1994]. Dies deckt sich mit der Tatsache,

dass zur Verhinderung von Infektionen, prophylaktisch eine Einmaldosis eines Antibiotikums kurz vor dem Eingriff effektiv wirkt [AlBuhairan *et al.* 2008]. Ob die Silberkonzentration und Abgabedauer der  $\text{Ag}^+$ -Ionen der untersuchten Beschichtungen ausreichen um *in vivo* Infektionen zu verhindern und Biokompatibilität gegeben ist, müssen weitere Versuche klären.

#### **5.2.4 Herstellung und Verwendung von DLC und Silber-DLC**

##### **Oberflächenbeschichtungen**

Die Oberflächenbeschichtung von Gelenkprothesen mit diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC) findet in der medizinischen Forschung große Beachtung aufgrund der hervorragenden Biokompatibilität und exzellenten mechanischen Eigenschaften von DLC (geringe Reibung und Verschleiß, hohe Korrosions- und Abriebbeständigkeit) [Robertson 2002].

Die am häufigsten gebrauchten Beschichtungstechniken für die DLC-Umwandlung sind plasmaaktivierte Verfahren wie die chemische Gasphasenabscheidung (chemical vapor deposition, CVD) und physikalische Gasphasenabscheidung (physical vapor deposition, PVD) [Love *et al.* 2013]. Da es sich um reine Depositionsverfahren handelt, ergeben sich aufgrund der hohen Eigenspannungen harter DLC-Schichten auf vielen Substraten Adhäsionsprobleme [Walter *et al.* 1997]. Bei dem Verfahren der Ionenimplantation lagern sich die zugeführten Elemente nicht auf der Oberfläche ab, sondern penetrieren diese und führen zu einer verbesserten Haftung der Schicht [Liu *et al.* 2004]. Die Plasmaimmersionsionenimplantation (PIII) ist eine schnellere und kosteneffektivere Weiterentwicklung der Ionenimplantation und ermöglicht unter anderem auch die Beschichtung komplex geformter Oberflächen, wie es bei Implantaten benötigt wird [Mändl *et al.* 2001]. Mit den angewandten Beschichtungsmethoden der Ionenimplantation und PIII auf Titanoberflächen und UHMWPE sollen die in der Literatur beschriebenen Haftungsprobleme der DLC-Schicht überwunden werden.

Silberhaltige DLC-Beschichtungen sind ein vielversprechender Ansatz für die Beschichtung lasttragender Implantate aufgrund der exzellenten Kombination aus antimikrobiellen und mechanischen Eigenschaften.

#### **5.2.4.1 Biokompatibilität**

Die Reaktion des menschlichen Organismus auf körperfremdes Material ist einer der wichtigsten Faktoren überhaupt für den Langzeiterfolg eines Implantates. DLC-Beschichtungen gelten als biokompatibel, bisher konnte weder eine Toxizität gegenüber lebenden Zellen beobachtet werden, noch wurde über eine inflammatorische Reaktion oder Störung der normalen Zellaktivität berichtet [Cui & Li 2000]. *In vitro* konnte in vielen Studien ein normales zelluläres Wachstum von Fibroblasten und Osteoblasten auf DLC-Beschichtungen nachgewiesen werden. Die Anhaftung, Ausbreitung und Proliferation der Zellen auf der Oberfläche gibt keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Zellphysiologie [Allen *et al.* 1994; Du *et al.* 1998; Grill 2003].

Eine *in vivo* Studie verglich Implantate aus Titan, Zirkonium und DLC-beschichtetem Zirkonium in der Tibia von Ratten. Histomorphologische Untersuchungen der Implantat-Gewebe-Grenzfläche nach 30 Tagen verdeutlichten eine bessere Gewebsreaktion bei Zirkonium und DLC-Zirkonium als bei Titan [Guglielmotti *et al.* 1999]. In einer Studie von Uzumaki und Kollegen wurde eine DLC Oberfläche auf Titan via Plasmaimmersionsionenimplantation hergestellt und in muskuläres Gewebe und den Femurkondylus von Ratten implantiert. Es bestätigte sich die gute Gewebeverträglichkeit und außerdem eine direkte Knochenbindung der Oberfläche [Uzumaki *et al.* 2008]. Die Korrosionsrate eines DLC-beschichteten Metallimplantats ist zudem weit geringer als bei einem Unbeschichteten [Sheeja *et al.* 2001; Tiainen 2001]. Die Abgabe von Metallionen an die Körperflüssigkeit wird durch die hohe atomare Dichte der DLC-Beschichtung reduziert [Dearnaley & Arps 2005; Hauert *et al.* 2013]. Dadurch können beschriebene allergische Reaktionen auf Metallpartikel vermieden werden [Long & Rack 1998]. DLC-beschichteter Stahl, welcher zur Frakturheilung für sieben Monate in den menschlichen Körper implantiert wurde, zeigte keine Anzeichen für Korrosion des Materials oder eine Inflammation des Gewebes [Zolynski *et al.* 1996].

Die Biokompatibilität *in vitro* und *in vivo* konnte für verschiedene DLC Herstellungstechniken nachgewiesen werden [Roy & Lee 2007]. Die Mikrostruktur der DLC-Schicht sowie die Einarbeitung verschiedenster Elemente beeinflussen die Biokompatibilität [Grill 2003]. DLC als biokompatibles Grundmaterial kann mit potentiell toxischen Substanzen wie beispielsweise Silber kombiniert werden. Durch unterschiedliche Konzentrationen des eingearbeiteten Silbers ist es möglich die

Bioreaktionen so auszurichten, dass einerseits die biokompatiblen Eigenschaften der DLC-Schicht, andererseits die bakteriziden und zytotoxischen Effekte der Ag<sup>+</sup>-Ionen zum Tragen kommen [Hauert 2003].

Wie bereits bei den konventionellen Silberoberflächenbeschichtungen erwähnt, soll eine rasche Freisetzung der Silbernanopartikel aus der erzeugten Silber-DLC Beschichtung frühe Infektionen der Implantatoberfläche durch die Kontamination während des chirurgischen Eingriffs verhindern und anschließend eine gute Osseointegration ermöglichen ohne Beeinträchtigung der Gewebszellen. Die Freisetzungskinetik der Silbernanopartikel der verwendeten DLC-Schichten muss daher separat untersucht werden.

#### **5.2.4.2 Tribologische Eigenschaften**

Das Hauptproblem für den Langzeiteinsatz von Gelenkprothesen bleiben Korrosion und Verschleiß. Ziel verschiedenster Ansätze der Forschung ist es die Oberfläche härter zu machen um den Verschleiß zu verringern. DLC-Beschichtungen orthopädischer Implantate verminderten Korrosion, Verschleiß sowie die Bildung von Abriebpartikeln [Roy & Lee 2007].

Ball-on-socket Tests von Metall/Metall Gleitpaarungen (CoCrMo auf CoCrMo und DLC auf DLC) ergaben nach 7 Millionen Zyklen eine signifikante Verminderung des volumetrischen Abriebs durch Schutz der Metalloberfläche mit diamantähnlichem Kohlenstoff im Vergleich zur unbeschichteten Oberfläche [Thorwarth *et al.* 2010].

Der Abrieb von UHMWPE durch CoCrMo und CoCrMo-DLC wurde in einem speziellen Knie-Simulator untersucht. Nach 5 Millionen simulierten Belastungszyklen (entspricht etwa 3 Jahren Implantatlebenszeit), wurde der UHMWPE-Abrieb anhand der Gewichtsabnahme der UHMWPE Gleitpaarung bestimmt. Es zeigte sich ein um den Faktor 4,6 verringerter Abrieb durch die DLC-beschichteten Oberfläche (-0,150 mg) gegenüber der reinen Metalloberfläche (-0,690 mg) [Onate *et al.* 2001].

Die tribologischen Eigenschaften bestimmten unter anderem auch Tiainen, Lappalainen und Mitarbeiter sowie Fischer und Kollegen in einem Hüftsimulator [Tiainen 2001; Lappalainen *et al.* 2003; Fisher *et al.* 2004]. In allen drei Studien zeigte sich eine Reduktion des Abriebs DLC-beschichteter Oberflächen gegenüber unbeschichteten Materialien. Allerdings ergab sich ein großer Unterschied in der Effektivität. Während bei Tiainen der Abrieb um den Faktor 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> gesenkt werden konnte und bei Lappalainen und Kollegen immerhin noch um den Faktor 10<sup>4</sup>,

reduzierte sich der Abrieb bei Fischer und Kollegen nur um den Faktor 26. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Fischer und Kollegen im Gegensatz zu den anderen Studien nicht zwei DLC-beschichtete Gleitpaarungen verwendeten, sondern die DLC-Beschichtung gegen eine andere Beschichtung (Chrom(III)-nitrid) artikulieren ließen.

Es wird vermutet, dass die härtere Beschichtung die weniger harte verstärkt abreibt und damit der Vorteil der DLC Beschichtung verloren geht. Beispielsweise führt die höhere Härte einer DLC-Oberfläche bei einer DLC/UHMWPE Gleitpaarung zu einem stärkerem UHMWPE-Abrieb gegenüber einer CoCrMo/UHMWPE Paarung [Sheeja *et al.* 2001]. Tiainen zeigte auch, dass sich der Abrieb einer DLC-auf-DLC Beschichtung gegenüber Metall-auf-Metall um den Faktor  $10^5$ - $10^6$  verringerte, wohingegen sich der Abrieb einer üblicherweise verwendeten hart-weich Gleitpaarung (DLC gegen UHMWPE) lediglich um den Faktor 10-600 verringerte [Tiainen 2001]. Jones und Kollegen untersuchten den UHMWPE-Abrieb gegenüber DLC-beschichtetem Metall (DLC-CoCr) und reinem Metall (CoCr). Der Abrieb durch die DLC-Oberfläche war um den Faktor 27 erhöht [Jones *et al.* 2001].

Daher wird mit den in Augsburg hergestellten Beschichtungen versucht, beiden artikulierenden Flächen der Hart/Weichpaarung (Ti6Al4V bzw. CoCr und UHMWPE) eine diamantähnliche Oberfläche zu verleihen und dadurch den Abrieb zu vermindern. Sheeja und Kollegen untersuchten diesen Ansatz bereits, indem sie DLC-beschichtete CoCrMo-Discs gegen DLC-beschichtete UHMWPE-Pins testeten. Morphologisch ergab sich kein Anhalt für den Abrieb einer der beiden Oberflächen im Vergleich zu anderen getesteten Materialkombinationen [Sheeja *et al.* 2005]. Xie und Mitarbeiter bestätigten diese Beobachtung. Die Abriebfestigkeit des Polyethylens verbesserte sich maßgeblich durch die DLC-Ablagerung auf der Oberfläche. Es ergab sich eine deutliche Reduktion der verschlissenen Querschnittsfläche (reines UHMWPE:  $193 \mu\text{m}^2$ ; DLC-UHMWPE  $26 \mu\text{m}^2$ ) [Xie *et al.* 2009]. Auch die Arbeitsgruppe um Puértolas wies nach, dass DLC-Beschichtungen auf UHMWPE effizient sind um die Abriebfestigkeit des Polyethylens zu erhöhen [Puértolas *et al.* 2010]

| Methode        | Quelle            | Material                   | Material                   | Gleitmittel                       | Zyklen  | Abrieb  |
|----------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------|---|
| Ball-on-socket | Thorwarth, 2010   | DLC (auf CoCrMo)           | DLC (auf CoCrMo)           | 30g/l proteinhaltiges Rinderserum | 7 Mio.  | $3,4 \times 10^{-3}$ pro $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen<br>(CoCrMo $7,6 \times 10^{-2}$ pro $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen) |
| Kniesimulator  | Onate, 2001       | DLC (auf CoCrMo)           | UHMWPE                     | Destilliertes Wasser              | 5 Mio.  | UHMWPE-Abrieb:<br>-0,150 mg<br>(-0,690 bei CoCrMo)  |
| Hüftsimulator  | Tiainen, 2001     | DLC (auf rostfreiem Stahl) | DLC (auf rostfreiem Stahl) | 1%ige NaCl Lösung                 | 2 Mio.  | Reduktion um den Faktor $10^5$ - $10^6$ gegenüber CoCrMo  |
| Hüftsimulator  | Lappalainen, 2002 | DLC (auf rostfreiem Stahl) | DLC (auf rostfreiem Stahl) | Verdünntes Rinderserum EDTA       | 15 Mio. | $< 10^{-4}$ $\text{mm}^3$ /Jahr<br>(CoCrMo 1-5 $\text{mm}^3$ /Jahr)   |
| Hüftsimulator  | Fischer, 2004     | DLC (auf CoCrMo)           | CrN (auf CoCrMo)           | Verdünntes Rinderserum            | 2 Mio.  | 0,04 $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen<br>(CoCrMo 1,05 $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen)   |
| Pin-on-disc    | Sheeja, 2001      | DLC (auf CoCrMo)           | UHMWPE                     | Simulierte Körperflüssigkeit      | 120.000 | UHMWPE-Abrieb:<br>$2,02 \times 10^{-7}$ $\text{mm}^3$ /Nm<br>(CoCrMo $1,65 \times 10^{-7}$ $\text{mm}^3$ /Nm)             |
| Pin-on-plate   | Jones, 2001       | DLC (auf CoCrMo)           | UHMWPE                     | Verdünntes Kälberserum            | 860.000 | UHMWPE-Abrieb:<br>$13,78$ $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen<br>(CoCrMo $0,504$ $\text{mm}^3$ / $10^6$ Zyklen)                 |
| Pin-on-disc    | Sheeja, 2005      | DLC (auf CoCrMo)           | DLC-UHMWPE                 | Simulierte Körperflüssigkeit      |         | Morphologisch kein Hinweis auf Abrieb im Vergleich zu CoCrMo/UHMWPE   |
| Ball-on-disc   | Xie, 2009         | Siliziumcarbid             | DLC-UHMWPE                 | -                                 | 10.000  | Verschlossene Querschnittsfläche:<br>-DLC-UHMWPE: $26 \mu\text{m}^2$<br>-UHMWPE: $193 \mu\text{m}^2$                      |

Tab. 8 Zusammenfassung veröffentlichter Daten aus der Literatur zur Tribologie DLC-beschichteter Oberflächen *in vitro*

Eine *in vivo* durchgeführte Studie bei primären Hüftarthroplastiken verglich das Outcome DLC-beschichteter Hüftköpfe mit Keramikköpfen, jeweils artikulierend mit einer Pfanne aus UHMWPE. Nach 10-jährigem Follow-up zeigte sich, dass die Komplikationsrate DLC-beschichteter Titanhüftköpfe (Ti6Al4V) größer ist als bei Hüftköpfen aus Keramik ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). DLC-beschichtete Köpfe benötigten häufiger eine Revision (25,8% zu 11,8%), die Rate der aseptischen Lockerung war viermal so hoch wie bei reiner Keramik (41 zu 10). Untersuchungen der gescheiterten Implantate zeigten eine Ablösung der DLC-Schicht von der Titanfläche und einen daraus resultierenden verstärkten Abrieb [Taeger *et al.* 2003].

Die gegensätzlichen Aussagen in der Literatur über den Effekt von DLC-Oberflächenbeschichtungen zur Verbesserung der Prothesenlanglebigkeit und Verringerung des Abriebs sollten mit Vorsicht interpretiert werden, folgende Aspekte müssen beachtet werden: Der Oberbegriff DLC vereint eine Vielzahl unterschiedlicher Kompositionen des Materials in Bezug auf atomare Bindungsstruktur und Wasserstoffgehalt (a-C, a-C:H, ta-C, ta-C:H). Die Eigenschaften der verschiedenen Subtypen variieren beträchtlich [Hauert *et al.* 2013]. Wie bereits erwähnt kann es aufgrund der hohen inneren Druckspannung des Materials spontan zu einem Abplatzen der Schicht kommen, wenn die Anhaftung auf dem Grundmaterial nicht ausreichend ist [Walter *et al.* 1997; Robertson 2002].

Abgelöste Oberflächenpartikel erhöhen in der Folge den Abrieb und führen zur vermehrten Erzeugung von Partikeln [Love *et al.* 2013]. Gerade das Herstellungsverfahren und die DLC-Komposition haben einen großen Einfluss auf die Verspannung und Anhaftung der DLC-Schicht. Bedingt durch die unterschiedlichen Verfahren ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sehr schwierig. Zudem erwies sich das *in vitro* eingesetzte Gleitmittel als ausschlaggebend für den tribologischen Effekt [Roy & Lee 2007]. In der Literatur wird darauf hingedeutet, dass Proteine, v.a. Phospholipide, sich an der Oberfläche anlagern und die tribologischen Eigenschaften verändern [Hauert 2003].

Aufgrund dieser uneinheitlichen Ergebnisse bedarf es weiteren systematischen Studien anhand möglichst standardisierter Testverfahren *in vitro* sowie *in vivo* um den Langzeit-Einsatz in medizinischen Implantaten zu klären.

Verschiedenste Elemente können aufgrund der amorphen Struktur leicht in die DLC-Schicht eingearbeitet und die Oberfläche somit spezifischen Anforderungen angepasst werden. [Roy & Lee 2007; Hauert *et al.* 2013]. Metalle wie beispielsweise Silber können integriert werden ohne die Performance von Abriebfestigkeit und Korrosionsschutz zu beeinträchtigen. Die Dotierung mit anderen Elementen erwies sich außerdem als Vorteilhaft, da sich die innere Druckspannung der Schicht reduziert und dadurch ein Abplatzen der Schicht verhindert werden kann [Robertson 2002; Love *et al.* 2013]. Lediglich ein geringer, nicht signifikanter Verlust der Härte lässt sich durch die Silberdotierung beobachten [Choi *et al.* 2007]. Endrino und Kollegen wiesen nach, dass sich aufgrund der leicht reduzierten Härte der silberhaltigen DLC-Schicht der UHMWPE-Abrieb gegenüber einer reinen DLC-Oberfläche verringert [Endrino *et al.* 2010]. Allgemein geht man von einer Verbesserung der tribologischen Eigenschaften von DLC durch eine Dotierung mit Silber aus [Kwok *et al.* 2007]. Untersuchungen der silberdotierten DLC-Schicht zeigten, dass Silber in metallischem Zustand in der Kohlenstoffmatrix vorliegt ohne Bindungen zu den Kohlenstoffatomen auszubilden [Kwok *et al.* 2007]. Die amorphe Kohlenstoffstruktur bleibt unabhängig vom Silbergehalt intakt [Endrino *et al.* 2010]. Dies deckt sich mit den durchgeführten Untersuchungen zu den Ag-DLC-Schichten, welche in dieser Arbeit verwendet wurden (siehe unter 5.2.2).

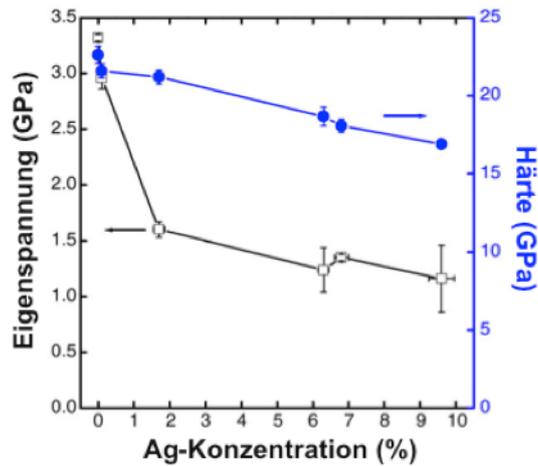


Abb. 24 Innere Druckspannung und Härte von silberdotierten DLC-Schichten in Abhängigkeit von der Silberkonzentration (modifiziert nach [Choi et al. 2007])

### 5.2.4.3 Antibakterielle Eigenschaften

In der Literatur finden sich konträre Aussagen zur antimikrobiellen Wirksamkeit reiner DLC-Schichten. Marciano und Kollegen postulierten, dass von reinen DLC-Schichten eine antimikrobielle Aktivität ausgeht. Sie vermuteten, dass es durch physikalische Interaktionen mit der Zellwand zu Membranschäden und folgender Zellinaktivierung kommt [Marciano et al. 2009]. Ein anderer Adhäsionsvergleich von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf DLC und Titan ergab, dass DLC selbst keinen antiinfektiösen Vorteil bietet. Obwohl die Hydrophobizität der Oberfläche herabgesetzt wird, konnte die erwartete, erschwerte Bakterienanhaftung nicht nachgewiesen werden. Die Adhäsion von *S. epidermidis* war auf DLC leicht höher als auf Titan, bei *S. aureus* in etwa gleich stark [Soininen et al. 2011]. Katsikogianni und Mitarbeiter untersuchten die Oberflächenadhäsion von *Staphylococcus epidermidis* auf unbeschichtetem PVC, DLC sowie silberhaltigem DLC (Ag-DLC). Es zeigte sich eine reduzierte Bakterienanhaftung auf der DLC-Beschichtung, die nach Meinung der Autoren der verminderten Oberflächenhydrophobizität der DLC-Schicht gegenüber PVC zugerechnet wurde. Die zusätzliche Silberdotierung führte zu einer weiteren Absenkung der bakteriellen Oberflächenadhäsion [Katsikogianni et al. 2006].

Es gibt weitere Studien *in vitro*, die den antibakteriellen Effekt silberdotierter DLC-Beschichtungen bestätigen. Marciano und Kollegen zeigten den hohen antibakteriellen Effekt gegenüber *E. coli* einer silbernanopartikelhaltigen DLC-Oberfläche im Vergleich zu rostfreiem Stahl [Marciano et al. 2009]. Außerdem wiesen sie in Anlehnung an die Literatur nach, dass bei der verwendeten

Beschichtung die Druckspannung durch die Silberdotierung herabgesetzt werden konnte. Untersuchungen der Filmstruktur ergaben keine erheblichen Änderungen durch die Einarbeitung von Silbernanopartikeln. Wie bereits beschrieben reduzierte sich lediglich die Härte geringfügig. Kwok und Mitarbeiter belegten eindeutig die exzellenten antimikrobiellen Fähigkeiten der Ag-DLC Schicht. Die durchschnittliche Anzahl anhaftender *E. coli* Bakterien der Ag-DLC Proben wurde verglichen mit der Adhäsion auf DLC und Silizium. Es ergab sich ein antibakterieller Effekt von > 98% [Kwok *et al.* 2007]. Die Arbeitsgruppe um Chekan konnte nachweisen, dass eine silberbeschichtete DLC-Oberfläche auf Titan antibakteriell effektiver gegenüber *S. aureus* ist (Bakteriendichte  $1,07 \times 10^6 / \text{mm}^2$ ) als eine reine DLC-Schicht, beziehungsweise pures Titan (Bakteriendichte  $2,58 \times 10^6 / \text{mm}^2$ ) [Chekan *et al.* 2009]. Auch Baba und Kollegen zeigten die antibakterielle Aktivität silberhaltiger DLC-Oberflächen gegenüber *S. aureus*. Überraschenderweise war bei ihnen der bakterizide Effekt bei unterschiedlichen Ag-Konzentrationen annähernd gleich stark, ohne das dafür eine Erklärung gefunden werden konnte [Baba *et al.* 2013].

| Quelle              | Material  | Bakterienstamm  | Bebrütungszeit | Antimikrobieller Effekt   |
|---------------------|---|---|----------------|---|
| Marciano, 2009      | -DLC<br>-Ag-DLC<br>-Rostfreier Stahl                                    | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922                             | 3 Stunden      | Bakterizide Rate:<br>-DLC: 30%<br>-Ag-DLC: 68%<br>-Rostfreier Stahl: 0%   |
| Soinen, 2011        | -DLC<br>-Titan  | <i>S. aureus</i> (S-15981)<br><i>S. epidermidis</i><br>ATCC 35984 | 2 Stunden      | Kein Unterschied der bakteriellen Adhäsion feststellbar   |
| Katsikogianni, 2006 | -DLC<br>-Ag-DLC<br>-PVP   | <i>S. epidermidis</i><br>ATCC 35984                               | 2,5 Stunden    | Oberflächenadhäsion in %<br>-DLC: 54%<br>-Ag-DLC: 43%<br>-PVC: 85%  |
| Kwok, 2007          | -Ag-DLC<br>-DLC<br>-Silizium  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 10536                             | 24 Stunden     | Antibakterieller Effekt (gegenüber Kontrolle)<br>-Ag-DLC: > 98%   |
| Chekan, 2009        | -Ag-DLC<br>-Titan<br>(Ti1.6Al5Mo4V)                                     | <i>S. aureus</i><br>ATCC 29213                                    | 24 Stunden     | Bakteriendichte nach 24 Stunden:<br>-Ag-DLC: $1,07 \times 10^6 / \text{mm}^2$<br>-Titan: $2,58 \times 10^9 / \text{mm}^2$   |
| Baba, 2013          | -3,8%Ag-DLC<br>-6,9%Ag-DLC<br>-12,3%Ag-DLC<br>-DLC<br>-Rostfreier Stahl | <i>S. aureus</i>  | 12 Stunden     | Antibakterieller Effekt:<br>-3,8%Ag-DLC: 85%<br>-6,9%Ag-DLC: 76%<br>-12,3%Ag-DLC: 77%<br>-DLC: 11%<br>-Rostfreier Stahl: 9% |

Tab. 9 Zusammenfassung veröffentlichter Daten aus der Literatur zur antimikrobiellen Wirksamkeit Ag-DLC-haltiger Oberflächen *in vitro*

Dem guten antimikrobiellen Effekt der silberhaltigen DLC-Oberflächenbeschichtung muss der konzentrationsabhängige zytotoxische Effekt entgegengehalten werden, der sich in einigen Studien zeigte. Chekan und Mitarbeiter wiesen die Wachstumshemmung von Gliomzellen aus Ratten auf Ag-DLC nach [Chekan *et al.* 2009].

Die antimikrobiellen Eigenschaften der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten abriebfesten DLC-Oberflächen sind konform zu den Ergebnissen aus der Literatur und sollen im Folgenden zusammenfassend erörtert werden.

### 5.2.5 Silber-DLC Beschichtung auf Titan

Die pure DLC-Beschichtung wies in der vorliegenden Dissertation keinen wesentlichen Unterschied in der bakteriellen Oberflächenbesiedelung im Vergleich zu Titan auf. Ebenso wie bei der Arbeitsgruppe um Soinen, die den gleichen Referenzkeim verwendeten, zeigte sich eine leicht verstärkte Adhäsion von *S. epidermidis* auf der DLC-Oberfläche sowie eine minimal erhöhte Anhaftung von *S. aureus*. Die Adhäsion von *P. aeruginosa* war schwach vermindert. Es konnte eine signifikante Reduktion der bakteriellen Adhäsion aller drei Referenzkeime bei silberdotierten DLC-Oberflächen beobachtet werden. Wie in der Literatur beschrieben, bestätigte sich die von der Silberionenkonzentration abhängige,

antibakterielle Wirkung, was man anhand der Ag:PVP 1:10 und 1:20 Beschichtungen im Vergleich zu Ag:PVP 1:1 und 1:2 gut beobachten konnte. Der größte antibakterielle Effekt zeigte sich bei der höchsten verwendeten Silberkonzentration (Ag:PVP 1:1). Diese Beschichtung stellte sich im Verlauf der Versuche als nicht stabil heraus und wurde nicht mehr verwendet. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Kolloide fiel ein Großteil der stabilisierten Nanopartikel während der UV-Bestrahlung aus.

Die Reduktion der Keimdichte im Nährmedium bei den Ag-DLC Proben lässt auf eine Freisetzung der Silbernanopartikel an die umgebende Flüssigkeit mit anschließender Wachstumshemmung der Keime schließen. Mit steigendem Silbergehalt in der DLC-Schicht verstärkte sich dieser Effekt. *P. aeruginosa* zeigte im Vergleich zu den anderen getesteten Keimen einerseits das stärkste Wachstum auf den Oberflächen sowie im Nährmedium, andererseits fiel der antibakterielle Effekt am höchsten aus. In der Literatur ist die höhere Anfälligkeit gram-negativer Erreger gegen Silber beschrieben [Flores *et al.* 2013].

In weiteren Untersuchungen muss die Frage der Biokompatibilität der verschiedenen silberhaltigen DLC-Beschichtungen auf Titan noch geklärt werden. Die Zytotoxizität der Silberionen darf die Zelladhäsion und das Zellwachstum körpereigener Zellen auf der Oberfläche langfristig nicht beeinflussen.

Titan gilt als optimales Implantatmaterial für Endoprothesen, eignet sich aufgrund der schlechten tribologischen Eigenschaften jedoch nicht für den lasttragenden Einsatz im Gelenk [Long & Rack 1998]. Durch die Oberflächenbeschichtung mit silberhaltigem DLC könnte sich einerseits der Prothesenverschleiß verringern und andererseits ein Infektionsschutz gewährleisten lassen. Zurzeit ist keine antibakterielle Beschichtung für die lasttragende Komponente in künstlichen Gelenken etabliert [Ewald *et al.* 2006]. Das verwendete Dip-Coating Verfahren mit anschließender Ionenimplantation soll zudem eine bessere DLC-Haftung auf der Unterfläche gewährleisten. Da es sich nicht um eine reine Depositionsmethode handelt, ist eine bessere Grenzflächendurchmischung möglich. Die Reichweite der Projektionen bei der Ionenimplantation ist größer als die Dicke der aufgetragenen Schicht, sodass sich diese sehr gut mit dem darunter liegenden Substrat verbindet (siehe Abschnitt 5.2.4) [Schwarz *et al.* 2008].

### **5.2.6 Silber (Kupfer)-DLC Beschichtung auf Polyethylen**

In der Literatur findet sich bislang kein Verfahren, dass die DLC-Oberflächenumwandlung auf UHMWPE mit antimikrobieller Ausrüstung durch Integration von Silber beschreibt. Bisher sind einige Ansätze der DLC-Umwandlung auf UHMWPE (Depositionsverfahren und Ionenimplantation) beschrieben [Marcondes *et al.* 2004; Sheeja *et al.* 2005; Bertoti *et al.* 2007; Xie *et al.* 2009; Puértolas *et al.* 2010]. Einzig Del Prado und Kollegen versuchten der DLC-Polyethylenschicht durch Integration von Fluor antimikrobielle Eigenschaften zu verleihen [Del Prado *et al.* 2012].

Durch das angewandte Verfahren der Implantation wird die Oberfläche des Polyethylens ioneninduziert direkt in DLC umgewandelt anstatt mit einem DLC-Film beschichtet zu werden, Haftungsprobleme sollen dadurch überwunden werden.

Bei den DLC-Beschichtungen auf Polyethylen ergaben sich zwei Faktoren, welche Einfluss auf den antimikrobiellen Effekt haben: Einerseits die Konzentration der Silbernanopartikel, andererseits die Implantationsenergie des Silbers. Eine höhere Fluenz der Ag-Nanopartikel wirkte stärker bakterizid. Die Implantation von Silber bei niedrigeren Energien zeigte einen stärkeren antibakteriellen Effekt als die Implantation bei höheren Energien. Es zeigte sich hingegen kein Unterschied in der antibakteriellen Potenz aufgrund der Implantationsmethode (DLC-Umwandlung durch Stickstoffionenimplantation mit anschließender Silberimplantation und direkte DLC-Umwandlung via Silberimplantation). Je höher die Implantationsenergie ist, desto tiefer liegen die Silbernanopartikel in der Schicht und desto geringer ist die Silberfreisetzung und antimikrobielle Potenz der Schicht. Wie in der Literatur beschrieben, ist die Ag-Ionenfreisetzung aus Nanopartikeln, die tiefer in der Polymermatrix gelagert sind, viel langsamer als bei oberflächlicher Implantation [Furno *et al.* 2004]. DLC stellt aufgrund der hohen atomaren Dichte eine Diffusionsbarriere für metallische Ionen dar, daher wird bei der tieferen Implantation von Silber eine geringere Ionenfreisetzung erwartet [Hauert *et al.* 2013]. Eine verbesserte antimikrobielle Wirksamkeit wird erreicht, wenn eine hohe Ag<sup>+</sup>-Freisetzung gegeben ist [Darouiche 1999; Kumar & Munstedt 2005]. In TEM-Untersuchungen der UHMWPE-Proben an der Universität Augsburg zeigte sich, dass eine niedrige Implantationsenergie zu einer oberflächennahen Agglomeration der Ag-Nanopartikel führt (siehe Abbildung 23). Die Silberionen bilden keine Bindungen zu der Kohlenstoffmatrix aus und können dadurch leicht aus der

Beschichtung freigesetzt werden. Durch die zügige Silberfreisetzung bei oberflächlicher Implantation wird zudem die verbesserte Biokompatibilität der Oberfläche schneller gewährleistet.

Die Kupfer-implantierten Proben lassen sich aufgrund der fehlerhaften Implantation bei der Ag 80 keV-Beschichtung nicht direkt vergleichen. Mit 55 keV implantierte Cu-Ionen besitzen in PE die gleiche Reichweite wie mit 80 keV implantierte Ag-Ionen, jedoch war bei diesen Proben die Kupferfluenz zehn mal höher als bei den 80 keV-Proben. Dass die antibakterielle Wirkung der Kupferschicht jedoch trotz der höheren Ionenanzahl nicht signifikant verstärkt war, lässt sich durch die bereits bekannte geringere antibakterielle Potenz des Kupfers bei gleichzeitig günstigeren zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu Silber zurückführen [Heidenau *et al.* 2005].

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Implantatassoziierte Infektionen gelten neben der durch Abriebpartikel verursachten aseptischen Lockerung als ein Hauptproblem im klinischen Alltag und können zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Strenge Infektionsprophylaxe sowie die präventive Gabe von Antibiotika konnten die Infektionsrate zwar senken, doch steigende Operationszahlen sowie erweiterte Resistenzentwicklung gegen verschiedene Antibiotikaklassen haben den Fokus der Forschung auf die Entwicklung intelligenter, antimikrobieller Oberflächenmodifikationen gelenkt. In dieser Hinsicht stellt eine Implantatoberflächenbeschichtung auf Titan, Kobalt-Chrom-Molybdän und Polyethylen, welche einerseits die bakterielle Adhäsion mit konsekutiver Ausbildung eines Biofilms verhindert und andererseits den Partikelabrieb tribologisch belasteter Gelenkpartner verhindert, einen Lösungsansatz dar. Diamond-like carbon ist bekannt für seine hervorragenden mechanischen Eigenschaften (Härte, Reibung, Verschleißfestigkeit, chem. Trägheit), durch Modifikation der DLC-Schicht via Implantation von Metallionen (Silber, Kupfer) werden diese Eigenschaften nicht verändert und gleichzeitig ein antimikrobieller Schutz hergestellt.

Ziel dieser Arbeit war es die Oberflächenadhäsion häufiger Infektionserreger *in vitro* nach 24 stündiger Inkubation an typischen Implantatmaterialien zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte einerseits quantitativ durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten nach ultraschallvermittelter Ablösung der Bakterien von den Prüfkörpern, andererseits qualitativ anhand der Rasterelektronenmikroskopie. Zudem wurde der indirekte antimikrobielle Effekt durch Silberfreisetzung der Beschichtung im umgebenden Medium quantifiziert. Die verschiedenen Prüfkörper wurden an der Universität Augsburg, Experimentalphysik IV, hergestellt. Die Titanproben (TiAl6V4) wurden mittels Dip-Coating und anschließender Ioneninduzierten Polymerumwandlung beschichtet, die Umwandlung der UHMWPE-Oberfläche zu DLC erfolgte direkt durch Stickstoff- bzw. Metallionenimplantation.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die hervorragende antimikrobielle Wirkung der silbernanopartikelhaltigen DLC-Oberflächenbeschichtungen gegenüber den verwendeten gram-positiven sowie gram-negativen Erregern. Dabei konnten zwei Parameter identifiziert werden, die Einfluss auf den antimikrobiellen Effekt haben: 1. Die antimikrobielle Potenz steigt bei höherer Konzentration der Ag-Nanopartikel in der DLC-Schicht. 2. Bei der Ionenimplantation lagern sich die Silber-

Nanopartikel bei höheren Implantationsenergien tiefer in der Schicht ab. Die antibakterielle Wirksamkeit ist bei hohen Implantationsenergien geringer, da die Abgabe des Silbers verzögert ist. Die Freisetzung oberflächennaher Silberpartikel erfolgt zügiger, wodurch die Potenz die initiale bakterielle Adhäsion zu verhindern größer ist.

Die bakterielle Oberflächenadhäsion auf Titan ließ sich abhängig von der verwendeten Silberkonzentration und dem getesteten Referenzkeim um 0,7 (Ag:PVP 1:20) bis zu 5,6 Ig-Stufen (Ag:PVP 1:2) verringern. Auf beschichteten Polyethylen-Proben wurde eine maximale Reduktion der bakteriellen Adhäsion von 2,2 Ig-Stufen (Ag 5kV, Fluenz  $1 \times 10^{17}$ ) erreicht. Bei Proben mit geringerer Konzentration der Ag-Nanopartikel und höherer Implantationsenergie schwächte sich der antimikrobielle Effekt ab, bei der Probe mit der höchsten Implantationsenergie (100keV, Fluenz  $1 \times 10^{17}$ ) zeigte sich sogar ein leicht verstärktes Wachstum an der Oberfläche (+0,25 Ig-Stufen). Im Kulturmedium zeigten sich bedingt durch die Silberfreisetzung ähnliche Ergebnisse.

Durch die Ag-DLC Beschichtung auf Titan und UHMWPE ist es potenziell möglich, den Abrieb der beiden tribologisch belasteten Oberflächen der heutzutage favorisierten Hart-/Weichpaarung zu verringern und gleichzeitig einen antibakteriellen Schutz zu gewährleisten. Ferner liegt bisher keine antibakterielle Oberfläche für tribologisch belastete Implantate vor.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Akiyama, H. and Okamoto, S. Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection: clinical experience with a modified Foley catheter and drainage system. *J Urol* 121 (1979) 40-42
- AlBuhairan, B., Hind, D. and Hutchinson, A. Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br* 90 (2008) 915-919
- Allen, M., Law, F. and Rushton, N. The effects of diamond-like carbon coatings on macrophages, fibroblasts and osteoblast-like cells in vitro. *Clinical Materials* 17 (1994) 1-10
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. and Paknikar, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 179 (2008) 93-100
- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. and Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3 (2009) 279-290
- Baba, K., Hatada, R., Flege, S., Ensinger, W., Shibata, Y., Nakashima, J., Sawase, T. and Morimura, T. Preparation and antibacterial properties of Ag-containing diamond-like carbon films prepared by a combination of magnetron sputtering and plasma source ion implantation. *Vacuum* 89 (2013) 179-184
- Baden, E. Prosthetic therapy of congenital and acquired clefts of the palate: an historical essay. *J Hist Med Allied Sci* 10 (1955) 290-301
- Berberi, E. F., Hanssen, A. D., Duffy, M. C., Steckelberg, J. M., Ilstrup, D. M., Harmsen, W. S. and Osmon, D. R. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis* 27 (1998) 1247-1254
- Berberi, E. F., Hanssen, A. D., Duffy, M. C., Steckelberg, J. M., Ilstrup, D. M., Harmsen, W. S. and Osmon, D. R. Risk factors for prosthetic joint infection: Case-control study. *Clinical Infectious Diseases* 27 (1998) 1247-1254
- Bertoti, I., Mohai, M., T $\sqrt{\geq}$ th, A. and Ujv $\sqrt{\circ}$  ri, T. Nitrogen-PBII modification of ultra-high molecular weight polyethylene: Composition, structure and nanomechanical properties. *Surface and Coatings Technology* 201 (2007) 6839-6842
- Borkow, G. and Gabbay, J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (2004) 1728-1730
- Bosetti, M., Mass $\sqrt{\textcircled{A}}$ , A., Tobin, E. and Cannas, M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 23 (2002) 887-892
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J. and Hofmann, M. C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 88 (2005) 412-419
- Bruellhoff, K., Fiedler, J., Moller, M., Groll, J. and Brenner, R. E. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs* 33 (2010) 646-653
- Bumgardner, J. D., Wisner, R., Gerard, P. D., Bergin, P., Chestnutt, B., Marin, M., Ramsey, V., Elder, S. H. and Gilbert, J. A. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J Biomater Sci Polym Ed* 14 (2003) 423-438
- Campoccia, D., Montanaro, L. and Arciola, C. R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27 (2006) 2331-2339

- Charnley, J. "Low friction arthroplasty of the hip: theory and practice" Springer, 1979,
- Chekan, N. M., Beliauskii, N. M., Akulich, V. V., Pozdniak, L. V., Sergeeva, E. K., Chernov, A. N., Kazbanov, V. V. and Kulchitsky, V. A. Biological activity of silver-doped DLC films. *Diamond and Related Materials* 18 (2009) 1006-1009
- Choi, H. W., Choi, J.-H., Lee, K.-R., Ahn, J.-P. and Oh, K. H. Structure and mechanical properties of Ag-incorporated DLC films prepared by a hybrid ion beam deposition system. *Thin Solid Films* 516 (2007) 248-251
- Christensen, G. D., Baldassarri, L. and Simpson, W. A. Methods for studying microbial colonization of plastics. *Methods Enzymol* 253 (1995) 477-500
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. and Beachey, E. H. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 40 (1983) 407-410
- Costerton, J. W., Montanaro, L. and Arciola, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28 (2005) 1062-1068
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (1999) 1318-1322
- Cui, F. Z. and Li, D. J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. *Surface and Coatings Technology* 131 (2000) 481-487
- Dahlberg, P. J., Agger, W. A., Singer, J. R., Yutuc, W. R., Newcomer, K. L., Schaper, A. and Rooney, B. L. Subclavian hemodialysis catheter infections: a prospective, randomized trial of an attachable silver-impregnated cuff for prevention of catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16 (1995) 506-511
- Daniel, J., Pynsent, P. B. and McMinn, D. J. Metal-on-metal resurfacing of the hip in patients under the age of 55 years with osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 86 (2004) 177-184
- Darouiche, R. O. Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses. *Clin Infect Dis* 29 (1999) 1371-1377; quiz 1378
- Darouiche, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis* 33 (2001) 1567-1572
- Darouiche, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 350 (2004) 1422-1429
- Darouiche, R. O., Green, G. and Mansouri, M. D. Antimicrobial activity of antiseptic-coated orthopaedic devices. *International journal of antimicrobial agents* 10 (1998) 83-86
- Darouiche, R. O., Meade, R., Mansouri, M. and Raad, II In vivo efficacy of antimicrobial-coated fabric from prosthetic heart valve sewing rings. *J Heart Valve Dis* 7 (1998) 639-646
- de Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* 44 (1994) 636-641
- Dearnaley, G. and Arps, J. H. Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: A review. *Surface and Coatings Technology* 200 (2005) 2518-2524
- Del Prado, G., Terriza, A., Ortiz-Perez, A., Molina-Manso, D., Mahillo, I., Yubero, F., Puertolas, J. A., Manrubia-Cobo, M., Gomez Barrena, E. and Esteban, J. DLC coatings for UHMWPE: relationship between bacterial adherence and surface properties. *J Biomed Mater Res A* 100 (2012) 2813-2820
- Dell'Acqua, G., Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Saba, V., Scalise, G., Gov, Y. and Balaban, N. Suppression of drug-resistant *Staphylococcal* Infections by the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide. *J Infect Dis* 190 (2004) 318-320

- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15 (2002) 167-193
- Du, C., Su, X. W., Cui, F. Z. and Zhu, X. D. Morphological behaviour of osteoblasts on diamond-like carbon coating and amorphous C,ÀN film in organ culture. *Biomaterials* 19 (1998) 651-658
- Ehrlich, H. Biomaterials and Biological Materials, Common Definitions, History, and Classification. In:"Biological Materials of Marine Origin: Invertebrates-Inspires Systems 1", (Hrsg.), Springer, 2010, 1st Edition, 3-22
- Endrino, J. L., Sánchez-López, J. C., Galindo, R. E., Horwat, D. and Anders, A. Beneficial silver: antibacterial nanocomposite Ag-DLC coating to reduce osteolysis of orthopaedic implants. *Journal of Physics: Conference Series* 252 (2010) 012005
- Ewald, A., Gluckermann, S. K., Thull, R. and Gbureck, U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online* 5 (2006) 22
- Fisher, J., Hu, X. Q., Stewart, T. D., Williams, S., Tipper, J. L., Ingham, E., Stone, M. H., Davies, C., Hatto, P., Bolton, J., Riley, M., Hardaker, C., Isaac, G. H. and Berry, G. Wear of surface engineered metal-on-metal hip prostheses. *J Mater Sci Mater Med* 15 (2004) 225-235
- Flores, C. Y., Minan, A. G., Grillo, C. A., Salvarezza, R. C., Vericat, C. and Schilardi, P. L. Citrate-Capped Silver Nanoparticles Showing Good Bactericidal Effect against Both Planktonic and Sessile Bacteria and a Low Cytotoxicity to Osteoblastic Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 5 (2013) 3149-3159
- Francolini, I. and Donelli, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59 (2010) 227-238
- Furno, F., Morley, K. S., Wong, B., Sharp, B. L., Arnold, P. L., Howdle, S. M., Bayston, R., Brown, P. D., Winship, P. D. and Reid, H. J. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother* 54 (2004) 1019-1024
- Galanakos, S. P., Papadakis, S. A., Kateros, K., Papakostas, I. and Macheras, G. Biofilm and orthopaedic practice: the world of microbes in a world of implants. *Orthopaedics and Trauma* 23 (2009) 175-179
- Geipel, U. and Herrmann, M. [The infected implant. Part 1: bacteriology]. *Orthopade* 33 (2004) 1411-1426; 1427-1418
- Giulieri, S. G., Graber, P., Ochsner, P. E. and Zimmerli, W. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection* 32 (2004) 222-228
- Gollwitzer, H. and Gerdesmeyer, L. Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In:"Ossäre Integration", (Hrsg.), Springer Berlin Heidelberg, 2006, 62-68
- Gollwitzer, H., Ibrahim, K., Meyer, H., Mittelmeier, W., Busch, R. and Stemberger, A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother* 51 (2003) 585-591
- Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Gonsel, A., Kemper, F. H., Winkelmann, W. and Von Eiff, C. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 25 (2004) 5547-5556
- Greene, J. W., Malkani, A. L., Kolisek, F. R., Jessup, N. M. and Baker, D. L. Ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 24 (2009) 15-18

- Greil, J., Spies, T., Boswald, M., Bechert, T., Lugauer, S., Regenfus, A. and Guggenbichler, J. P. Analysis of the acute cytotoxicity of the Erlanger silver catheter. *Infection* 27 Suppl 1 (1999) S34-37
- Grill, A. Diamond-like carbon: state of the art. *Diamond and Related Materials* 8 (1999) 428-434
- Grill, A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials, An overview. *Diamond and Related Materials* 12 (2003) 166-170
- Grill, A. and Meyerson, B. Development and Status of Diamondlike Carbon. In: "Synthetic Diamond: Emerging CVD Science and Technology", K. E. Spear, J. P. Dismukes and E. Society (Hrsg.), Wiley, 1994, 91-144
- Gristina, A. G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237 (1987) 1588-1595
- Gristina, A. G. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop Relat Res* (1994) 106-118
- Gristina, A. G. and Costerton, J. W. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 67 (1985) 264-273
- Guglielmotti, M. B., Renou, S. and Cabrini, R. L. A histomorphometric study of tissue interface by laminar implant test in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14 (1999) 565-570
- Haaker, R., Senge, A., Kramer, J. and Rubenthaler, F. [Osteomyelitis after endoprostheses]. *Orthopade* 33 (2004) 431-438
- Hamadouche, M., Boutin, P., Daussange, J., Bolander, M. E. and Sedel, L. Alumina-on-alumina total hip arthroplasty: a minimum 18.5-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 69-77
- Hardes, J., Ahrens, H., Gebert, C., Streitbuerger, A., Buerger, H., Erren, M., Gunsel, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Winkelmann, W. and Gosheger, G. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials* 28 (2007) 2869-2875
- Harris, W. H. and Sledge, C. B. Total Hip and Total Knee Replacement. *New England Journal of Medicine* 323 (1990) 725-731
- Hauert, R. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Related Materials* 12 (2003) 583-589
- Hauert, R., Thorwarth, K. and Thorwarth, G. An overview on diamond-like carbon coatings in medical applications. *Surface and Coatings Technology* (2013)
- Heidenau, F., Mittelmeier, W., Detsch, R., Haenle, M., Stenzel, F., Ziegler, G. and Gollwitzer, H. A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 883-888
- Heimke, G. "Osseo-Integrated Implants: Implants in Oral and Ent Surgery" CRC PressINC, 1990,
- Hernigou, P. and Bahrami, T. Zirconia and alumina ceramics in comparison with stainless-steel heads. Polyethylene wear after a minimum ten-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 85 (2003) 504-509
- Hetrick, E. M. and Schoenfish, M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev* 35 (2006) 780-789
- Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J. T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Noth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J. and Hutmacher, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (2013) 581-603

- Ingham, E. and Fisher, J. Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 214 (2000) 21-37
- Jamsen, E., Furnes, O., Engesaeter, L. B., Konttinen, Y. T., Odgaard, A., Stefansdottir, A. and Lidgren, L. Prevention of deep infection in joint replacement surgery. *Acta Orthop* 81 (2010) 660-666
- Jones, V. C., Barton, D. C., Auger, D. D., Hardaker, C., Stone, M. H. and Fisher, J. Simulation of tibial counterface wear in mobile bearing knees with uncoated and ADLC coated surfaces. *Biomed Mater Eng* 11 (2001) 105-115
- Kaplan, S. S., Heine, R. P. and Simmons, R. L. Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect Immun* 67 (1999) 1640-1645
- Karchmer, T. B., Giannetta, E. T., Muto, C. A., Strain, B. A. and Farr, B. M. A randomized crossover study of silver-coated urinary catheters in hospitalized patients. *Arch Intern Med* 160 (2000) 3294-3298
- Katsikogianni, M., Spiliopoulou, I., Dowling, D. P. and Missirlis, Y. F. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. *J Mater Sci Mater Med* 17 (2006) 679-689
- Kazemzadeh-Narbat, M., Kindrachuk, J., Duan, K., Jenssen, H., Hancock, R. E. and Wang, R. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* 31 (2010) 9519-9526
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H. and Cho, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3 (2007) 95-101
- Kumar, R. and Munstedt, H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials* 26 (2005) 2081-2088
- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F. and Halpern, M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007) 780-785
- Kurtz, S. M., Lau, E., Schmier, J., Ong, K. L., Zhao, K. and Parvizi, J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 23 (2008) 984-991
- Kurtz, S. M., Ong, K. L., Lau, E., Widmer, M., Maravic, M., Gomez-Barrena, E., de Pina Mde, F., Manno, V., Torre, M., Walter, W. L., de Steiger, R., Geesink, R. G., Peltola, M. and Roder, C. International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop* 35 (2011) 1783-1789
- Kwok, S. C. H., Zhang, W., Wan, G. J., McKenzie, D. R., Bilek, M. M. M. and Chu, P. K. Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diamond and Related Materials* 16 (2007) 1353-1360
- Laffer, R., Graber, P., Ochsner, P. and Zimmerli, W. The case for differentiated orthopedic management of prosthetic knee-associated infection. *Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (2004) 318-318
- Lappalainen, R., Selenius, M., Anttila, A., Konttinen, Y. T. and Santavirta, S. S. Reduction of wear in total hip replacement prostheses by amorphous diamond coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 66B (2003) 410-413
- Learmonth, I. D., Young, C. and Rorabeck, C. The operation of the century: total hip replacement. *The Lancet* 370 (2007) 1508-1519
- Lentino, J. R. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 36 (2003) 1157-1161

- Liu, X. Y., Chu, P. K. and Ding, C. X. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R-Rep.* 47 (2004) 49-121
- Liu, Y., Zheng, Z., Zara, J. N., Hsu, C., Soofer, D. E., Lee, K. S., Siu, R. K., Miller, L. S., Zhang, X., Carpenter, D., Wang, C., Ting, K. and Soo, C. The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (dl-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel. *Biomaterials* 33 (2012) 8745-8756
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K., Chiu, J. F. and Che, C. M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 12 (2007) 527-534
- Long, M. and Rack, H. J. Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective. *Biomaterials* 19 (1998) 1621-1639
- Love, C. A., Cook, R. B., Harvey, T. J., Dearnley, P. A. and Wood, R. J. K. Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants, A review. *Tribology International* 63 (2013) 141-150
- Lucke, M., Wildemann, B., Sadoni, S., Surke, C., Schiller, R., Stemberger, A., Raschke, M., Haas, N. P. and Schmidmaier, G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 36 (2005) 770-778
- M. Raffi, F. H., T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, M.M. Hasan Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against E. Coli ATCC-15224. *J. Mater. Sci. Technol.* 24 (2008) 192-196
- Maderazo, E. G., Judson, S. and Pasternak, H. Late infections of total joint prostheses. A review and recommendations for prevention. *Clin Orthop Relat Res* (1988) 131-142
- Mändl, S., Krause, D., Thorwarth, G., Sader, R., Zeilhofer, F., Horch, H. H. and Rauschenbach, B. Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants. *Surface and Coatings Technology* 142-144 (2001) 1046-1050
- Marambio-Jones, C. and Hoek, E. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12 (2010) 1531-1551
- Marciano, F. R., Bonetti, L. F., Santos, L. V., Da-Silva, N. S., Corat, E. J. and Trava-Airoldi, V. J. Antibacterial activity of DLC and Ag-DLC films produced by PECVD technique. *Diamond and Related Materials* 18 (2009) 1010-1014
- Marcondes, A. R., Ueda, M., Kostov, K. G., Beloto, A. F., Leite, N. F., Gomes, G. F. and Lepienski, C. M. Improvements of ultra-high molecular weight polyethylene mechanical properties by nitrogen plasma immersion ion implantation. *Brazilian Journal of Physics* 34 (2004) 1667-1672
- Marculescu, C. E. and Osmon, D. R. Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *Infect Dis Clin North Am* 19 (2005) 931-946
- Marks, N. A., McKenzie, D. R., Pailthorpe, B. A., Bernasconi, M. and Parrinello, M. Microscopic structure of tetrahedral amorphous carbon. *Phys Rev Lett* 76 (1996) 768-771
- Massè, A., Bruno, A., Bosetti, M., Biasibetti, A., Cannas, M. and Gallinaro, P. Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: Clinical and microbiological results. *J Biomed Mater Res* 53 (2000) 600-604
- Matar, W. Y., Jafari, S. M., Restrepo, C., Austin, M., Purtill, J. J. and Parvizi, J. Preventing infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 92 Suppl 2 (2010) 36-46

- McCann, M. T., Gilmore, B. F. and Gorman, S. P. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol* 60 (2008) 1551-1571
- McCauley, R. L., Linares, H. A., Pelligrini, V., Herndon, D. N., Robson, M. C. and Hegggers, J. P. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res* 46 (1989) 267-274
- McKeen, L. 1 - Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization. In: "The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers (Third Edition)", (Hrsg.), William Andrew Publishing, Boston, 2012, 1-40
- Miner, A. L., Losina, E., Katz, J. N., Fossel, A. H. and Platt, R. Deep infection after total knee replacement: impact of laminar airflow systems and body exhaust suits in the modern operating room. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28 (2007) 222-226
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo-Filho, A. C., de Camargo, E. R. and Barbosa, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International journal of antimicrobial agents* 34 (2009) 103-110
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. and Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (2005) 2346-2353
- Mounier, E. and Pauleau, Y. Mechanisms of intrinsic stress generation in amorphous carbon thin films prepared by magnetron sputtering. *Diamond and Related Materials* 6 (1997) 1182-1191
- Nablo, B. J., Rothrock, A. R. and Schoenfisch, M. H. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials* 26 (2005) 917-924
- Onate, J. I., Comin, M., Bracerias, I., Garcia, A., Viviente, J. L., Brizuela, M., Garagorri, N., Peris, J. L. and Alava, J. I. Wear reduction effect on ultra-high-molecular-weight polyethylene by application of hard coatings and ion implantation on cobalt chromium alloy, as measured in a knee wear simulation machine. *Surface and Coatings Technology* 142,Ä144 (2001) 1056-1062
- Ong, K. L., Kurtz, S. M., Lau, E., Bozic, K. J., Berry, D. J. and Parvizi, J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J Arthroplasty* 24 (2009) 105-109
- Osborn, J. F. Biomaterials and their application to implantation. *Schweizerische Monatsschrift fur Zahnheilkunde = Revue mensuelle suisse d'odontostomatologie / SSO* 89 (1979) 1138-1139
- Pal, S., Tak, Y. K. and Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73 (2007) 1712-1720
- Park, J. B. and Lakes, R. S. Introduction. In: "Biomaterials", (Hrsg.), Springer New York, 2007, p. 1-16
- Parvizi, J., Saleh, K. J., Ragland, P. S., Pour, A. E. and Mont, M. A. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop* 79 (2008) 335-341
- Paul, R., Bhattacharyya, S. R., Bhar, R. and Pal, A. K. Modulation of residual stress in diamond like carbon films with incorporation of nanocrystalline gold. *Applied Surface Science* 257 (2011) 10451-10458
- Percival, S. L., Bowler, P. G. and Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* 60 (2005) 1-7
- Pivec, R., Johnson, A. J., Mears, S. C. and Mont, M. A. Hip arthroplasty. *Lancet* 380 (2012) 1768-1777

- Politano, A. D., Campbell, K. T., Rosenberger, L. H. and Sawyer, R. G. Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surg Infect (Larchmt)* 14 (2013) 8-20
- Pratten, J., Nazhat, S. N., Blaker, J. J. and Boccaccini, A. R. In vitro attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J Biomater Appl* 19 (2004) 47-57
- Prokuski, L. Prophylactic antibiotics in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 16 (2008) 283-293
- Puértolas, J. A., Martínez-Nogués, V., Martínez-Morlanes, M. J., Mariscal, M. D., Medel, F. J., López-Santos, C. and Yubero, F. Improved wear performance of ultra high molecular weight polyethylene coated with hydrogenated diamond like carbon. *Wear* 269 (2010) 458-465
- Qiu, Q. Q., Sun, W. Q. and Connor, J. Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin. In: "Comprehensive Biomaterials", D. Paul (Hrsg.), Elsevier, Oxford, 2011, 127-144
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (2nd Edition), Elsevier.
- Riley, D. K., Classen, D. C., Stevens, L. E. and Burke, J. P. A large randomized clinical trial of a silver-impregnated urinary catheter: lack of efficacy and staphylococcal superinfection. *Am J Med* 98 (1995) 349-356
- Robertson, J. Diamond-like amorphous carbon. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 37 (2002) 129-281
- Rosenman, K. D., Moss, A. and Kon, S. Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J Occup Med* 21 (1979) 430-435
- Roy, R. K. and Lee, K. R. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 83 (2007) 72-84
- Rupp, M. E., Ulphani, J. S., Fey, P. D., Bartscht, K. and Mack, D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 67 (1999) 2627-2632
- Saint, S., Elmore, J. G., Sullivan, S. D., Emerson, S. S. and Koepsell, T. D. The efficacy of silver alloy-coated urinary catheters in preventing urinary tract infection: a meta-analysis. *Am J Med* 105 (1998) 236-241
- Schaff, H. V., Carrel, T. P., Jamieson, W. R., Jones, K. W., Rufflanhas, J. J., Cooley, D. A., Hetzer, R., Stumpe, F., Duveau, D., Moseley, P., van Boven, W. J., Grunkemeier, G. L., Kennard, E. D. and Holubkov, R. Paravalvular leak and other events in silzone-coated mechanical heart valves: a report from AVERT. *Ann Thorac Surg* 73 (2002) 785-792
- Schenk, R. K. Bone response to grafts and implants. In: "Perspectives on biomaterials, Materials science monographs", O. C. C. Lin and E. Y. S. Chao (Hrsg.), Elsevier, Taipei, Taiwan, 1986, p. 121-136
- Schierholz, J. M., Lucas, L. J., Rump, A. and Pulverer, G. Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection* 40 (1998) 257-262
- Schmalzried, T. P., Jasty, M. and Harris, W. H. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992) 849-863
- Schwarz, F. and Stritzker, B. Plasma immersion ion implantation of polymers and silver-polymer nano composites. *Surface and Coatings Technology* 204 (2010) 1875-1879

- Schwarz, F., Thorwarth, G. and Stritzker, B. Synthesis of silver and copper nanoparticle containing a-C:H by ion irradiation of polymers. *Solid State Sciences* 11 (2009) 1819-1823
- Schwarz, F., Thorwarth, G., Wehler, T. and Stritzker, B. Silver nanocluster containing diamond like carbon. *physica status solidi (a)* 205 (2008) 976-979
- Semlitsch, M. and Willert, H. G. Implant materials for hip endoprostheses: old proofs and new trends. *Arch Orthop Trauma Surg* 114 (1995) 61-67
- Sheehan, E., McKenna, J., Mulhall, K. J., Marks, P. and McCormack, D. Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study. *J Orthop Res* 22 (2004) 39-43
- Sheeja, D., Tay, B. K., Lau, S. P. and Nung, L. N. Tribological characterisation of diamond-like carbon coatings on Co, Cr, Mo alloy for orthopaedic applications. *Surface and Coatings Technology* 146, 147 (2001) 410-416
- Sheeja, D., Tay, B. K. and Nung, L. N. Tribological characterization of surface modified UHMWPE against DLC-coated Co, Cr, Mo. *Surface and Coatings Technology* 190 (2005) 231-237
- Soininen, A., Levon, J., Katsikogianni, M., Myllymaa, K., Lappalainen, R., Konttinen, Y. T., Kinnari, T. J., Tiainen, V. M. and Missirlis, Y. In vitro adhesion of staphylococci to diamond-like carbon polymer hybrids under dynamic flow conditions. *J Mater Sci Mater Med* 22 (2011) 629-636
- Sotiriou, G. A. and Pratsinis, S. E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ Sci Technol* 44 (2010) 5649-5654
- Srinivasan, A., Karchmer, T., Richards, A., Song, X. and Perl, T. M. A prospective trial of a novel, silicone-based, silver-coated foley catheter for the prevention of nosocomial urinary tract infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27 (2006) 38-43
- Steckelberg, J. M. and Osmon, D. R. Prosthetic Joint Infections. In: "Infections Associated with Indwelling Medical Devices", F. A. Waldvogel and A. L. SBisno (Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, DC, 2000, 173-209
- Steininger, H., Langer, E. and Stommer, P. [Generalized argyrosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 115 (1990) 657-662
- Taeger, G., Podleska, L. E., Schmidt, B., Ziegler, M. and Nast-Kolb, D. Comparison of Diamond-Like-Carbon and Alumina-Oxide articulating with Polyethylene in Total Hip Arthroplasty. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 34 (2003) 1094-1100
- Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y. A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L. and Patrini, M. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Langmuir* 28 (2012) 8140-8148
- Thorwarth, G., Falub, C. V., Müller, U., Weisse, B., Voisard, C., Tobler, M. and Hauert, R. Tribological behavior of DLC-coated articulating joint implants. *Acta Biomater* 6 (2010) 2335-2341
- Tiainen, V.-M. Amorphous carbon as a bio-mechanical coating, its mechanical properties and biological applications. *Diamond and Related Materials* 10 (2001) 153-160
- Tilton, R. C. and Rosenberg, B. Reversal of the silver inhibition of microorganisms by agar. *Appl Environ Microbiol* 35 (1978) 1116-1120
- Trampuz, A. and Widmer, A. F. Infections associated with orthopedic implants. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19 (2006) 349-356
- Trampuz, A. and Zimmerli, W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 135 (2005) 243-251

- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W. and Goessler, W. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma* 60 (2006) 648-652
- Trujillo, N. A., Oldinski, R. A., Ma, H., Bryers, J. D., Williams, J. D. and Papat, K. C. Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium. *Materials Science and Engineering: C* 32 (2012) 2135-2144
- Uzumaki, E. T., Lambert, C. S., Belangero, W. D. and Zavaglia, C. A. C. Biocompatibility of titanium based implants with diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion ion implantation and deposition. *Key Eng. Mater.* 361-363 (2008) 677-680
- Vacheethasane, K. and Marchant, R. E. Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* 50 (2000) 302-312
- Vasilev, K., Cook, J. and Griesser, H. J. Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert review of medical devices* 6 (2009) 553-567
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. A., Fischer, E. R. and Otto, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 188 (2003) 706-718
- Walter, K. C., Nastasi, M. and Munson, C. Adherent diamond-like carbon coatings on metals via plasma source ion implantation. *Surface and Coatings Technology* 93 (1997) 287-291
- Wessinghage, D. GLUCK, THEMISTOCLES - 100 YEARS ARTIFICIAL JOINTS. *Zeitschrift Fur Orthopädie Und Ihre Grenzgebiete* 129 (1991) 383-388
- Widmer, A. F. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 2 (2001) S94-106
- Widmer, M., Von Felten-Rösler, U. and Wintermantel, E. Hüftgelenks-Endoprothesen. In: "Medizintechnik : Life science engineering", E. Wintermantel and S.-W. Ha (Hrsg.), Springer Berlin Heidelberg, 2009, 1611-1635
- Wiles, P. The surgery of the osteo-arthritic hip. *British Journal of Surgery* 45 (1958) 488-497
- Williams, D. F. Consensus and definitions in biomaterials. In: "Advances in biomaterials", C. de Putter, K. de Lange, K. de Groot and A. J. C. Lee (Hrsg.), Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1988, p. 11-16
- Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29 (2008) 2941-2953
- Willmann, G. Biokeramik für Anwendungen in der Orthopädie. In: "Medizintechnik : Life science engineering", E. Wintermantel and S.-W. Ha (Hrsg.), Springer Berlin Heidelberg, 2009, 1601-1610
- Wintermantel, E., Shah-Derler, B., Bruinink, A., Petitmermet, M., Blum, J. and Ha, S.-W. Biokompatibilität. In: "Medizintechnik : Life science engineering", E. Wintermantel and S.-W. Ha (Hrsg.), Springer Berlin Heidelberg, 2009, p. 67-104
- Wirth, C. J., Zichner, L., Tschauner, C., Aigner, R. M., Anderhuber, F. and Beck, M. "Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Becken, Hüfte" Thieme, Stuttgart, 2004,
- Wooley, P. H. and Schwarz, E. M. Aseptic loosening. *Gene Ther* 11 (2004) 402-407
- Xie, D., Liu, H., Deng, X., Leng, Y. X. and Huang, N. Deposition of a-C:H films on UHMWPE substrate and its wear-resistance. *Applied Surface Science* 256 (2009) 284-288
- Zhao, L., Chu, P. K., Zhang, Y. and Wu, Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91 (2009) 470-480
- Zimmerli, W., Trampuz, A. and Ochsner, P. E. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351 (2004) 1645-1654

- Zimmerli, W., Waldvogel, F. A., Vaudaux, P. and Nydegger, U. E. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 146 (1982) 487-497
- Zolynski, K., Witkowski, P., Kaluzny, A., Has, Z., Niedzielski, P. and Mitura, S. Implants with hard carbon layers for application in: Pseudoarthrosis femoris sin. Ostitis post fracturam apertam olim factam. *Journal of Chemical Vapor Deposition* 4 (1996) 232-239

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| °C                              | Grad Celsius   |
| a-C                             | amorpher Kohlenstoff                                       |
| a-C:H                           | amorpher Kohlenstoff, hydrogeniert                         |
| Ag                              | Silber   |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | Aluminiumoxid  |
| ATCC                            | American Type Culture Collection                           |
| bzw.                            | beziehungsweise  |
| Cl                              | Chlorid  |
| CoCrMo                          | Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung                            |
| CrN                             | Chrom(III)-nitrid  |
| Cu                              | Kupfer   |
| CVD                             | Chemische Gasphasenabscheidung (chemical vapor deposition) |
| d.h.                            | das heißt  |
| DLC                             | Diamantähnlicher Kohlenstoff (diamond-like carbon)         |
| DMEM                            | Dulbecco's Modified Eagle Medium                           |
| ESEM                            | Environmental Scanning Electron Microscope                 |
| ESB                             | Europäische Gesellschaft für Biomaterialien                |
| E. coli                         | <i>Escherichia coli</i>                                    |
| FCS                             | fetales Kälberserum  |
| KBE                             | Koloniebildende Einheiten                                  |
| KCl                             | Kaliumchlorid  |
| keV                             | Kilo-Elektronenvolt  |
| kG                              | Kilo-Gray  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumdihydrogenphosphat                                   |
| Koag. neg.                      | Koagulase negativ  |
| kV                              | Kilo-Volt  |
| lg                              | dekadischer Logarithmus                                    |
| McF                             | McFarland Standard   |
| min                             | Minuten  |
| Mio.                            | Millionen  |
| ml                              | Milliliter   |
| µl                              | Mikroliter   |
| mm                              | Millimeter   |

|   |  |
|---|--|
| MSCRAMM                                       | Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules       |
| NSAID   | Nichtsteroidales Antiphlogistikum (non-steroidal anti-inflammatory drug) |
| NaCl  | Natriumchlorid   |
| Na <sub>(2)</sub> HPO <sub>4</sub>            | (Di-) Natriumhydrogenphosphat  |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Natriumthiosulfat  |
| NaOH  | Natriumhydroxid  |
| NO  | Stickstoffmonoxid  |
| PDLLA   | poly(D,L-lactic acid)  |
| P. aerug.                                     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  |
| PE  | Polyethylen  |
| PIII  | Plasmaimmersions-Ionenimplantation                                       |
| PMMA  | Polymethylmethacrylat  |
| PVC   | Polyvinylchlorid   |
| PVD   | Physikalische Gasphasenabscheidung (physical vapor deposition)           |
| PVP   | Polyvinylpyrrolidon  |
| REM   | Rasterelektronenmikroskop  |
| RIP   | RNAIII-inhibiting peptide  |
| S.  | Staphylococcus   |
| spp.  | species pluralis   |
| SPSS  | Statistical Package for the Social Sciences                              |
| ta-C  | tetraedischer amorpher Kohlenstoff                                       |
| ta-C:H  | tetraedischer amorpher Kohlenstoff, hydrogeniert                         |
| TEM   | Transmissionselektronenmikroskop   |
| TEP   | Totalendoprothese  |
| TiAl6V4                                       | Titanlegierung   |
| THA   | Totale Hüftgelenks Arthroplastik (total hip arthroplasty)                |
| TKA   | Totale Kniegelenks Arthroplastik (total knee arthroplasty)               |
| TSB   | Tryptische Soya Bouillon (Tryptic Soy Broth)                             |
| u.a.  | unter anderem  |
| UHMWPE  | Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen (ultra-high-weight PE)         |
| v.a.  | vor allem  |
| v. Chr.                                       | vor Christus   |
| z.B.  | zum Beispiel   |
| ZrO <sub>2</sub>                              | Zirkoniumoxid  |

## 9 ABILDUNGSVERZEICHNIS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Abb. 1   | Hochrechnung Gelenkersatz in den USA [Kurtz et al. 2007] .....  | 2  |
| Abb. 2   | Wahrscheinlichkeit für den Verlust eines künstlichen Hüftgelenks nach<br>Implantation [Park & Lakes 2007] .....   | 5  |
| Abb. 3   | Molekulare Sequenz der bakteriellen Oberflächenbesiedlung<br>[Gristina 1987] .....                                | 10 |
| Abb. 4   | Schematische Abbildung eines Biofilms [Costerton et al. 1999] .....   | 13 |
| Abb. 5   | Bindungskonfiguration Kohlenstoff [aus Wikipedia] .....   | 19 |
| Abb. 6   | Ternäres Phasendiagramm zu den verschiedenen DLC-Typen .....  | 19 |
| Abb. 7   | Ablauf der Silber-DLC-Herstellung durch Ionenimplantation eines<br>Nanokomposits [Schwarz & Stritzker 2010] ..... | 27 |
| Abb. 8   | Arbeitsschema Methode .....   | 29 |
| Abb. 9   | Paraffinbeschichtung .....  | 30 |
| Abb. 10  | Versuchsansatz Sterilitäts- und Biokompatibilitätskontrolle vom Paraffin .....                                    | 32 |
| Abb. 11  | 24er Wellplatte mit Probekörpern .....  | 35 |
| Abb. 12  | Sterilisationsverfahren .....   | 38 |
| Abb. 13  | Ergebnis Sterilitäts- und Biokompatibilitätskontrolle vom Paraffin. ....  | 39 |
| Abb. 14  | Ergebnisse Vorversuche zur Einstellung der bakterieller Suspension .....  | 40 |
| Abb. 15  | Bakterienwachstum auf Titanoberflächen mit hohem Silbergehalt .....   | 43 |
| Abb. 16  | Bakterienwachstums im Kulturmedium bei Titanprobekörpern mit hohem<br>Silbergehalt .....                          | 45 |
| Abb. 17  | Bakterienwachstum auf der Titanoberfläche und im Nährmedium bei<br>niedrigem Silbergehalt .....                   | 46 |
| Abb. 18: | Biofilmbildung auf der Oberfläche der Titanprüfkörper .....   | 48 |
| Abb. 19: | Wachstum auf der PE-Oberfläche und im Kulturmedium<br>(PE-Versuchsreihe 1) .....                                  | 50 |
| Abb. 20: | Wachstum auf der PE-Oberfläche und im Kulturmedium<br>(PE-Versuchsreihe 2) .....                                  | 51 |
| Abb. 21: | Wachstum auf der PE-Oberfläche und im Kulturmedium<br>(PE-Versuchsreihe 3) .....                                  | 53 |
| Abb. 22  | Biofilmbildung auf der Oberfläche der Polyetylenprüfkörper .....  | 55 |
| Abb. 23  | Oberflächennahe Silberionenagglomeration zu Nanopartikeln .....   | 62 |
| Abb. 24  | Physikalische Eigenschaften von silberdotierten DLC-Schichten<br>[Choi et al. 2007] .....                         | 78 |

## 10 LEBENS LAUF

### Angaben zur Person:

**Name** Sebastian Jüssen  
**Geburtstag** 30.01.1987  
**Geburtsort** Bonn  
**Familienstand** ledig

### Schul- und Berufsausbildung:

**06/2006** Abitur am Aloisiuskolleg, Bonn-Bad Godesberg  
**10/2006-06/2007** Grundwehrdienst in Hamm (Westfalen) und Bonn  
**10/2007-09/2009** Studium der Humanmedizin im vorklinischen Abschnitt an der LMU München  
**09/2009** Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)  
**10/2009-07/2013** Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der TU München  
**08/2012-12/2012** PJ Abschnitt Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Klinikum rechts der Isar  
**12/2012-02/2013** PJ Abschnitt Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar  
**02/2013-04/2013** PJ Abschnitt Melanoma and surgical oncology, Royal Prince Alfred Hospital, University of Sydney  
**04/2013-06/2013** PJ Abschnitt I. Medizinische Klinik, Deutsches Herzzentrum München  
**06/2013-07/2013** PJ Abschnitt III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar  
**11/2013** Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)  
**seit 03/2014** Assistenzarzt in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz

### Famulaturen:

**04/2010** Allgemeinmedizin, Fachsanitätszentrum der Bundeswehr, Bonn  
**08/2010** Orthopädie, Klinikum rechts der Isar  
**03/2011** Chirurgie, Klinikum rechts der Isar  
**04/2011** Kardiologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm  
**03/2012** Urologie, Klinikum rechts der Isar

## 11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen herzlichen Dank aussprechen:

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Reiner Gradinger und Herrn Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe für die Möglichkeit, an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar die vorliegende Promotionsarbeit durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. med. Hans Gollwitzer für die Bereitstellung des Themas und die absolut kompetente Betreuung der Arbeit und stete Ansprechbarkeit bei Fragen oder Problemen, sowohl während des praktischen Teils als auch beim Anfertigen und der Korrektur dieser Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Belma Saldamli für die engagierte Betreuung und Organisation der Arbeit während eines Großteils der Laborversuche, die Einführung und Hilfe bei der Optimierung der Methode sowie diversen Anregungen zum Thema und Verfassen der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Miethke bedanken für die Möglichkeit der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen und Bereitstellung von Materialien am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Klinikums rechts der Isar.

Auf diesem Wege möchte ich mich auch ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bernd Stritzker für die Herstellung der Proben an der Universität Augsburg, Experimentalphysik IV bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei M.Sc. Ralf Kmeth für die Möglichkeit der Benutzung und Betreuung des Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) der Universität Augsburg bedanken sowie den zahlreichen Erläuterungen zum Herstellungsverfahren der Beschichtungen und physikalischen Grundlagen.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Michaela Rößner für die gemeinsame Auswertung der Ergebnisse und Hilfe zum Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten bedanken.

Ich danke Frau Jutta Tübel für die stetige Ansprechbarkeit bei Problemen und der Organisation von Materialien sowie vielen praktischen Ratschlägen.

Außerdem danke ich den MTAs im bakteriologischen Labor, insbesondere Frau Eschenbach für die Gastfreundschaft bei laufendem Laborbetrieb und Hilfe bei mikrobiologischen Fragen.