

**Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Die Entwicklung eines „drug delivery system“ auf Basis
einer Poly-D,L-Laktatbeschichtung für den Einsatz an
Biomaterialien in der Medizin**

Karim Ibrahim

*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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger
2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig

*Die Dissertation wurde am 26.11.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.*

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung
- 2 Material und Methoden
 - 2.1 Material
 - 2.2 Beschichtungstechnologie
 - 2.2.1 Die Beschichtung mit dem Polymer R203
 - 2.2.2 Sterile Beschichtung von Kirschnerdrähten und PGA-Filzen mit Gentamicin und PDLLA
 - 2.2.3 Beschichtung mit dem Polymer Poly-DTE
 - 2.3 Methoden: Elutionen
 - 2.3.1 Bestimmung der Masse der aufgetragenen PDLLA-Beschichtung
 - 2.3.2 Antibiotika-Elutionen
 - 2.3.2.1 Antibiotika- Elution aus PDLLA-beschichteten PGA-Filzen
 - 2.3.2.2 Antibiotika- Elution aus PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten
 - 2.3.2.3 Antibiotika- Elution aus unbeschichteten PGA-Filzen
 - 2.4 Methoden: Bakteriologische Untersuchungen
 - 2.4.1 Herstellung einer standardisierten Bakteriensuspension
 - 2.4.2 Bestimmung der bakteriellen Adhäsion mittels radioaktiver Markierung
 - 2.4.3 Bestimmung der Anzahl der anhaftenden vermehrungsfähigen Bakterien
 - 2.5 Statistische Methoden
- 3 Ergebnisse
 - 3.1 Bestimmung der aufgetragenen PDLLA- Beschichtung
 - 3.2 Antibiotika- Elutionen
 - 3.2.1 Antibiotika- Elution aus PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten
 - 3.2.2 Antibiotika- Elutionen aus unbeschichteten PGA-Filzen
 - 3.2.2.1 Gentamicin- Monobeschichtungen

- 3.2.2.2 Teicoplanin- Monobeschichtungen
- 3.2.2.3 Gentamicin/Teicoplanin- Duobeschichtung: Gentamicin- Bestimmung
- 3.2.2.4 Gentamicin/Teicoplanin- Duobeschichtung: Teicoplanin- Bestimmung
- 3.2.2.5 Teicoplanin/Gentamicin- Duobeschichtung: Gentamicin- Bestimmung
- 3.2.2.6 Teicoplanin/Gentamicin- Duobeschichtung: Teicoplanin- Bestimmung
- 3.2.2.7 Gegenüberstellung Monobeschichtung vs. Duobeschichtung-Gentamicin
- 3.2.2.8 Gegenüberstellung Monobeschichtung vs. Duobeschichtung-
Teicoplanin

3.2.3 Antibiotika- Elution aus mit PDLLA- beschichteten PGA-Filzen

- 3.2.3.1 Gentamicin- Bestimmung

3.3 Bakteriologische Untersuchungen

- 3.3.1 Bestimmung der bakteriellen Anhaftung mittels radioaktiver Markierung

- 3.3.2 Bestimmung der Anzahl der anhaftenden vermehrungsfähigen Bakterien

4 Diskussion

- 4.1 Bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung der Polymere

- 4.2 Antibiotika-Elutionen

- 4.2.1 Antibiotika- Elution aus PGA-Filzen

- 4.2.2 Antibiotika- Elution aus mit PDLLA-beschichteten PGA-Filzen

- 4.2.3 Antibiotika- Elution aus mit PDLLA- beschichteten Stahldrähten

5 Zusammenfassung

6 Literaturverzeichnis

7 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

8 Abkürzungsverzeichnis

9 Lebenslauf

10 Danksagung

11 Anhang

1 Einleitung

Geschichtliche Entwicklung der Biomaterialien

In der heutigen Zeit sind Biomaterialien ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin in der westlichen Hemisphäre. Dies betrifft Kontaktlinsen, Zahnfüllungen, chirurgisches Nahtmaterial, Knochenschrauben, Gefäßprothesen oder künstlichen Gelenke, aber auch die Möglichkeit, ein komplettes Organ zu ersetzen, wie z.B. dem Kunstherz. Biomaterialien sind keine Erfindung unserer Zeit, nein sie werden vielmehr schon seit Jahrtausenden in der Medizin eingesetzt, so z.B. im alten Ägypten, wo in Gummi getränktes Leinen als Wundverschluß diente und die erste Zehenprothese aus Holz auf etwa 1000 v. Chr. datiert wurde. Ebenso fanden Biomaterialien in der Hochkultur der Azteken Verwendung, wo Schädel mit Zahnfüllungen aus Gold gefunden wurden. Aber auch im Mittelalter wurden zahlreiche Arm- und Fußprothesen entwickelt, wie es auf folgendem Bild beispielhaft dargestellt ist.



Abbildung 1: Mittelalterliche Darstellung eines Soldaten mit Beinprothese

Heute, zu Beginn des 21. Jahrhunderts hat die Entwicklung von Biomaterialien erhebliche Fortschritte erzielt, obgleich sie immer noch mit vielen verschiedenen Problemen zu kämpfen hat. Die derzeit eingesetzten Werkstoffe werden mit dem Ziel entwickelt, die gesamte Dauer eines Menschenlebens funktionsfähig zu sein. Leider ist es immer noch nicht gelungen, die Wechselwirkungen mit dem lebenden Organismus zu beherrschen. Die Folge sind z.B.

mangelhaftes Einwachsen von Osteosynthesen mit konsekutiver Lockerung und der damit verbundenen Funktionsunfähigkeit, oder die immer noch nicht befriedigend unterdrückbaren Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen von Implantaten, die zur Einkapselung und in der Folge zum Verlust führen kann. Diese Grenzzone zwischen Implantat und Gewebe rückt also immer weiter in das Interesse der Biomaterialforschung (Gristina, 1987. S. 1589). Ein großes Problem ist die Infektion der in den Körper eingebrachten Biomaterialien, für den Patienten von schicksalhafter Bedeutung und für die Volkswirtschaft ein hoher Kostenfaktor.

Biomaterialien

In der modernen Medizin haben Biomaterialien einen festen Stellenwert, vom einfachen chirurgischen Faden bis hin zu Gefäßersatz, Gelenkprothesen oder dem Kunstherz, ein vor einigen Jahrzehnten noch illusionärer Ersatz von Körperfunktionen von Organen. Diese Entwicklungen werden heute selbstverständlich eingesetzt und man vergisst in der Regel, dass heute an alle Biomaterialien sehr hohe Anforderungen gestellt werden. Von der Idee einer neuen Gefäßprothese oder Implantates der Gelenke, über die Herstellung der optimalen Form und Oberflächenbeschaffenheit, bis hin zu den gesetzlich vorgeschriebenen in vitro und schließlich in vivo Testungen vergehen nicht selten 5 – 10 Jahre.

Biomaterialien müssen eine Vielzahl von Eigenschaften erfüllen, um ihren Anforderungen für den Einsatz am Menschen gerecht zu werden. Sie sollten gemäß den geltenden DIN bzw. ISO Normen

- eine bestimmungsgemäß hohe mechanische Stabilität aufweisen,
- nicht-toxisch wirken,
- eine gute Gewebeverträglichkeit besitzen,
- die Funktion des ersetzten Gewebes oder Gelenkes möglichst gut ersetzen.

Des Weiteren unterscheidet man zwischen biostabilen und abbaubaren Biomaterialien. Der große Vorteil der abbaubaren Biomaterialien besteht darin, dass durch den körpereigenen Abbau ein im Idealfall vollständiger Ersatz des eingebrachten Materials durch körpereigene Strukturen durch die Mechanismen der Geweberegeneration gelingt und somit ein evtl. zweiter Eingriff zur Explantation des Biomaterials überflüssig wird.

Schon im Jahre 1920 wurde von Staudinger die heute gängige Strukturvorstellung von Polymeren entwickelt, für die er im Jahre 1953 den Nobelpreis erhielt. In der Laudatio des Preisverleihungskomitees wurde er „in Anerkennung der Begründung der Makromolekularen

Chemie“ geehrt. Mit der Entwicklung der modernen Polymerchemie war die Voraussetzung für biodegradierbare und biostabile Materialien geschaffen.



Abbildung 2: Hermann Staudinger (1881-1965), Nobelpreis für Chemie 1953 (<http://histoirechimie.free.fr/Lien/STAUDINGER.htm>)

Zu den biostabilen mit sehr guter Gewebeerträglichkeit verbundenen Polymeren gehören z.B. das Polytetrafluorethylen (PTFE) zur Fertigung von Gefäßprothesen. Zu den biodegradierbaren Polymeren zählt man z.B. die Poly (α -) Hydroxycarbonsäuren, oder entsprechende Mischpolymerisate wie die Polyglykoxide und Polylaktide. Diese Polymere haben heute einen breiten Einsatz als chirurgisches Nahtmaterial, Schrauben oder Platten zum chirurgischen Wundverschluß von Weichteil und/oder Knochen. Eine weitere, neuere Gruppe abbaubarer Polymere stellen die sog. „Pseudo“-Polyaminosäuren dar, zu denen z.B. das Poly(Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester), oder Poly(DTE) gehört, auf die später noch genauer eingegangen wird.

Nach Pulapura und Kohn (1992, S. 411f.) müssen ideale degradierbare Polymere für medizinische Einsatzgebiete eine strenge Vielzahl von Voraussetzungen erfüllen. Das Polymer selbst sollte:

- eine geeignete biomechanische Stabilität aufweisen
- eine gute Gewebeerträglichkeit besitzen
- nicht toxisch sein
- innerhalb eines angemessenen Zeitraumes durch Hydrolyse und/oder Enzyme degradieren.

Da es eine Vielzahl unterschiedlicher Polymere und Polymerkombinationen mit einer noch größeren Variation an biomechanischen Eigenschaften gibt, kann die Wahl des geeigneten Polymers immer genauer an die jeweilige Indikation angepasst werden.

Polymere

Polymere sind Makromoleküle, die aus sich wiederholenden Grundmolekülen, den sog. Monomeren bestehen. Diese Stoffklassen werden nicht nur in der Medizin und Pharmazie eingesetzt, sondern auch in vielen Bereichen der Industrie, so z.B. in der Textilindustrie, der Bauindustrie etc. Unter der Vielzahl der Polymere soll ein besonderes Augenmerk auf die in der Medizin gebräuchlichen und in dieser Arbeit verwendeten Polymere gerichtet werden. Dies betrifft die Polyglykolsäure (PGA), die Polymilchsäure (PLA) und die Poly Desaminytyrosyl-Tyrosinethylester (Poly(DTE)).

Sowohl PGA als auch PLA gehören zur Gruppe der Poly α Hydroxycarbonsäuren, die in α -Position eine Hydroxylgruppe tragen. Deren Grundstruktur wird in folgender Abbildung verdeutlicht:

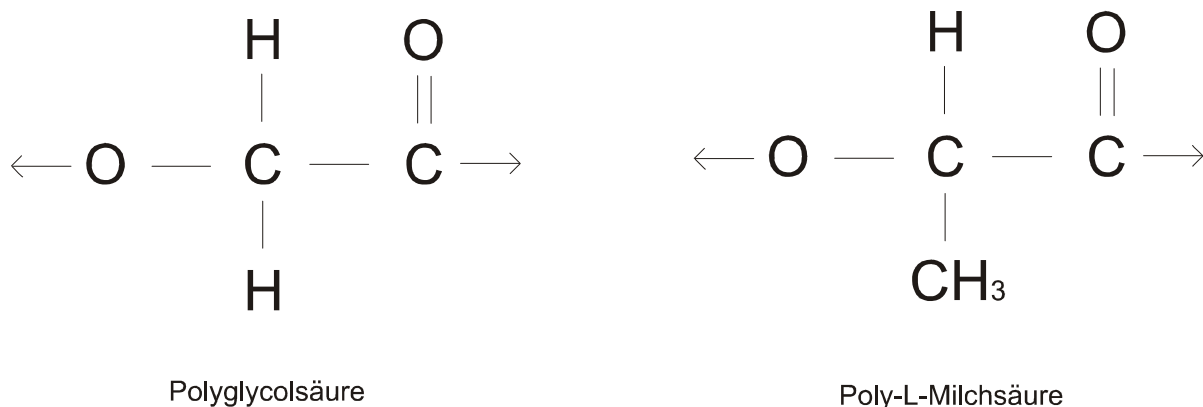


Abbildung 3: Chemische Struktur der Monomere der Polyglykolsäure und Poly-L-Milchsäure

Es ist zu beachten, dass PLA aufgrund ihres chiralen C-Atoms (in der Abbildung 3 das jeweils linke C-Atom) in zwei Enantiomeren vorliegt, der Poly-D-Milchsäure (PDLA) und der Poly-L-Milchsäure (PLLA). Ebenso existiert natürlich das Racemat Poly-D,L-Milchsäure (PDLLA).

Polymere können mit unterschiedlichem Molekulargewicht hergestellt werden und entsprechend verändern sich ihre physikalischen Eigenschaften. Weiter haben auch Mischungen aus PGA und PLA als sog. Copolymere Einfluss auf die biomechanischen und physiologischen Eigenschaften. So beschreiben Schakenraad et al. die Biokompatibilität und

die Degradation verschiedenener Copolymere aus PDLLA/PGA und konnten zeigen, dass der Abbau in vitro bei einem Copolymer mit 50% PDLLA-Anteil der Masseverlust nach 10 Tagen, bei reinem 100%igen PDLLA erst nach 120 Tagen beginnt (Schakenraad 1991, S. 260). Die in vivo Degradation ist im wesentlichen ein wenig verzögert verglichen mit in vitro Degradation, was mit der Bildung einer fibrösen Kapsel aufgrund der Abbauprodukte zu erklären ist (Schakenraad, 1991, S.261). Aus der Tatsache, dass sich die Degradation in vitro und in vivo kaum unterscheidet, kann geschlossen werden, dass das Polymer rein hydrolytisch und damit nicht enzymatisch gespalten wird.

Ein Problem, das beim Abbau der Polymere entstehen kann, ist im Körper die Bildung einer fibrösen Kapsel um hochmolekulare Degradationsprodukte des Polymers. Diese entsteht, wenn die Glasübergangstemperatur der Abbauprodukte nahe der Körpertemperatur liegt und diese in kristalliner Form vorliegen. Da die Abbauprodukte weder vollständig vom Körper hydrolysiert noch phagozytiert werden können entsteht eine fibröse Kapsel, die diese Partikel umhüllt. Dieses Phänomen versucht man zu umgehen, indem man Polymere schafft, deren Abbauprodukte eine Glasübergangstemperatur weit überhalb der Körpertemperatur von 37-40°C besitzen.

Untersuchungen zur Biokompatibilität der in der Medizin gebräuchlichen Polymere konnten gute Eigenschaften im Sinne einer geringen Fremdkörperreaktion bestätigen. Heidemann et al. konnten für PDLLA eine ebenso gute Gewebeerträglichkeit wie eine vollständige Resorption bestätigen (Heidemann et al. 2001, S. 2371). Die Abbauprodukte Milchsäure und Glycolsäure werden in die körpereigenen Stoffwechselwege eingeschleust und dort metabolisiert.

Die Idee, Aminosäuren in Biomaterialien bzw. in Polymere einzubauen, wurde bereits in den siebziger Jahren entwickelt (Anderson et al. 1974, S. 197). Da Aminosäuren als Bestandteil von Proteinen und als nicht toxische Substanzen vom Körper enzymatisch abgebaut werden können, sind diese besonders als Bestandteil für biodegradierbare Polymere geeignet. Aufgrund ihrer mannigfaltigen polaren und apolaren Seitenketten ergeben sich weitere Möglichkeiten für Ankopplung von Wirkstoffen oder Quervernetzungen mit anderen Aminosäuren. Polyaminosäuren haben auch Nachteile, so sind viele dieser Verbindungen einerseits schwer löslich, zum andern quellen sie in wässrigen Medien, was die Voraussage für Arzneimittelfreisetzungen erschwert. Ein weiteres Problem stellt die mögliche Antigenität bei der Verwendung von mehr als drei Aminosäuren dar, was den Einsatz dieser Polymere weiter limitiert (Anderson et al 1985, S.85).

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, entwickelten Kohn und Langer sog. „Pseudo“-Polyaminosäuren, deren Grundgerüst im Gegensatz zu den Polyaminosäuren modifiziert wurde. Nach einer Reihe von Untersuchungen und Testungen entstanden letztendlich vom Tyrosin- abgeleitete Polykarbonate, die sowohl die erforderlichen mechanischen Eigenschaften als auch die notwendige Biokompatibilität besitzen (Ertel et al. 1994, S. 919f.).

Seit einigen Jahren hat sich für den Einsatz im orthopädischen Bereich das Polymer Poly-Desamintyrosyl-Tyrosinethylester (DTE) bewährt. Das Polymer besitzt Eigenschaften, die von einem degradierbaren Polymer verlangt werden: es ist biokompatibel, nicht toxisch, die Abbauprodukte sind vollständig in den menschlichen Stoffwechsel integrierbar und es besitzt die erforderlichen mechanischen Eigenschaften, so dass es für einen umfassenden Einsatz in der Medizin geeignet ist. Schließlich degradiert es in einem Zeitraum (je nach Zusammensetzung) von mehreren Monaten.

Das aus Tyrosin abgeleitete Poly-DTE besteht aus einem Grundgerüst aus Derivaten des Tyrosindipeptids (Bild 1).

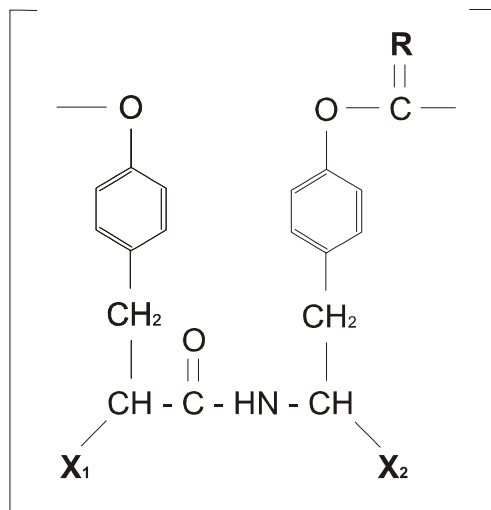


Abbildung 4: Grundgerüst der Tyrosin-abgeleiteten Polyiminocarbonate (R=NH) und Polycarbonate (R=O). Die Art der Endgruppen (X1 und X2) beeinflusst die mechanischen Eigenschaften des Polymers (nach Pulapura 1992, S.412).

Um die mechanischen Eigenschaften einiger Poly-Aminosäuren zu verbessern, wurden die Bindungen unter den Amidgrundgerüsten durch nicht-Amidbindungen ersetzt. Dieser Zustand führte zu sog. „Pseudo-Peptiden“, die eine Erweiterung der bisherigen Polypeptide darstellt.

Durch die oben gezeigte Struktur ist es nun möglich, entweder keine, eine oder alle beide Endgruppen (X₁, den N-Terminus bzw. X₂, den C-Terminus) zu verändern. Dabei fanden Pulapura und Kohn, dass eine Verbindung mit einem durch einen Hexylester geschützten C-Terminus sowohl die erforderliche Stabilität, geeignetes Lösungsverhalten in organischen Lösungsmitteln, ausreichend prolongierten hydrolytischen Abbau sowie eine gute Biokompatibilität aufwies (Pulapura 1992, S.413-417). Durch Austausch des Alkylesters am C-Terminus (Ethylester statt Hexylester) entsteht aus dem DTH das DTE (s. Abbildung 5).

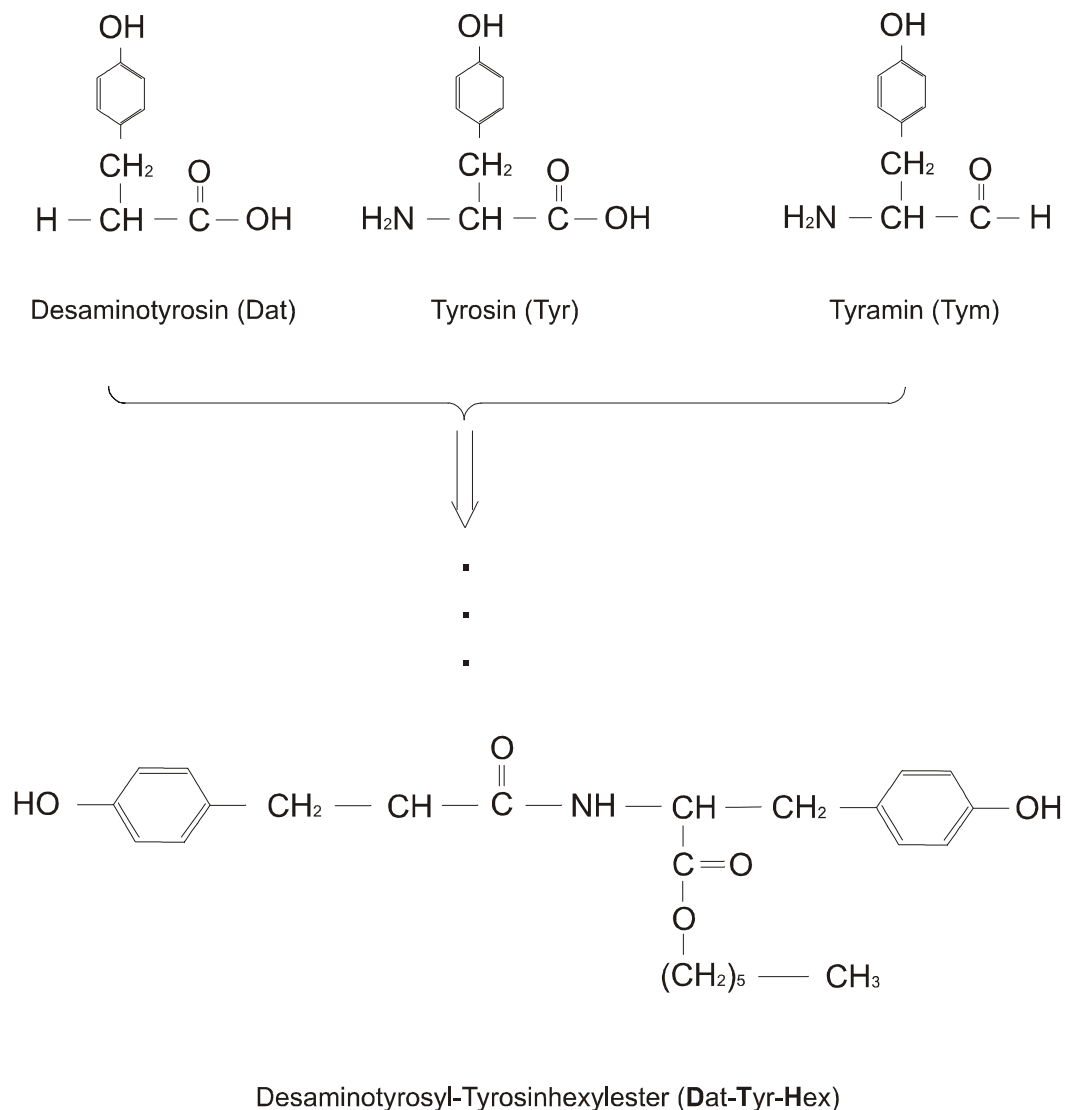


Abbildung 5: Tyrosin (Tyr) mit seinen Derivaten Desaminotyrosin (Dat) und Tyramin (Tym). Synthese von Dat, Tyr und Hexanol (Hex) zu DTH (Dat-Tyr-Hex) . Nach Pulapura 1992, S.415

Choueka et al. konnten bei in vivo Versuchen zeigen, dass die Kinetik der Degradation der Tyrosin-abgeleiteten Polykarbonate der Polylaktide gleichwertig ist, die Biokompatibilität hingegen sogar leicht vorteilhaft in Bezug auf die Wechselbeziehung zwischen Knochen und Polykarbonaten ist (Choueka et al. 1996, S. 39). Die Größe der über eine Esterbindung verbundene Seitenkette spielt ebenso für die Knochenkompatibilität als auch für die Abbaugeschwindigkeit eine Rolle. So zeigten James et al. in einem Tiermodell, dass eine Ethylester-Seitenkette im Vergleich zu Butyl-, Hexyl- oder Oktylester-Seitenketten eine bessere Knocheneinheilung gewährleistet, wohl aufgrund einer leichteren Hydrolysierbarkeit der kurzen Seitenkette, wodurch eine Chelatbildung mit Kalzium auf der Oberfläche des Polymers entsteht. Diese Chelatbildung scheint eine wichtige Voraussetzung für das Einwachsen in Knochen zu sein (James et al. 1999, S. 2203ff.).

Da die „Pseudo“-Polyamino-säuren zwei hydrolytisch spaltbare Bindungen besitzen (zum einen die Karbonat-, zum anderen die Esterbindung), bestimmt die Hydrolyserate dieser Bindungen auch die entstehenden Abbauprodukte. Je längerkettig jedoch der entsprechende Ester ist, desto langsamer wird sowohl diese als auch die Karbonatbindung gespalten, was auf einen erschwerten Einstrom von Wasser zurückzuführen ist (Tangpasuthadol et al. 2000, S. 2371).

Durch Kombination der Tyrosin-abgeleiteten Polykarbonate mit Poly-Ethylenglykol (PEG) scheint es möglich, die Anhaftung verschiedener Proteine an das Polymer in Abhängigkeit der PEG-Konzentration zu regulieren (Tziampazis et al. 2000, S. 517). Somit kann durch die sog. Pegylierung eine gewisse Kontrolle über die biomechanischen und biodegradierbaren Eigenschaften erlangt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten „Pseudo“-Polyamino-säuren besitzen ein Molekulargewicht zwischen 89.000 und 120.000 Dalton mit einem PEG-Anteil von 0,26% bzw. 5%.

Biodegradation von Polymeren

Polymere können sowohl enzymatisch, als auch hydrolytisch gespalten werden. Während Wasser ubiquitär im Körper vorhanden und damit die hydrolytisch spaltbaren Polymere fast überall einsetzbar sind, findet der Abbau der enzymatisch spaltbaren Polymere nur am Wirkort der Enzyme statt. Durch Kombination der Polymere mit einem Arzneimittel entsteht ein sog. „drug delivery system“. Die Freisetzung dieses Arzneimittel entspricht im Wesentlichen der des Polymers, so dass durch geeignete Wahl des Polymers sowie der eingearbeiteten Konzentration des Wirkstoffes eine kontinuierliche Freisetzung desselben im

Gewebe möglich ist. Bei den enzymatisch spaltbaren Polymeren besteht darüber hinaus noch die Möglichkeit, ein Arzneimittel gezielt an einem bestimmten Ort im Körper freizusetzen. Diese Art der Anwendung wird im Allgemeinen als „drug targeting“ bezeichnet. Hierbei besteht die Möglichkeit, Wirkstoffe genau dort freizusetzen, wo sie benötigt werden. Die Notwendigkeit einer hohen Dosierung bei systemischer Anwendung fällt weg, Nebenwirkungen können hierdurch minimiert werden.

Nach Lendlein erfolgt der biologische Abbau des Polymers durch zwei verschiedene Mechanismen: zum einem den Abbau in der Masse („bulk degradation“), zum andern durch Oberflächenabbau („surface erosion“) (Lendlein 1999, S.285).

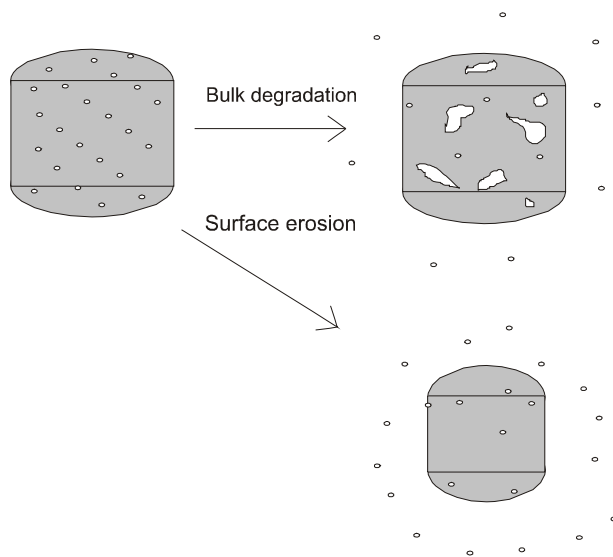


Abbildung 6: Vereinfachtes eigenes Schema der sog. Surface erosion and Bulk degradation

Bei der „bulk degradation“ diffundiert Wasser schneller in die gesamte Polymermatrix, als das Polymer hydrolytisch gespalten wird, was eine gleichmäßige Spaltung der Polymermatrix zur Folge hat. Die mittlere Molmasse des Polymers nimmt damit homogen ab. Bei der „surface erosion“ diffundiert das Wasser langsamer in die Matrix als das Polymer abgebaut wird, wodurch der Abbau nur an der Oberfläche des Polymers stattfindet. Die mittlere Molmasse bleibt dabei nahezu unverändert.

Einsatzgebiete der resorbierbaren Polymere

Resorbierbare Polymere werden schon seit langer Zeit im Bereich des chirurgischen Wundverschlusses eingesetzt. Durch abbaubare Materialien gelingt eine bessere Bioverträglichkeit, da durch den Abbau Fremdkörperreaktionen reduziert werden können. Bei synthetisch hergestellten Materialien besteht der Vorteil gegenüber Materialien natürlichen

Ursprungs wie z.B. Catgut (Darmsaiten), dass diese mit konstanter Qualität und frei von allergisierenden Begleitproteinen produziert werden können. Der erste resorbierbare Faden aus Polyglycolid kam 1970 unter dem Namen Dexon® auf den Markt. Dieser Faden soll für 7-10 Tage seine Reißfestigkeit behalten und wird anschließend hydrolytisch gespalten und vom Körper verstoffwechselt. Seitdem wurde eine Vielzahl von weiteren Polymeren als resorbierbares Nahtmaterial auf den Markt gebracht. Insbesondere die Kombinationen aus verschiedenen Polymeren, so wie z.B. mit Polylaktid brachten die erwünschten Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften.

Seit der Einführung der minimalinvasiven Chirurgie werden auch dort immer häufiger resorbierbare Materialien eingesetzt, und zwar in Form von Clips oder Klammern.

Ein weiteres, verhältnismäßig neues Einsatzgebiet der Polymere ist der Organersatz, für das sog. „tissue engineering“. Durch in vitro Gewebezüchtung kann ein physiologischer Ersatz für traumatisch oder chronisch geschädigtes Gewebe entwickelt werden. Einsatzgebiete für klinische Anwendungen sind Gewebe wie Knochen, Knorpel oder Haut (Parenteau 1999, S. 60).

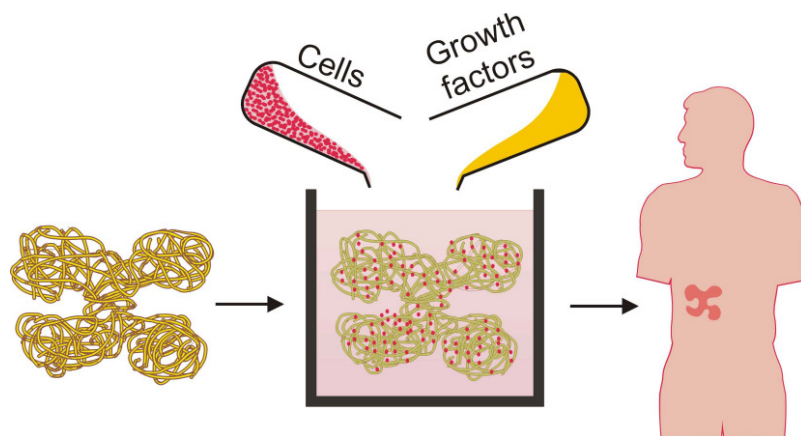


Abbildung 7: Prinzipien des Tissue engineering, links: Polymer/Scaffhold (Gerüst)

Da kaum ein Organ vollständig und auf Dauer künstlich ersetzt werden kann und somit die oftmals einzige Möglichkeit in einer Transplantation eines Fremdorgans besteht, werden sich in der Zukunft durch das „tissue engineering“ vielversprechende Alternativen ergeben. Da bei Transplantationen nicht nur Krankheitserreger wie Hepatitis-Viren oder HIV übertragen werden können, sondern der Empfängerorganismus lebenslang eine teure und mit vielen Nebenwirkungen behaftete Therapie mit Immunsuppressiva in Kauf nehmen muss, stellt das „tissue engineering“ mit der Verpflanzung autologer Zellen für die Zukunft eine theoretisch sichere, wenn auch noch nicht im Detail ausgereifte Lösung dar. Hierbei dienen die Polymere

lediglich als Trägermatrix, sozusagen als Gerüst für die Spenderzellen, wobei das neu zu bildende Organ zuerst in vitro angezchtet werden muss. Sobald ausreichend Zellen vorhanden sind, werden diese auf eine Fremdmatrix, einem dreidimensionalen Polymergerüst aufgebracht und beginnen dort mit der Produktion der organspezifischen Matrix. Da es durch die Polymermatrix möglich ist, die später erwünschte Form im Voraus zu modellieren, kann auch eine kosmetische Korrektur von Körperstrukturen erfolgen. Über den Sinn derartiger kosmetischer Korrekturen im Bereich „lifestyle“ gehen die Meinungen immer noch weit auseinander, jedoch sind die Möglichkeiten, die sich daraus ergeben könnten sehr vielfältig, so wie folgendes Bild verdeutlichen soll:



Abbildung 8: Tissue engineering: Knorpelgewebe in Form eines menschlichen Ohres auf dem Rücken einer Maus

Die Fremdmatrix soll im Laufe der Zeit abgebaut und idealerweise vollständig von eigenem Gewebe ersetzt werden. Die ersten Polymere, die hierfür verwandt wurden, waren die α -Polyhydroxysäuren, Polyglycolsäure (PGA) und Polymilchsäure (PLA). Diese Verbindungen sind schon seit längerem als Nahtmaterial in der Chirurgie im Einsatz, weisen eine gute Gewebeverträglichkeit auf und sind hydrolytisch spaltbar. Neuere Polymere sind z.B. das Polypropylenfumarat, das injizierbar ist und erst im Körper sein Gerüst bildet (Crane 1995, S. 1322f.). Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass nicht alle Gewebe gleichermaßen auf den Polymeren wachsen. So konnten Garric et al. zeigen, dass humane Keratinozyten in Anwesenheit von Glykolsäure-sezernierenden Matrixstrukturen aufgrund der pH-Absenkung stark in ihrem Wachstum gehemmt wurden (Garric et al.2002, S. 1196f.).

Die Kombination der Polymere mit Arzneimitteln für gezielte Wirkstoffspiegel, dem sog. „drug delivery system“ ist ein weiteres Einsatzgebiet. Hierbei werden die Polymere mit Arzneimitteln kombiniert, die entsprechend dem Abbau des Polymers freigesetzt werden. Die Liste der eingesetzten Wirkstoffe ist nahezu unbegrenzt. Je nach Indikation können sie mit Antibiotika, antithrombogenen Substanzen, Kortison, Wachstumsfaktoren, oder aber auch

zum nicht- viralen Gentransfer eingesetzt werden. Da diese Substanzen lokal freigesetzt werden, können nur am Zielort hohe Arzneimittelspiegel erreicht werden, wohingegen eine systemische Belastung ausbleibt oder vernachlässigbar gering wird. In diesem Zusammenhang wurde von Schmidmaier et al. gezeigt, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren mit Hilfe einer PLA-Beschichtung von Osteosynthesen die Frakturheilung verbesserte, und systemische Nebenwirkungen ausbleiben (Schmidmaier 2001, S. 344f.). Im Bereich der Prävention der Restenosierung von Koronararterien konnten Herrmann et al. durch die Beschichtung von Koronarstents mit PDLA und dem eingearbeitetem Arzneimittel (PEG)- Hirudin und Iloprost eine signifikante Reduzierung der Auflagerung von Blutbestandteilen und der Restenose (Herrmann 1999, S. 54). Durch die Kombination von Arzneimitteln mit enzymatisch spaltbaren Polymeren kann erreicht werden, dass bei systemischer Verabreichung der Wirkstoff nur am Ort in Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität freigesetzt wird. Dieser Vorgang wird als „drug targeting“ bezeichnet, eine gezieltere und mit weniger systemischen Nebenwirkungen behaftete Verabreichung wird dadurch möglich.

Ein großes Problem bei der Verwendung von Implantaten wie künstlichen Blutgefäßen oder Endoprothesen sind Infektionen. Da durch die Implantation nicht nur die körpereigene Immunabwehr geschwächt und anhaftende Bakterien sich durch die Bildung eines Biofilms der körpereigenen Abwehr entziehen, sollte der Prävention der bakteriellen Besiedlung besondere Beachtung geschenkt werden. Die am häufigsten nachweisbaren Keime auf Biomaterialien sind Staph. epidermidis und Staph. aureus (Christensen et al. 1989, S.34). Da bei der Implantation immer auch eine Verletzung des umliegenden Gewebes stattfindet, die Durchblutung in diesem Bereich gestört und aufgrund des Gewebsunterganges immer auch eine Entzündungsreaktion als Voraussetzung für die Wundheilung nachweisbar ist, so haben Bakterien hier eher die Möglichkeit, sich bei geschwächter körpereigener Abwehr auf der Implantatoberfläche anzusiedeln. Bei manifester Infektion erreichen systemisch verabreichte Antibiotika leider in direkter Umgebung des Implantats keine ausreichend hohen lokalen Wirkspiegel. In der Regel ist eine lang anhaltende und hohe Antibiotikagabe erfolglos, die manifesten Nebenwirkungen limitieren weiter die langdauernde Anwendung der Antibiotika. Durch die lokale Verabreichung von Antibiotika mit einem „drug delivery system“ können hiermit am gewünschten Wirkort der Implantatoberfläche hohe lokale Wirkspiegel ohne systemische Belastung erzielt werden (Cowsar 1974, S.12f.). Durch die Kombination aus lokaler und systemischer Verabreichung von Antibiotika lässt sich die Effektivität noch steigern, was folgende Abbildung verdeutlichen soll.

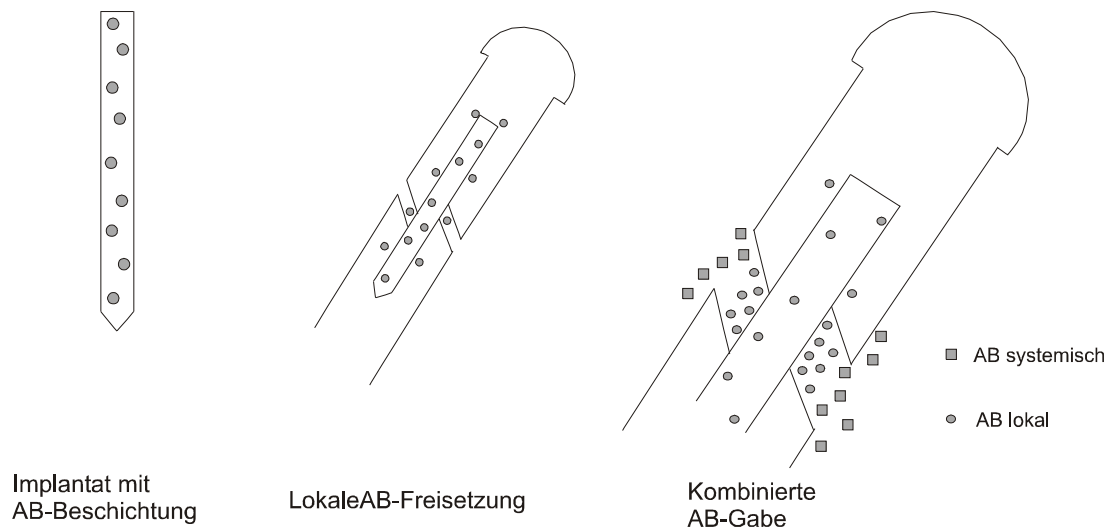


Abbildung 9: "drug delivery system", lokale Freisetzung eines Antibiotikum (AB) wird kombiniert mit systemischer Gabe (s. Legende)

Wie bereits oben beschrieben sind Staph. epidermidis und Staph. aureus die häufigsten Implantat- assoziierten Keime. Insbesondere bei Knochen- und Weichteilinfektionen wird daher bevorzugt Gentamicin eingesetzt. Gentamicin gehört zur Wirkstoffgruppe der Aminoglykoside. Diese binden an die 30S- Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und führen zu einer vielfältigen Störung der bakteriellen Proteinsynthese.

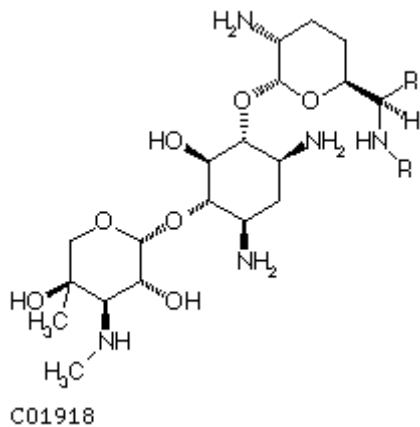


Abbildung 10: Struktur des Aminoglykosids Gentamicin (www.medicine-worldwide.com)

Gentamicin besitzt gute Wirksamkeit im Bereich der grampositiven Kokken, insbesondere gegen Staphylokokken. Da die Aminoglykoside schwerwiegende Nebenwirkungen besonders im Bereich der Nieren und des Innenohres bis hin zum Funktionsausfall derselben zur Folge haben können, ist hier eine systemische Langzeitgabe nur unter Kontrolle der Serumspiegel vorzunehmen. Hier zeigt sich, dass durch die lokale Verabreichung eben diese

Nebenwirkungen vermieden und dadurch die Effektivität des Antibiotikums gesteigert werden kann.

Ein kurzer Ausblick sollte noch auf die entstehende Problematik der Resistenzentwicklung bei Bakterien gegeben werden. So tauchten vor einigen Jahren Vancomycin- resistente Enterokokken (VRE) in Japan und der USA auf. Da Enterokokken in häufigen Fällen ihre Resistenz- Plasmide auf andere Keime übertragen, können bei Mischinfektionen mit Staphylokokken sog. Vancomycin- resistente Staphylokokken entstehen, die die Medizin wieder vor neue Probleme stellt. Somit sollten alle Antibiotika nur mit Bedacht und nach sorgfältiger Prüfung der Indikation eingesetzt werden (Hori 2002, S.2144; Barie 1998, S. 118; Berger-Bachi 2002, S. 27).

In den letzten Jahren kam es aufgrund des immer breiteren Einsatzes von Antibiotika in der Medizin zu einem vermehrten Auftreten sog. Methicillin-resistenter Staph aureus und Staph. epidermidis Stämme (MRSA und MRSE), so dass damit Problemkeime entstanden sind, die nur durch den Einsatz hochpotenter moderner Antibiotika wie Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid zu beherrschen sind. Diese Stoffe gehören zur Gruppe der Glycopeptid-Antibiotika. Teicoplanin wurde 1989 in die Therapie eingeführt und stellt ein Gemisch aus bis zu 6 komplexen Glycopeptiden dar. Teicoplanin besitzt im Vergleich zu Vancomycin eine höhere Halbwertszeit. Teicoplanin wird bei schweren Infektionen der Knochen, der Gelenke und der Weichteile gegeben, jedoch nicht als erstes Mittel der Wahl gegeben, sondern erst, nachdem andere Antibiotika versagt haben.

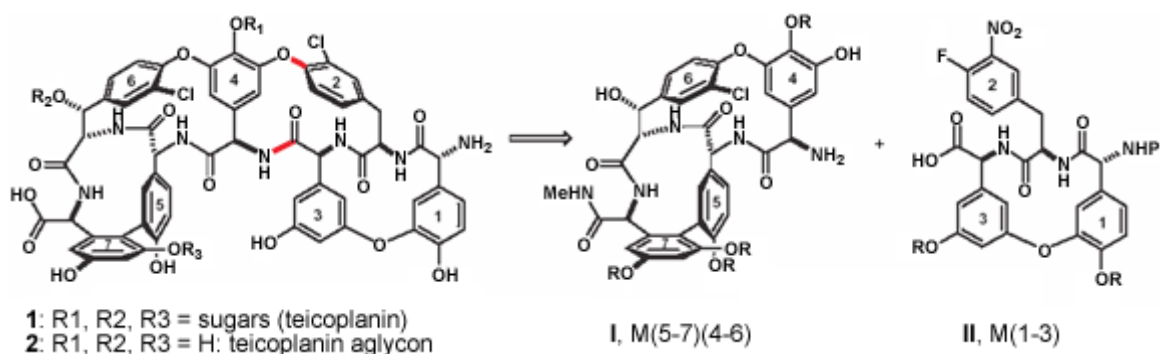


Abbildung 11: Struktur des Teicoplanin (www.medicine-worldwide.com)

Die Nebenwirkungen sind im Allgemeinen geringer ausgeprägt als bei Gentamicin, jedoch sind auch bei Teicoplanin Funktionsprüfungen des Gehörs und der Nieren empfohlen. Bei der systemischen Gabe von Teicoplanin ist die gleichzeitige systemische Gabe von Gentamicin nicht angezeigt.

Da oftmals die Implantate gerade von MRSA oder MRSE besiedelt werden, stellt die lokale Verabreichung der beiden Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin in Kombination als „drug delivery system“ eine wirkungsvolle Behandlungsstrategie für Implantat- assoziierte Infektionen dar.

Implantat- assoziierte Infektionen

Im Jahre 1928 macht ein bis dahin unbekannter Arzt eine Entdeckung, die weitreichende Konsequenzen haben sollte. Der in Schottland geborene Alexander Fleming stellte fest, dass sich auf einer seiner Zuchtschalen mit Staphylokokken ein Schimmelpilz, „Penicillium notatum“ angesiedelt hatte, durch den Bakterien abgetötet wurden. Als er im darauf folgenden Jahr seine Entdeckung veröffentlichte, blieb diese weitgehend unbeachtet. Erst durch die Grauen des Zweiten Weltkriegs erlangte seine Entdeckung neue Bedeutung. Für seine Errungenschaften wurde er im Jahre 1944 geadelt und im Folgejahr gemeinsam mit Chain und Florey mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt, für „die Entdeckung des Penicillins und seiner heilenden Wirkung bei verschiedenen Infektionskrankheiten“.

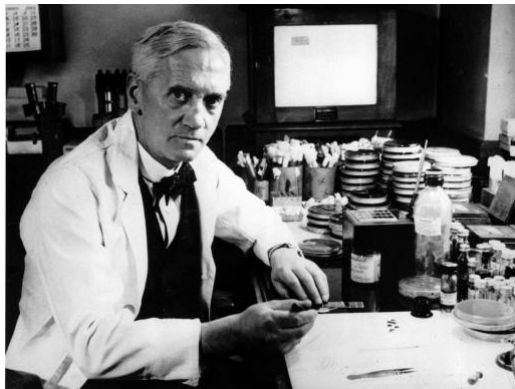


Abbildung 12: Sir Alexander Fleming (1881-1955), Nobelpreis für Physiologie und Medizin 1945

<http://www.herb.lsa.umich.edu/XML/Fleming.jpg>

Mit der Einführung des Penicillins konnten erstmals die bis dahin kaum beherrschbaren Infektionen behandelt und die Sterblichkeit unter der Bevölkerung drastisch gesenkt werden. Im Laufe der Jahre wurde die Entwicklung der Antibiotika in großem Maße vorangetrieben, so dass neben Penicillin und seinen Derivaten auch zahlreiche neue Verbindungen von Stoffklassen entdeckt wurden. Durch den verbreiteten Einsatz von Antibiotika entstanden in der Folge eine immer größer werdende Zahl an resistenten Keimen, so wie z.B. die sog. Methicillin- resistenten Staph. aureus und Staph. epidermidis Stämme (MRSA und MRSE).

Diese Keime sind heute nur mit hochpotenten Antibiotika wie Vancomycin, Teicoplanin oder dem Reserveantibiotikum Linezolid beherrschbar.

Doch leider stellen Infektionen auch im Zeitalter moderner Antibiotika ein nicht zu unterschätzendes Problem dar. Ein besonderes Augenmerk soll auf die Infektionen nach chirurgischen Eingriffen, insbesondere bei Verwendung von Biomaterialien gelegt werden.

Sowohl in der Orthopädie, als auch in der Gefäßchirurgie und Intensivmedizin sind bakterielle Infektionen immer noch gefürchtet und führen nicht selten zu lebensbedrohlichen Zuständen und zur Sepsis (Benger et al. 1998, S. 43). Insbesondere durch das Einbringen von Biomaterialien aller Art im Körper vergrößert sich die Gefahr einer Infektion (Gristina et al. 1987, S. 1588). Eine der ersten Arbeiten die sich mit diesem Thema beschäftigte, war die von Elek und Conen, die bereits 1957 beschrieben, dass die „minimal pustule forming dosis“, d.h. die mindestens benötigte Keimzahl für die Auslösung einer Infektion, bei Implantation von Nahtmaterial um den Faktor 10^5 vermindert ist (Elek et Conen 1957, S. 582). Karchmer et al. geben die Häufigkeit einer Endokarditis bei künstlichen Herzklappen mit 9% an (Karchmer et al., S. 129). Bei der Behandlung von offenen Frakturen durch externe Fixation werden in der Literatur Infektionsraten (durch sog. „pin tract infection“) von bis zu 100% angegeben (Green 1983, S. 113, Botte et al. 1992, S. 194, Ahlborg et al. 1999, S. 116, Garberina et al. 2001, S. 174).



Abbildung 13: Infizierte Pins bei externer Fixation

www.gentamed.com

Bei der Implantation von Totalendoprothesen (TEP) werden trotz chirurgischer Intervention und intensiver Antibiotikatherapie bei über 1% aller Eingriffe Infekte registriert, bei Knie- und Ellbogenprothesen zeigen sich sogar höhere Infektionsraten mit 5 -7% respektiv (Gristina et al. 1991, S. 363, Bengston et al. 1991, S. 302, Nasser 1994, S. 153). Für eine Vielzahl der Patienten ist der Austausch bzw. Entnahme des Implantats oder die Amputation der einzige Weg, eine chronische Infektion zu verhindern (Kramthoft et al. 1994, S. 618).

Ebenso können Infektionen von Gefäßprothesen zur Sepsis führen mit einer Mortalität zwischen 10 und 25% (Bunt 2001, S. 225, O'Brien et al. 1992, S. 1263). Insgesamt sind

Implantat-assoziierte Infektionen für nahezu 50% der geschätzten 2 Millionen nosokomialen Infektionen pro Jahr in den USA verantwortlich (Schierholz 2001, S. 87). Verlängerte und mehrfache Krankenhausaufenthalte, erhöhte Morbidität- und Mortalitätsraten und der daraus entstehende volkswirtschaftliche Schaden sind die Konsequenz (Herbert et al. 1996, S. 140). Häufige Keime, die bei der mikrobiologischen Untersuchung infizierter Prothesen und Implantate nachgewiesen werden, sind *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*, neben anderen Bakterien. Pilze führen besonders bei immunsuprimierten Patienten zu Infektionen (Inman et al. 1984, S. 49; v. Eiff 1998, S. 2; Peters et al. 1982, S. 480; Holtom et al. 2000, S. 225; Mahan et al. 1991, S. 305).

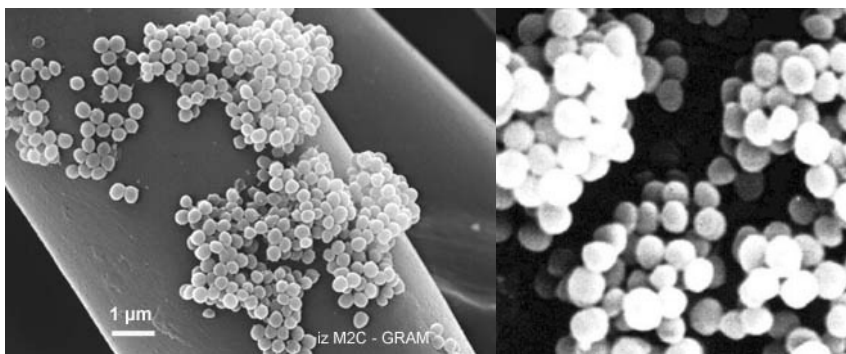


Abbildung 14: Staph. aureus und Staph. epidermidis, die häufigsten Implantat- assoziierten Keime (<http://www.uihealthcare.com> und Wilma Ziebuhr)

Weshalb jedoch sind die Infektionsraten bei Implantationen von Prothesen derartig hoch? Nach Christensen et al. kann jedes fremd in den Körper eingebrachte Material eine besondere Art der Infektion, die sog. „foreign body infection“ schaffen. Ursache ist, dass bei dem Einbringen des Implantats eine Gewebeschädigung stattfindet, und es in der Umgebung des Implantats zu einer starken Entzündung kommt, wodurch die Fähigkeit des Organismus, fremde Keime zu opsonieren und phagozytieren eingeschränkt wird (Christensen et al 1989, S. 29). Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass durch die Implantation von Fremdmaterial eine dritte Komponente im „Kampf“ zwischen eindringendem Keim und abwehrendem Wirt auftaucht, die mit beiden in enger Wechselwirkung steht.

Betrachtet man die Interaktion zwischen Implantat und Organismus, so zieht das fremde Material wie oben beschrieben eine Entzündungsreaktion nach sich. Diese ist abhängig von der Art des Implantats (Material, Form, Zustand etc.) aber auch von der Immunlage des Wirts. So konnten ein Zusammenhang gefunden werden zwischen dem Alter von Schweinen und der Fähigkeit, durch von außen zusammen mit einem Implantat eingebrachten Bakterien eine Infektion auszulösen (Riegels-Nielsen et al. 1995, S. 71). Weiterhin wurde für einige Materialien wie z.B. rostfreier Stahl eine Verminderung der freien Radikalbildung im Rahmen

der Infektionsabwehr innerhalb Segmentkerniger Leukozyten beschrieben, die daher zu einer erschwerten Ausschaltung von (Stahl-)Implantat- assoziierten Infektionen führt (Pascual et al. 1992, S. 287). Da nach Gristina die Fähigkeit der Neutrophilen und Makrophagen, hochreaktive Sauerstoffradikale zu bilden eine wesentliche Voraussetzung für die Bekämpfung von Bakterien darstellt, sind diese bei einer vorzeitigen Entleerung derer Speicher nicht mehr in der Lage, bakterizid zu wirken (Gristina 1994, S. 112). Diese Degranulierung der Speicher konnte ebenso bei Kontakt der Neutrophilen mit Schleim von *Staph. epidermidis* beobachtet werden (Johnson et al. 1986, S.13).

Betrachtet man nun weiter die Wechselbeziehung zwischen Implantat und Bakterien, so ist die initiale Anhaftung abhängig von der Motilität der Bakterien und deren Oberflächenproteine, aber auch von der Beschaffenheit der Oberfläche und der Art des Materials des Implantats. So stellen kleinste Unebenheiten an der Oberfläche des Implantats geeignete Nischen für die Adhäsion der Bakterien dar, in die Abwehrzellen nicht vordringen können, wodurch es den Keimen gelingt, sich der körpereigenen Abwehr zu entziehen (Gristina 1987, S. 1592).

Wenn nun zuletzt die Beziehung zwischen Wirt und Bakterium betrachtet wird, so wetteifern beide um die Besiedelung der abiotischen Oberfläche. Wird diese zuerst von körpereigenen Zellen besiedelt, so bilden diese eine Glykokalix, die es den Bakterien erschwert, ebenso auf der Oberfläche anzuhafte. Tritt dieser Fall ein, so ist das Implantat weitgehend vor Infektionen geschützt. Gewinnen die Bakterien jedoch den Wettlauf um die Besiedelung der Oberfläche, so können diese analog zu den körpereigenen Zellen einen Biofilm bzw. Schleim ausbilden, der sie ihrerseits vor dem Abbau durch Körperzellen schützt. Dieser Wettlauf wurde von Gristina als „race for the surface“ bezeichnet (Gristina et al. 1994, S. 107)

Darüberhinaus weisen bestimmte humanpathogene Bakterien die Eigenschaft auf, sich auf abiotischen Oberflächen anzuhafte und sich dort durch Bildung eines sog. Biofilms in dessen Schutze zu vermehren. Besonders anfällig dafür sind nicht nur Endoprothesen, sondern auch Katheter, Herzklappen, Herzschrittmacher, Shunts etc. Dieser Biofilm schützt die Bakterien nicht nur vor der körpereigenen Immunabwehr, sondern verleiht ihnen aufgrund der Ionenaustauscherwirkung auch eine höhere Resistenz gegen Antibiotika (Costerton et al. 1995, S.711, Donlan 2001, S.99, Olson et al. 2002, S. 90, Mah et al., 2001, S.204, Schembri et al. 2002, S. 132, Peters et al.1989, S. 64). Da diese mit Biofilm überzogenen Implantate abgesehen von der unzureichenden Biokompatibilität in großer Zahl auch als rezidivierende Infektionsherde dienen können, bleibt oftmals als einzige Möglichkeit der Eliminierung der

Bakterien nur der komplette Austausch des Implantats. Auf den dadurch entstehenden volkswirtschaftlichen Schaden wird erneut hingewiesen.

Da die Behandlung der Infektionen und anderen Komplikationen nicht nur für den Patienten eine enorme Belastung darstellt, sollte sich das Augenmerk auf die Prävention der bakteriellen Besiedelung richten. Eine neue Möglichkeit der Reduzierung der Infektionsraten medizinischer Implantate und Prothesen besteht in einer antiseptischen Oberflächenbeschichtung, dem Thema dieser Arbeit.

Mechanismen der Biofilmbildung

Genetische Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Biofilmbildung bei Bakterien haben gezeigt, dass die Bildung eines reifen Biofilms auf abiotischen Oberflächen in mehreren Stufen abläuft (Pratt et al. 1999, S. 599f., Watnick et al. 2000, S. 2675). In diesem Modell werden drei Entwicklungsstufen unterschieden: die primäre Anhaftung einzelner Zellen an der Oberfläche, Aggregation dieser Zellen zu Mikrokolonien und Differenzierung dieser Mikrokolonien in einen reifen Biofilm.

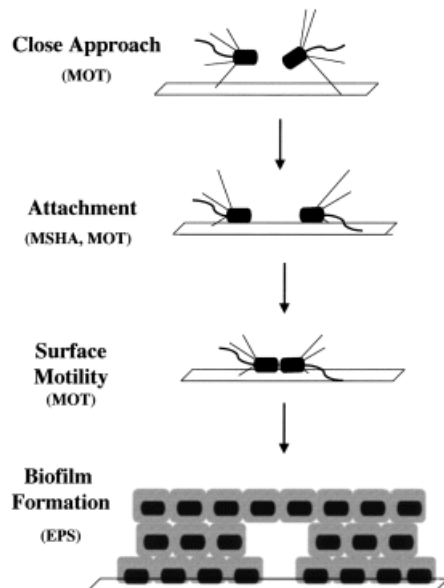


Abbildung 15: Biofilmbildung am Beispiel von *V. cholerae*, in Klammern die Mutanten, die entsprechenden Schritt nicht vollziehen können; MOT= Flagellar-Mutanten, MSHA= Mutanten Typ IV MSHA-Pili, EPS= Mutanten in der Synthese von Exopolysaccharide (nach Watnick et Kolter, 1999, S. 2677)

Zwei Faktoren beeinflussen die primäre Anhaftung: die Motilität der Bakterien und deren Bindungsfähigkeit, die durch verschiedene Oberflächen-Faktoren wie Pili, Lipopolysaccharide, Oberflächenproteine u.a. vermittelt wird. Während die Motilität als

Voraussetzung dafür angesehen wird, Scherkräfte an der Oberfläche der Implantate zu überwinden, beeinflussen die physikalischen Eigenschaften der Zelloberfläche die Wahrscheinlichkeit, ob eine Zelle nach dem Kontakt auch an dem Implantat gebunden bleibt. Neben den Eigenschaften der Zelloberfläche beeinflussen auch Faktoren wie die Art des Nährmediums und das Substratangebot die Anhaftung (Donlan 2002, S. 881). Da die abiotischen Oberflächen nach der Implantation durch Matrixproteine des Organismus wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin oder Laminin überzogen werden können Bakterien, die über entsprechende Oberflächenfaktoren verfügen, spezifisch an die abiotischen Oberflächen binden. Beispielsweise besitzen Staphylokokken auf ihrer Oberfläche Proteine wie den „clumping factor“, der an Fibrinogen bindet (McDevitt et al. 1997, S. 416), oder das Fibronectin-Bindeprotein, das eine spezifische Bindung zu Fibronectin eingeht. So konnte für *Staphylokokkus epidermidis* gezeigt werden, dass das Fibrinogen-Bindeprotein im Wesentlichen verantwortlich für dessen Adhäsion ist und Antikörper gegen das Bindeprotein sowie analoge Proteine eine Adhäsion an Fibrinogen effizient verhindern können (Pei et al. 1999, S. 4525). Derartige Proteine können auch die Virulenz einiger Bakterien bestimmen. So wurde für „clumping factor“ defiziente *Staph.aureus*-Stämme in einem Modell an Ratten zur Endokarditis die verminderte Virulenz in Gegensatz zu ihren Elternstämmen aufgezeigt (Moreillon et al. 1995, S. 4738). Sobald der erste Kontakt hergestellt ist, bewegen sich die Zellen entlang der Oberfläche und bilden sog. Mikrokolonien aus. Letztendlich unterziehen sich die Mikrokolonien einem Differenzierungsprozess, der zur Bildung eines typischen dreidimensionalen Biofilms führt. Diese Differenzierung erfordert Veränderungen in der Genexpression, wobei für *E.coli* gezeigt werden konnte, dass Regulatorproteine (hier: carbon storage regulator CsrA) sowohl als Repressoren, als auch als Aktivatoren der Biofilmbildung, abhängig von Kulturbedingungen, agieren können (Kuchma et al. 2000, S. 429, Jackson et al. 2002, S. 290). Ebenso muss eine Unterscheidung zwischen frei schwimmenden und adhärennten Bakterien getroffen werden, da sich auch hier ein Unterschied in der Genexpression zeigt (Costerton et al. 1995, S. 711). Welche Faktoren genau zu dieser Triggerung der Expression bestimmter Gene führt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Reife Biofilme bestehen aus komplexen Ansammlungen von adhärennten Zellen (sog. Mikrokolonien), die in eine Polymermatrix (sog. extracellular polymeric substances, EPS) eingebettet und mit offenen Wasserkanälen durchzogen sind, so dass ein primitives Kanalsystem zum Transport von Nähr- und Abfallstoffen entsteht (Donlan et al. 2002, S. 167). Dadurch schaffen sich Bakterien an der Oberfläche von Biomaterialien eingebettet in einen Biofilm das für sie optimale Mikroklima. Weiterhin besitzen sie die Eigenschaft, an

ihrer Zelloberfläche Metall-Ionen zu konzentrieren und sogar durch die Exozytose von periplasmatischen Vesikeln (z.B. Peptidoglycan- Hydrolasen) umgebende Zellen zu lysieren. Die dabei frei werdenden Substanzen können als Nährstoffe verwendet werden (Beveridge et al. 1997, S. 291). Jedoch dient der Biofilm nicht nur dazu, Substrate leichter zu Verfügung zu stellen, sondern er stellt auch einen wirksamen Schutz gegen die körpereigene Abwehr dar und erschwert aufgrund der Ionenaustauscherfunktion die Penetration der geladenen Antibiotika. Ebenso wird für adhärierte Bakterien ein verlangsamtes Wachstum beschrieben, was zu einer weiteren Resistenzhöhung führt (Costerton et al. 1995, S. 711; Donlan 2001, S. 99; Olson et al. 2002, S. 86; Mah 2001, S. 204). Darüber hinaus ist die Übertragung konjugativer Plasmide innerhalb des Biofilms erleichtert, wodurch nicht nur die Verbreitung von Virulenzfaktoren, sondern auch die Fähigkeit zur Biofilmbildung selbst begünstigt werden kann (Ghigo 2001, S.772; Donlan 2002, S. 881).

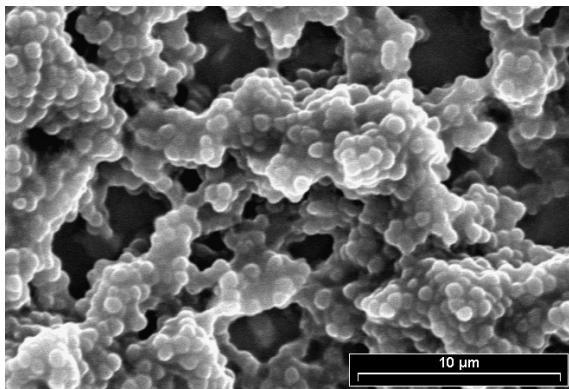


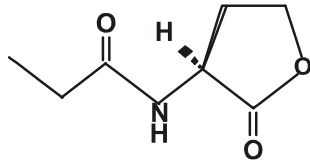
Abbildung 16: Biofilm von Staphylococcus epidermidis. Scanning-Elektronenmikroskopie. Gut zu erkennen ist der gerüstartige Aufbau des Biofilms, wodurch kanalartige Hohlräume entstehen, die zur Versorgung der tiefergelegenen Bakterien notwendig sind (Mit freundlicher Genehmigung des Friedrich-Baur-Forschungsinstitutes für Biomaterialien der Universität Bayreuth).

Quorum Sensing

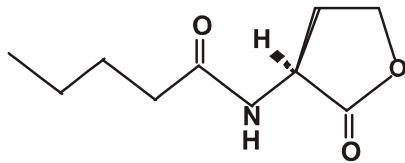
Zwischen den Zellen besteht ein Kommunikationsweg, der bekannt als „quorum sensing“ ist. Dabei ist das quorum sensing bei Regulation der Genexpression als Antwort auf Veränderungen der Zelldichte anzusehen. Diese Bakterien sezernieren bestimmte chemische Signalmoleküle, sog. „autoinducer“, die mit der zunehmenden Masse der Zellen in gleichem Maße ansteigen. Der Nachweis der minimalen stimulatorischen Schwellenkonzentration an diesen Molekülen führt zu einer veränderten Genexpression (Kuchma et al. 2000, S. 429). Sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien benutzen das quorum sensing um die verschiedensten physiologischen Aktivitäten zu regulieren. Darunter fallen Virulenz,

Konjugation, Motilität, Sporenbildung und auch die Biofilmbildung. Jedoch hängt letztere auch von weiteren Faktoren ab, wie z.B. der Hydrodynamik, dem intrazellulären Gehalt an Kohlenstoffverbindungen und den angebotenen Nährstoffen (Kjelleberg et al. 2002, S. 254). Als „autoinducer“ benutzen viele gram-negative Bakterien N-Acyl-Homoserin Laktone (AHL), wohingegen gram-positive Bakterien Oligopeptide zur Kommunikation einsetzen (Parsek et al. 2000, S.8789; Li et al. 2002, S. 2700; Williams et al. 2000, S. 667). So kontrolliert *Burkholderia cepacia*, ein Bakterium, das in Mischinfektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* in Patienten mit Zystischer Fibrose auftritt, die Expression von verschiedenen extrazellulären Faktoren wie Proteasen- und Chinitasenaktivität, aber auch die Biofilmbildung und die Motilität über ein AHL-abhängiges quorum-sensing-System, das aus dem AHL Synthase CepI und dem Transkriptionsregulator CepR besteht (Gotschlich et al. 2001, S.1; Lewenza et al., S. 748). Huber et al. konnten bei einem cep- defizienten Genomovar von *Burkholderia cepacia* die Bildung eines veränderten, an Biomasse und Dicke geringeren Biofilms beobachten sowie den Verlust der Fähigkeit, auf Agarplatten flächenhaft zu wachsen, bekannt als „swarming motility“ (Huber et al. 2001, S. 2517ff.).

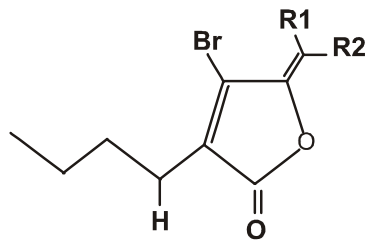
Da durch das quorum sensing eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, wie die Biofilmbildung oder die Virulenz bietet sich hier eine neue Möglichkeit, diese Faktoren durch Blockade des Signalweges zu bekämpfen. Die Biosynthese des AHL könnte verhindert, das AHL-Molekül gespalten oder aber der AHL-Rezeptor blockiert werden. So isolierten Dong et al. ein Enzym (N- Acyl- Homoserin Lactonase) aus *Bacillus species*, das AHL durch Hydrolyse inaktiviert (Dong et al. 2001, S.748). Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch sog. halogenierte Furanone, eine Gruppe von Substanzen, die von einer im Südosten Australiens endemischen Meeresalge produziert werden und diesen dadurch einen Schutz gegen Fäulniserreger und Herbivoren verleiht. Überdies sind Furanone aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu AHL in der Lage, mit dem Quorum-Sensing-System zu interferieren (Givskov 1996, S.6618; Manefield 1999, S.284).



N-Butanoyl-L-Homoserin Laktone (BHL)



N-Hexanoyl-L-Homoserin Laktone (HHL)



	R1	R2
1	Br	Br
2	H	Br

Abbildung 17: Struktur der N-Acetyl-Homoserin Laktone, die von *Serratia liquefaciens* produziert wurden und zwei Furanone, produziert von *Delisea pulchra*. Nach Givskov, 1997, S. 6619

Hier tun sich in der Tat neue Wege auf, bakterielle Infektionen zu bekämpfen, da erstmals nicht zwingenderweise die Keime selbst, sondern nur ihr „Kommunikationsweg“ blockiert oder zerstört wird. Die Bakterien bleiben am Leben, jedoch mit verminderter Virulenz. Unterdessen ist eine Reihe von unterschiedlichen Proteinen in Erprobung, die die Biofilmbildung bei bestimmten Keimen hemmen soll. Sollten diese erfolgreich auf Biomaterialien übertragbar sein, so könnten erstmals Bakterien selektiv in ihrer Virulenz ohne den Einsatz von Antibiotika beeinflusst werden. Damit wäre ein vollkommen neuer Weg in der Bekämpfung von Infektionen ohne die Gefahr von Resistenzentwicklungen beschritten. Die Biofilmbildung spielt z.B. bei der Zystischen Fibrose eine große Rolle, da neben den häufigen Infektionen des Respirationstraktes durch *Pseudomonas aeruginosa* auch Mischinfektionen mit *Burkholderia cepacia* bestehen können, die einen gemischten Biofilm aus beiden Keimen zur Folge haben (Riedel et al. 2001, S. 3249). Inwieweit sich die

Bakterien innerhalb dieses gemischten Biofilms beeinflussen, werden Untersuchungen der nächsten Jahre zeigen.

Interessanterweise war *B. cepacia* als pflanzenpathogener Bodenkeim (bei Zwiebeln) schon längere Zeit bekannt. Da auch die Biofilmbildung, die auch bei Implantaten eine besondere Relevanz besitzt und oftmals über den Erhalt oder den Verlust der Implantate entscheidet sowie von dieser Kommunikation abhängt, kann eine Beschichtung der Oberflächen mit einer Kombination aus Polymer und Furanonen oder anderen „Quorum Sensing“-Blockern eine zukunftsreiche Chance zur Prävention von Implantat-assoziierten Infektionen darstellen.

Da in vielen Bakterienstämmen bereits mehrere Gene identifiziert worden sind, die sich für die dreidimensionale Struktur und Reifung des Biofilms, für Signalübertragung zwischen den Zellen oder für die Virulenz verantwortlich zeigen, muss man sich die Entwicklung eines Biofilms als multifaktoriellen Prozess vor Augen halten, der von endogenen und exogenen Faktoren ständig beeinflusst und verändert werden kann (Parkins et al. 2001, S. 1215; De Kievit et al. 2001, S. 1865; Davies et al. 1998, S. 295). Man könnte sogar soweit gehen und behaupten, das „quorum sensing“ sei ein erstes, primitives Merkmal für Multizellularität.

Aufgabenstellung

Wie bereits weiter oben beschrieben, stellen Infektionen immer noch ein ernst zu nehmendes Problem in der Medizin dar. Durch das Einbringen eines resorbierbaren „drug delivery system“ in das Operationsgebiet, welches kontinuierlich ein Arzneimittel lokal freisetzt, somit eine geringe systemische Belastung darstellt und darüber hinaus die Geschwindigkeit der Freisetzung durch Modifikation der Oberfläche steuerbar ist. Diese Systeme können damit den Bedürfnissen der einzelnen Operationen individuell angepasst werden, als eine notwendige Ergänzung zu den bisher etablierten infektionsprophylaktischen Maßnahmen dar. PGA-Filze können vom menschlichen Organismus vollständig degradiert und resorbiert werden und eignen sich dadurch besonders für ihren Einsatz in der Medizin. Durch Modifikation und Kombination mit anderen resorbierbaren Polymeren wie z.B. PDLLA lässt sich die Abbaugeschwindigkeit weiter verändern. Dies muss nicht zwangsläufig schon während der Herstellung der PGA-Filze erfolgen, sondern kann vielmehr im Nachhinein durch Beschichtung der Filze mit PDLLA von statten gehen. Arzneimittel wie z.B. Antibiotika, Wachstumsfaktoren oder auch DNA, können in das PDLLA eingearbeitet werden, die entsprechend der Abbaugeschwindigkeit des Polymers freigesetzt werden. Durch diese Kombination entsteht ein maßgeschneidertes „drug delivery system“.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung des Polymers R203 (PDLLA) als Träger für Arzneistoffe zu untersuchen, insbesondere für die Kombination mit Antibiotika wie Gentamicin und Teicoplanin für die Anwendung als Infektionsprophylaxe. Hierfür sollen bei *in vitro* Versuchen die Freisetzungskinetik der Antibiotika alleine und in Kombination mit dem Polymer PDLLA aus PGA- Filzen bestimmt werden. Diese *in vitro* Versuche sollen als Grundlage der Einsatzfähigkeit der PGA- Filze als „drug delivery system“ für die Verwendung in lebenden Organismen dienen. Ferner soll der Unterschied in der Freisetzung zwischen PGA- Filzen und Stahlimplantaten untersucht werden. Weiterhin sollen die antiinfektiven Eigenschaften des PDLLA mit einer Gruppe neuerer Polymere, namentlich den Poly(DTE) verglichen werden. Hierfür wurden die Anhaftung von Bakterien sowie die Vermehrungsfähigkeit der anhaftenden Bakterien sowie der Verfügbarkeit der eingearbeiteten Antibiotika untersucht.

2 Material und Methoden

2.1. Material

Polymere

Resomer® R203

Für die Beschichtung der Proben wurde das Resomer® R203 der Firma Boehringer Ingelheim verwendet. Das Resomer R203 ist ein Polymer aus Poly-D,L-Laktat (PDLLA) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 29.000 Dalton. Dieses Polymer ist ein Racemat aus D- und L- Enantiomeren der Milchsäure und dient als biodegradierbare Beschichtung für medizinische Implantate.

Poly-DTE

Das Poly-DTE wurde freundlicherweise von Prof. J. Kohn zur Verfügung gestellt (Rutgers University Piscataway, USA). Bei den in Kurzform Poly(DTE) genannten Verbindungen handelt es sich um Poly-Desamio-tyrosyl-Tyrosinethylester, sog. „Pseudo“-Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 89.000 Dalton bzw. 120.000 Dalton. Der PEG-Anteil entspricht 0,26% (PEG 20.000) bzw. 5% (PEG 1.000)

PGA-Filze (Poly Glycolic Acid)

PGA-Filze wurden freundlicherweise von der Firma alpha Research, Berlin zur Verfügung gestellt.

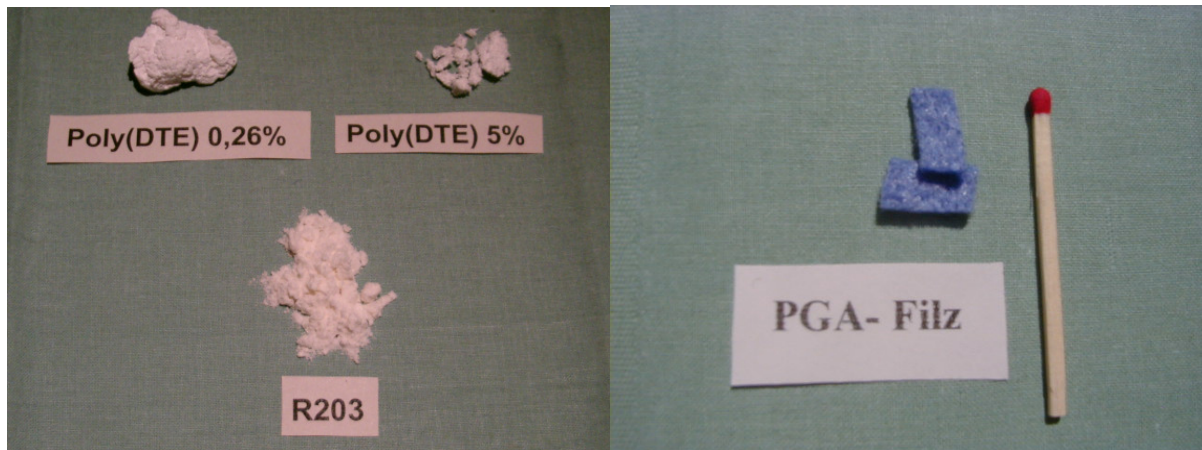


Abbildung 18 Die Polymere in der Übersicht.

Antibiotika

Gentamicin

Für die Versuche wurde die Trockensubstanz von Gentamicin der Firma COM Pharma verwendet.

Teicoplanin

Teicoplanin der Firma Höchst/Aventis (Targozid®) wurde für die Elutionsversuche und die Anhaftungsversuche verwendet.

Gentamicin-Nachweis

Für den Nachweis von Gentamicin wurde der „fluorescence polarization immunoassays TDx/TDxFLx® Gentamicin assay“ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) verwendet

Teicoplanin-Nachweis

Für den Nachweis von Teicoplanin wurde der „Innofluor™ Teicoplanin assay system“ (Opus Diagnostics, Fort Lee, NJ, USA) verwendet.

Bakterien

Ein schleim- und nichtschleimbildender Stamm von Staphylococcus epidermidis wurde freundlicherweise vom Institut für Klinikhygiene der TU München zur Verfügung gestellt.

Sonstiges

Kirschnerdrähte

Handelsübliche Kirschnerdrähte aus rostfreiem Stahl (V2A- Stahl nach ISO 5832-1) und Drähte einer typischen Titanlegierung (TiAl_6V_4 nach ISO 5832-11 bzw. ISO 5832-3) wurden von der Firma Synthes GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

Stahlplättchen

Für die Versuche wurden Plättchen (Durchmesser 8mm) aus herkömmlicher Stahlfolie (Dicke 0,5mm) gestanzt

Präzisionswaage

Präzisionswaage „MC1 research RC 210P“ der Firma Sartorius wurde für die Wägungen verwendet

Zentrifuge

Megafuge 1.0R mit Rotor-Nr. 2252 der Firma Sorvall/ Heraeus (190 x G entspricht 1.000U/min, 1.700 x G entspricht 3.000U/min)

Ultraschallgerät

Das Ultraschallgerät Bandelin Sonorex wurde freundlicherweise vom Institut für Klinikhygiene der TU München zur Verfügung gestellt.

Beta-Counter

Für die H³-Thymidin Bestimmungen wurde ein Beta-Counter (1219 Rackbeta, LKB Wallac, Bromma, Sweden) verwendet.

Ethylacetat

Für die Polymerlösungen wurde Ethylacetat der Firma Sigma-Aldrich AG, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

Chloroform

Für die Polymerlösungen wurde Chloroform der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bezogen.

2.2 Beschichtungstechnologie

2.2.1 Die Beschichtung mit dem Polymer R203

Die zu beschichtenden Proben (Kirschnerdrähte bzw. PGA-Filze) wurden mittels „solvent casting technique“ mit PDLLA beschichtet. Der Arzneimittelträger wurde in Ethylacetat in unterschiedlichen Konzentrationen über Nacht gelöst. Die über gängige Sterilfilter (0,2µm) in vorsterilisierte Gefäße überführte Beschichtungslösung wurde, um die Verdunstung des Lösungsmittels und den damit verbundenen Anstieg der Polymer-Konzentration zu verhindern, auf Trockeneis behalten. Um eine gleichmäßige und vollständige Beschichtung zu erreichen wurden die Proben zweimal für mindestens fünf Sekunden in die Beschichtungslösung getaucht, wobei beim zweiten Beschichtungsvorgang die Probe an einer anderen Stelle gefasst wurde. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet und in vorsterilisierte Behälter verpackt. Alle Schritte der Beschichtung wurden unter aseptischen Bedingungen im „laminar air flow“ vorgenommen.

2.2.2 Sterile Beschichtung mit Gentamicin und PDLA

Da Gentamicin als wasserlösliche Substanz in Ethylacetat als Suspension vorliegt, ist es nicht möglich, diese steril zu filtrieren. Daher muss ein Umweg beschritten werden, um das aseptische Gentamicin zu formulieren: Gentamicin wird als Pulver in Aqua dest. gelöst und über einen Sterilfilter (0,2µm) in vorsterilisierte Gefäße eingebracht. Die sterile Gentamicinlösung wird dann in einem Alkohol-Trockeneis-Gemisch unter leichtem Rühren an die Wand des Gefäßes gefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Der Gasaustausch ist ebenfalls mit einem Sterilfilter (0,2µm) versehen. Parallel dazu wird die in Pulverform vorliegende Trägersubstanz Poly-D,L-Laktid über Nacht in Ethylacetat gelöst und über einen Sterilfilter (0,2µm) in die nach der Sterilisation mit lyophilisiertem Gentamicin befüllten Gefäße eingebracht. Nach der vollständigen Durchmischung wird die homogene Suspension in vorsterilisierte Reagenzgläser mit Schliffstopfen überführt. Die Beschichtung der Implantate erfolgt unter „laminar-air-flow“- Bedingungen. Das zu beschichtende Implantat wird für mindesten 5 Sekunden in die Suspension eingelegt und anschließend mittels einer sog. „Peau“-Klemme als Halterung an der Luft unter „laminar-air-flow“- Bedingungen getrocknet. Nach der Beschichtung der Implantate wird die Beschichtungslösung verworfen. Die Implantate werden nach dem Trocknen einzeln in vorsterilisierte Gläser mit Schraubdeckel in die vorsterilisierte Verpackung eingetütet und verschweißt. Die Lagerung erfolgt mit Kieselgel in Plastiktüten eingeschweißt im Kühlschrank.

2.2.3 Die Beschichtung mit dem Polymer Poly-DTE

In den vorliegenden Versuchen wurden die Polymere Poly-(DTE co 0.26% PEG 20K carbonate) und Poly-(DTE co 5% PEG 1K carbonate) verwendet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Etylacetat müssen die Polymere in Chloroform in einer Konzentration von 66,6 mg/ml für 24h gelöst werden. Ansonsten waren die übrigen Schritte der Beschichtung identisch der des Poly-D,L-Laktat. Die hier verwendeten Polymere besitzen ein Molekulargewicht zwischen 89.000 und 120.000 Dalton mit einem PEG-Anteil von 0,26% bzw. 5%.

2.3 Methoden: Elutionen

2.3.1 Bestimmung der Masse der aufgetragenen PDLLA-Beschichtung

Alle PDLLA- Beschichtungen wurden mit dem Polymer R203 vorgenommen. Dieses Polymer ist ein Racemat aus D- und L- Enantiomeren der Milchsäure mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 29.000 Dalton.

Um die Masse der aufgetragenen Beschichtung zu bestimmen, wurden 14 handelsübliche PGA-Filze (10 x 5 x 11 mm) in PDLLA-Lsg (33mg/ ml Ethylacetat) beschichtet. Sowohl vor der Beschichtung als auch nach der Beschichtung und dem anschließendem vollständigen Trocknen der Proben wurde die Masse der Filze mittels Präzisionswaage ermittelt.

2.3.2 Antibiotika- Elutionen

2.3.2.1 Antibiotika- Elution aus PDLLA- beschichteten PGA- Filzen

Um die Freisetzungskinetik von Gentamicin aus mit PDLLA- beschichteten PGA- Filzen zu bestimmen und damit die Verwendungsfähigkeit als „drug delivery system“ zu testen, wurden 28 handelsübliche PGA-Filze in vier Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polymer R203 und Gentamicin beschichtet. Einen Überblick über die verschiedenen Gruppen zeigt Tabelle 1 . Die Beschichtung erfolgte wie oben beschrieben.

Gruppe	Konzentration R203	Konzentration Gentamicin	Lösungsmittel
1:	33,3 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
2:	33,3 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat
3:	16,67 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
4:	16,67 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat

Tabelle 1: Versuchsgruppen mit Angabe der Konzentrationen an R203, Gentamicin und des Lösungsmittels

Zu den Zeitpunkten 10min, 1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, (168 Stunden und 336 Stunden) wurden jeweils Aliquote von 200µl entnommen und die Konzentration von

Gentamicin mittels „fluorescence polarization immunoassays TDx/TDxFLx® Gentamicin assay“ bestimmt.

2.3.2.2 Antibiotika- Elution aus PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten

Um die Verwendungsfähigkeit des PDLLA als „drug delivery system“ zu testen, wurden Beschichtungen mit Gentamicin hergestellt. Die Arzneimittelfreisetzung der Antibiotika- und Polymerbeschichteten Kirschner-Drähte (n=10, Stärke 1,5, Länge 150mm; Stahl) wurde in 10 ml PBS-Pufferlösung (pH 7,4) bei 37°C untersucht. Die Proben waren mit dem PDLLA-Polymer (133,3 mg/ml Ethylacetat) und Gentamicin (5% w/w) beschichtet. PDLLA-beschichtete Proben ohne Antibiotika dienten als Kontrolle. Um die Stabilität der Antibiotika über den gesamten Zeitraum zu gewährleisten wurde dem PBS-Puffer Gentamicin als Kontrolle zugesetzt. Aliquote von jeweils 500µl wurden zu den Zeitpunkten 10min, 1 Stunde, 24 Stunden und 96 Stunden entnommen und die Konzentrationen von Gentamicin bestimmt. Anschließend wurde die gesamte Pufferlösung ausgetauscht. Die Antibiotika-Konzentrationen wurden mittels „fluorescence polarization immunoassays TDx/TDxFLx® Gentamicin Assay“ bestimmt.

2.3.2.3 Antibiotika- Elution aus unbeschichteten PGA-Filzen

Die Verwendung von PGA- Filzen als „drug delivery system“ ohne Verwendung einer PDLLA- Beschichtung wurde untersucht. Dafür wurden herkömmliche PGA- Filze (16mm x 18 mm) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gentamicin, Teicoplanin oder mit Kombinationen aus beiden versetzt. Für die Kombinationen aus beiden, den „Duobeschichtungen“ wurden zweimal identische Gruppen hergestellt, die sich nur in der Art der Herstellung unterscheiden. Zum einen wurde erst das Gentamicin auf die Proben gebracht, in einem zweiten Schritt darauf erst das Teicoplanin, in der anderen Gruppe war es genau umgekehrt. Um die Freisetzung der Arzneimittel abzuklären, wurden Lösungen der unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und die PGA- Filze vollständig mit den Lösungen überschichtet. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert. Dem Lyophilisat wurde je 10 ml PBS- Puffer zugegeben, woraus die Aliquots (200µl) zur Bestimmung von Gentamicin/Teicoplanin zu den Zeitpunkten 10min, 1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden und 96 Stunden entnommen wurden.

Die folgenden Tabellen gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Konzentrationen der in R203 eingearbeiteten Antibiotika:

Teicoplanin-Monobeschichtung

Konzentration
4 mg/cm ²
6 mg/cm ²
8 mg/cm ²
12 mg/cm ²

Gentamicin- Monobeschichtung

Konzentration
2 mg/cm ²
4 mg/cm ²

Teico- Genta- Duobeschichtungen

Konzentrationen
T 4/ G 2 mg/cm ²
T 6/ G 2 mg/cm ²
T 8/ G 4 mg/cm ²
T 12/ G 4 mg/cm ²

Konzentrationen
G 2/ T 4 mg/cm ²
G 2/ T 6 mg/cm ²
G 4/ T 8 mg/cm ²
G 4/ T 12 mg/cm ²

Tabelle 2: Übersicht über die Antibiotika- Mono- und Duobeschichtungen: T= Teicoplanin, G= Gentamicin

2.4 Methoden: Bakteriologische Untersuchungen

2.4.1 Herstellung einer standardisierten Bakteriensuspension

Beide Staph. epidermidis Stämme wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf Blutagar-Platten bei 37°C für 18 Stunden bebrütet. Daraufhin wurden die Bakterien in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und auf 5×10^7 KBE/ml durch optischen Vergleich mit einer 0,5%igen MacFarland-Lösung eingestellt. Die Suspension wurde dann mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf $2,5 \times 10^5$ KBE/ml verdünnt.

2.4.2 Bestimmung der bakteriellen Adhäsion mittels radioaktiver Markierung

Die Gesamtzahl der sowohl abgestorbenen als auch lebenden Bakterien wurde mittels radioaktiver Markierung der Bakterien untersucht, so wie es bei Christensen et al. (1995, S. 477ff.) beschrieben ist. Staph.epididermidis wurde in mit [³H]-Thymidin versetzter Müller-Hinton-Boullion (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) bei 37°C bebrütet. Nach 24 Stunden Inkubationszeit auf einem Shaker (100 U/min), wurden die Bakteriensuspensionen wie oben beschrieben eingestellt. Sowohl beschichtete als auch unbeschichtete Stahlplättchen wurden mit der radioaktiv-beschichteten Bakteriensuspension für 2 Stunden bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die einzelnen Drähte wurden mit einer sterilen Pinzette entnommen, in steriler NaCl-Lösung 3 mal gewaschen und für 15 Sekunden luftgetrocknet. Anschließend wurden die Proben in Szintillationsröhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben und „counts per minute“ (cpm) in einem β-counter (1219 Rackbeta, LKB Wallac, Bromma, Schweden) gemessen. Die Auswertung erfolgte für beide Keime getrennt.

2.4.3 Bestimmung der Anzahl der anhaftenden vermehrungsfähigen Bakterien

Die Anzahl der anhaftenden vermehrungsfähigen Keime wurde im Wachstumsversuch bestimmt. Die beschichteten und unbeschichteten K-Drähte aus Stahl und Titan (n = 10) wurden in 2 ml der Bakteriensuspension ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml 0,9%ige NaCl-Lösung) bei 37°C für 2 Stunden unter statischen Bedingungen inkubiert. Nach dem Waschen in 0,9%iger NaCl-Lösung wurden die Proben in 2ml Trypsinlösung (1% w/w) gegeben und mit Ultraschall für 15 Minuten behandelt, um alle anhaftenden Mikroorganismen abzulösen. Aufsteigende

Verdünnungslösungen jeder Trypsinlösung wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen, um die vermehrungsfähigen Keime zu quantifizieren. Die Blutagarplatten wurden bei 37°C für 48 Stunden bebrütet, anschließend wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) visuell ausgezählt. Die Auswertung erfolgte für beide Keime getrennt.

2.5 Statistische Methoden

Die Daten der Anhaftungs- und Vermehrungsversuche wurden auf statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney Tests mit Signifikanzniveau „ $p < 0,05$ “ untersucht.

3 Ergebnisse:

3.1 Bestimmung der Masse der aufgetragenen PDLLA-Beschichtung am Modell der PGA-Filze

Um Rückschlüsse auf die aufgetragene Menge an PDLLA zu ziehen, wurden 14 PGA-Filze mit PDLLA in einer Konzentration von 33 mg/ml Ethylacetat beschichtet. Die Masse der Proben wurde vor und nach der Beschichtung mittels Präzisionswaage bestimmt.

Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle (Rohdaten s.Anhang):

	Masse (mg) vorher	Masse (mg) nachher	Differenz in mg
Mittelwert	18,85	20,8714286	2,02142857
Stdabwch	4,34424907	4,74754502	0,47234759

Tabelle 3: Mittelwerte der Masse der aufgetragenen Beschichtungsmenge auf PGA-Filze

Bestimmt man die Beschichtungsmenge bezogen auf das Volumen, so ergibt sich folgender Ansatz:

Volumen der Proben gesamt: $140\text{mm} \times 5\text{mm} \times 11\text{mm} = 7700\text{mm}^3$

=> Gesamtbeschichtung $28,3\text{mg} / 7700\text{mm}^3 = 0,00367 \text{ mg/mm}^3 = \underline{\underline{3,67 \text{ mg/cm}^3}}$

Bezogen auf die Fläche ergibt sich folgender Ansatz:

Fläche der Proben gesamt: $140\text{mm} \times 11\text{mm} = 1540\text{mm}^2$

=> Beschichtung $28,3\text{mg} / 1540 \text{ mm}^2 = 0,0183 \text{ mg/mm}^2 = \underline{\underline{1,83 \text{ mg/cm}^2}}$

Die Beschichtungsmenge bezogen auf die Masse der PGA-Filze beträgt somit 10,7%.

3.2 Antibiotika- Elutionen

3.2.1 Antibiotika- Elution aus PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten

Durch die Einarbeitung von Gentamicin in das Polymer R203 und Beschichtung der Kirschnerdrähte entsteht ein „drug delivery system“. Um die Freisetzung von Metalloberflächen zu untersuchen, wurden Kirschnerdrähte (n=10, Stärke 1,5, Länge 150mm;

Stahl) in 10 ml PBS-Pufferlösung bei 37°C untersucht. Die Proben waren mit dem PDLLA-Polymer (133,3 mg/ml Ethylacetat) und Gentamicin (5% w/w) beschichtet. PDLLA-beschichtete Proben ohne Antibiotikaeinarbeitung dienten als Kontrolle. Zu den Zeitpunkten 10min, 1 Stunde, 24 Stunden und 96 Stunden wurden Aliquote der PBS-Pufferlösung entnommen und die Konzentrationen von Gentamicin bestimmt. Siehe **Tabelle 4** (sowie Abb.19 + 20).

	Zeitpunkte	10 min	1h	24h	96h
Mittelwert		11	11,9	12,7	14,1
Stabweichung		2	2	2	2,1

Tabelle 4: Freisetzung von Gentamicin (mg/l) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten in Abhängigkeit der Zeit

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten für Kirschnerdrähte der Stärke 1,5 eine Beschichtung von 0,43 mg/cm eruieren. Die daraus resultierende Menge an Gentamicin beträgt 21,5 µg/cm. Bezogen auf die Gesamtlänge der Drähte errechnet man somit 322,5 µg Gentamicin pro Probenansatz (s. Anhang).

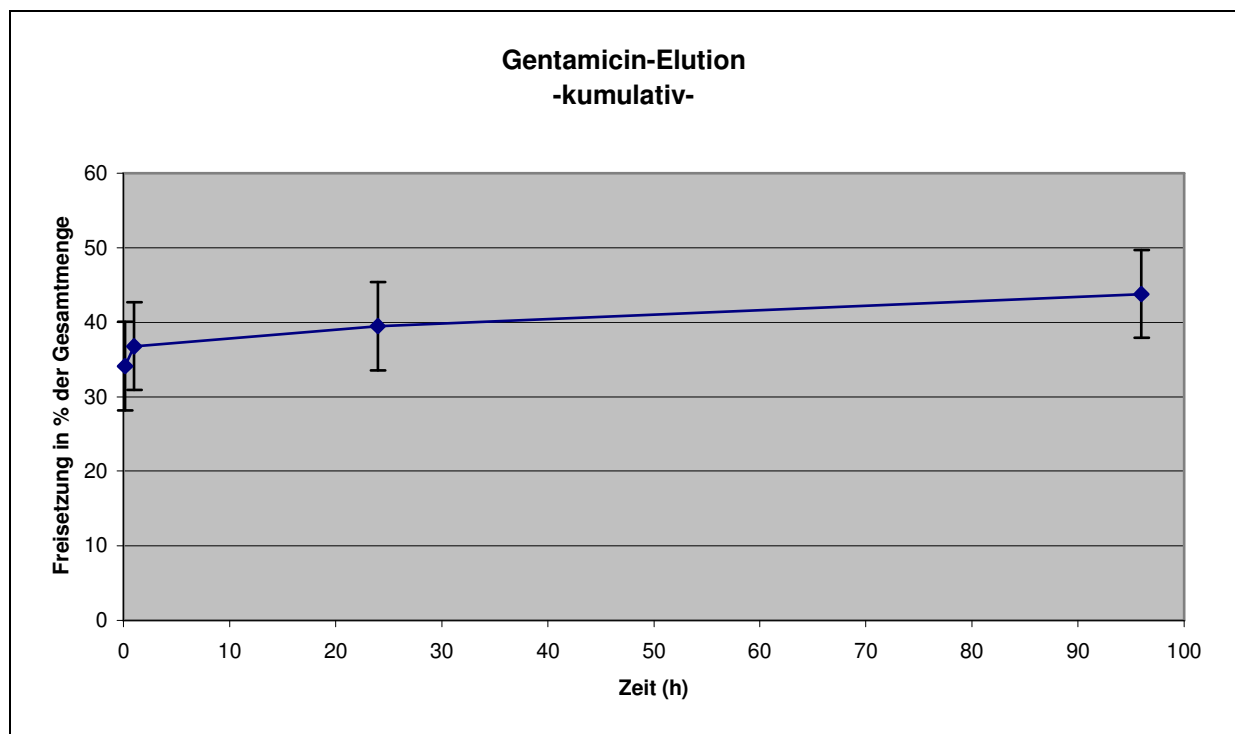


Abbildung 19: Prozentuale Gentamicin-Elution (kumulativ) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

Somit werden innerhalb der ersten 10 min bereits 34,1% der Gesamtmenge an Gentamicin freigesetzt. Nach diesem anfänglichen Peak flacht die Kurve ab, so dass nach 4 Tagen noch annähernd 40% des eingearbeiteten Gentamicins vorhanden sind.

3.2.2 Antibiotika- Elution aus unbeschichteten PGA-Filzen

Die Verwendung von PGA- Filzen als „drug delivery system“ ohne Verwendung einer PDLA- Beschichtung wurde untersucht. Dafür wurden herkömmliche PGA- Filze (16mm x 18 mm) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gentamicin, Teicoplanin oder mit Kombinationen aus beiden versetzt. Weiterhin wurde die Freisetzung beider Antibiotika in Abhängigkeit der Reihenfolge der Einarbeitung auf die Filze untersucht, so dass zunächst Teicoplanin und anschließend Gentamicin aufgebracht wurde, bzw. in einer weiteren Versuchsreihe zunächst Gentamicin und daraufhin Teicoplanin. Bestimmt wurden jeweils die Konzentrationen an Teicoplanin sowie Gentamicin für jeden Ansatz. Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Konzentrationen.

Teicoplanin-Monobeschichtung

Konzentration
4 mg/cm ²
6 mg/cm ²
8 mg/cm ²
12 mg/cm ²

Gentamicin- Monobeschichtung

Konzentration
2 mg/cm ²
4 mg/cm ²

Teicoplanin- Gentamicin- Duobeschichtungen

Konzentrationen
T 4/ G 2 mg/cm ²
T 6/ G 2 mg/cm ²
T 8/ G 4 mg/cm ²
T 12/ G 4 mg/cm ²

Konzentrationen
G 2/ T 4 mg/cm ²
G 2/ T 6 mg/cm ²
G 4/ T 8 mg/cm ²
G 4/ T 12 mg/cm ²

Tabelle 5: Übersicht über die Antibiotika- Mono- und Duobeschichtungen: T= Teicoplanin, G= Gentamicin

Die Ergebnisse zeigen **Tabellen im Anhang (Anhangstabellen 4, 5, 6, 7, 8 und 9)**.

Monobeschichtungen

3.2.2.1 Gentamicin-Monobeschichtungen

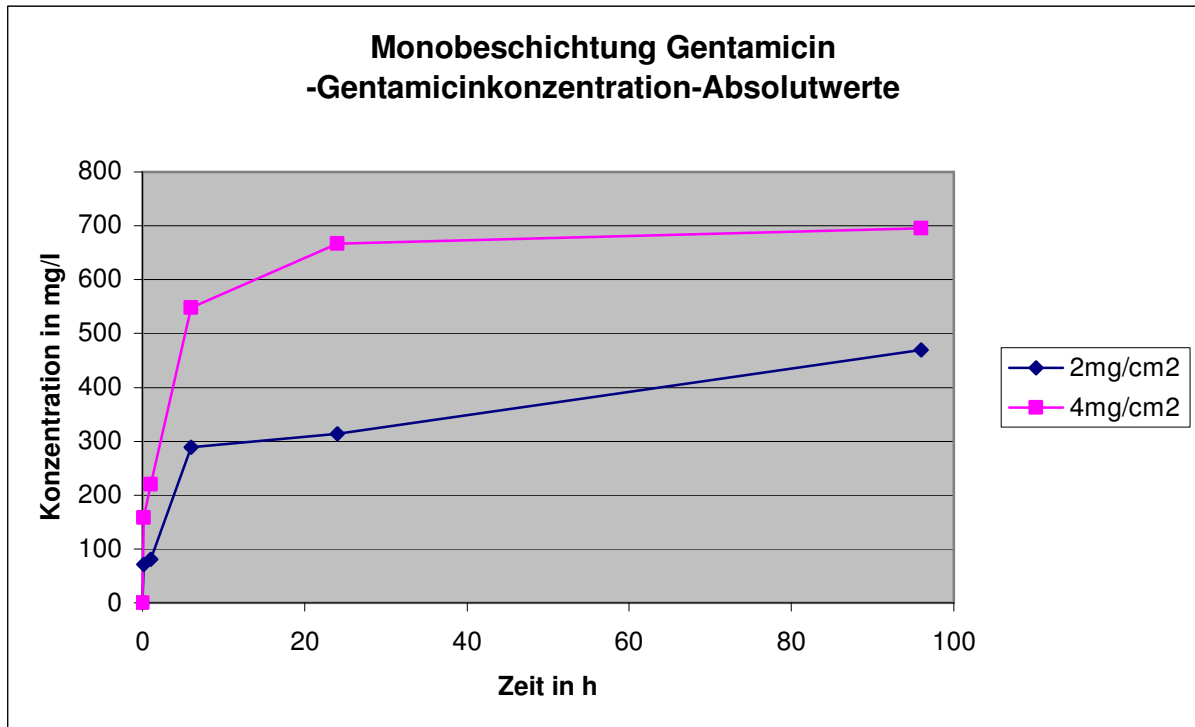


Abbildung 20: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung der Gentamicinkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA- Filzen, Absolutwerte

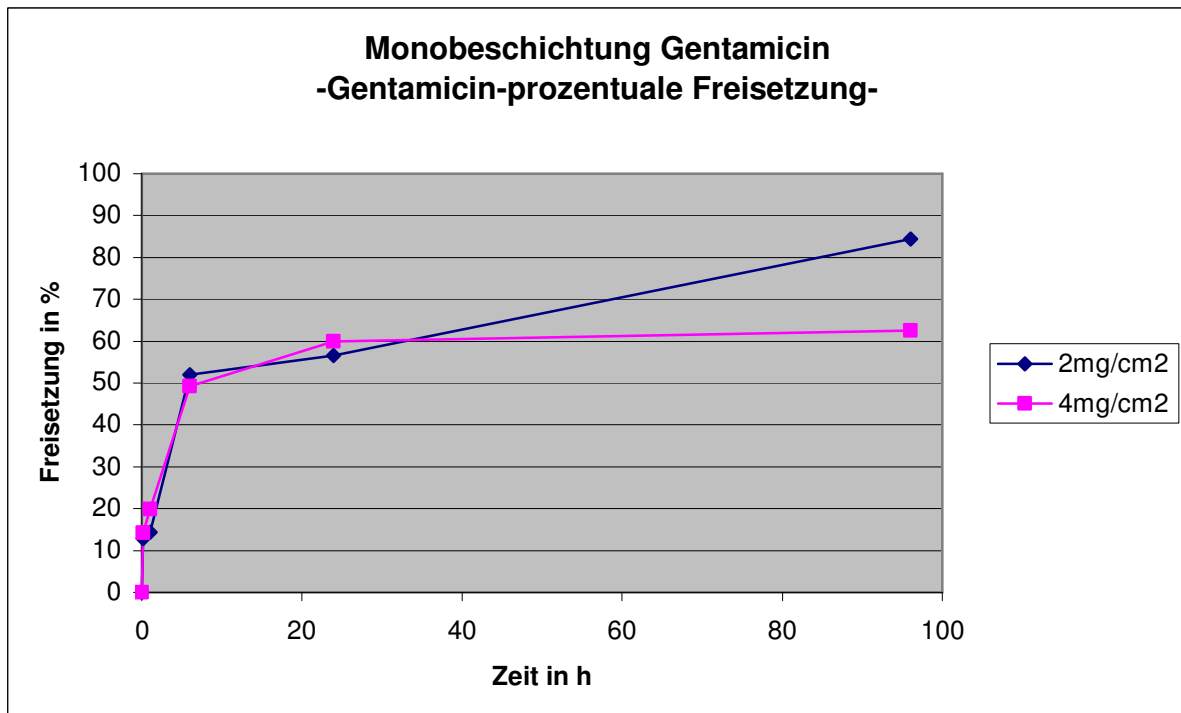


Abbildung 21: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung von Gentamicin aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.2.2 Teicoplanin-Monobeschichtungen

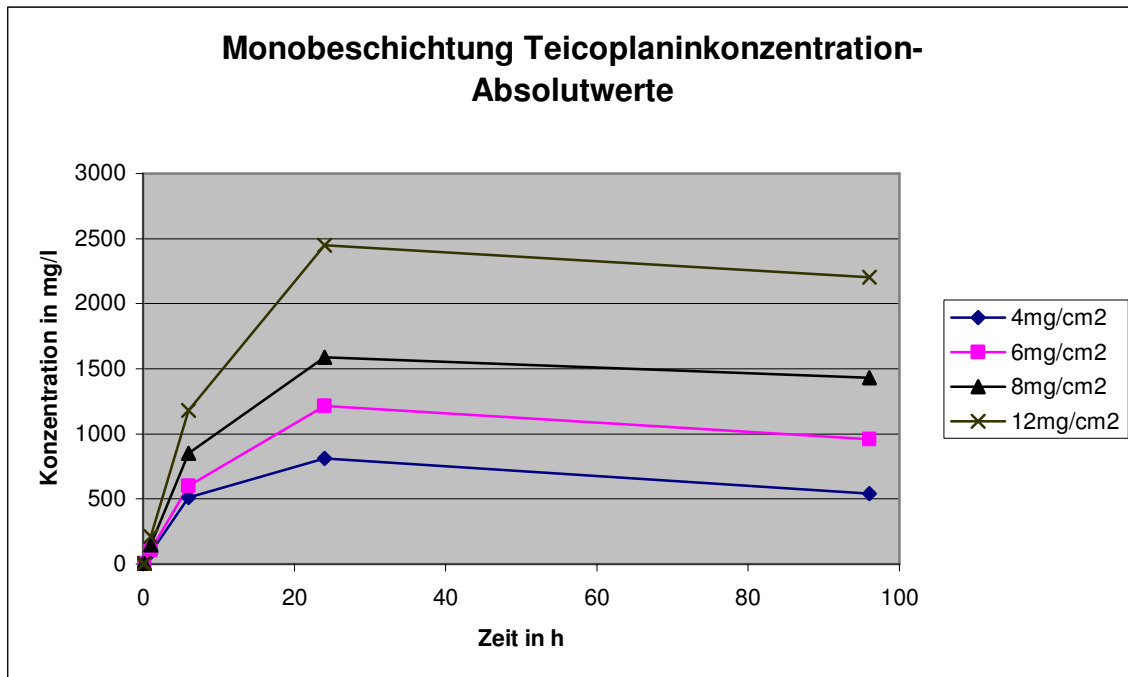


Abbildung 22: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA- Filzen, Absolutwerte

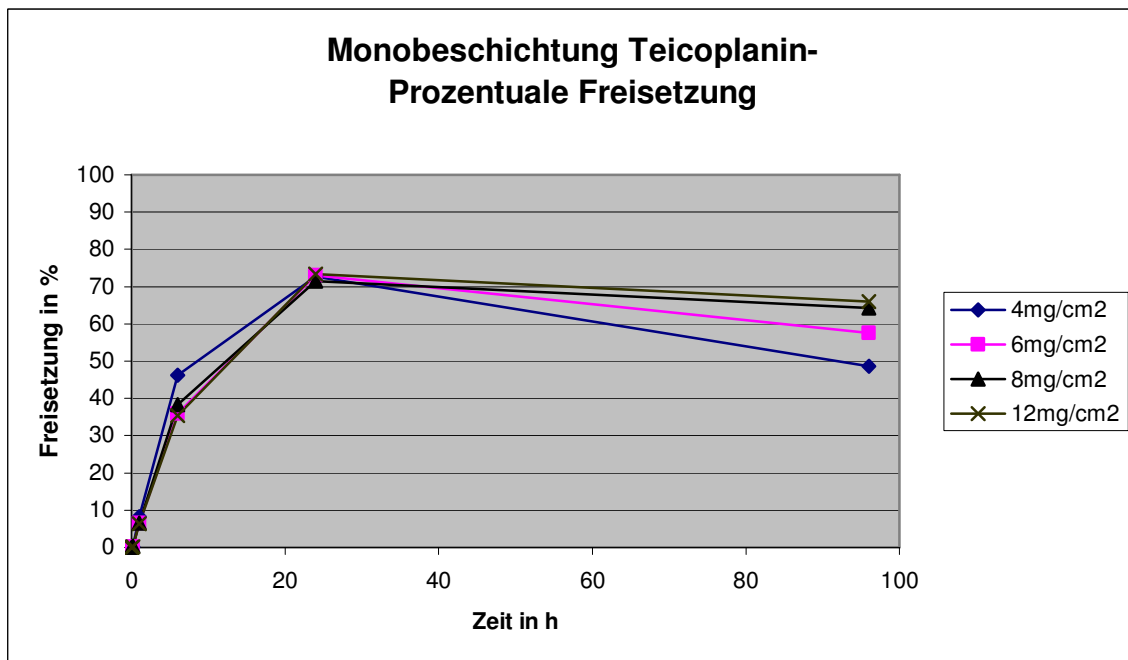


Abbildung 23: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung von Teicoplanin aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

Duobeschichtungen

3.2.2.3 Gentamicin/Teicoplanin-Beschichtung

Gentamicin-Bestimmung

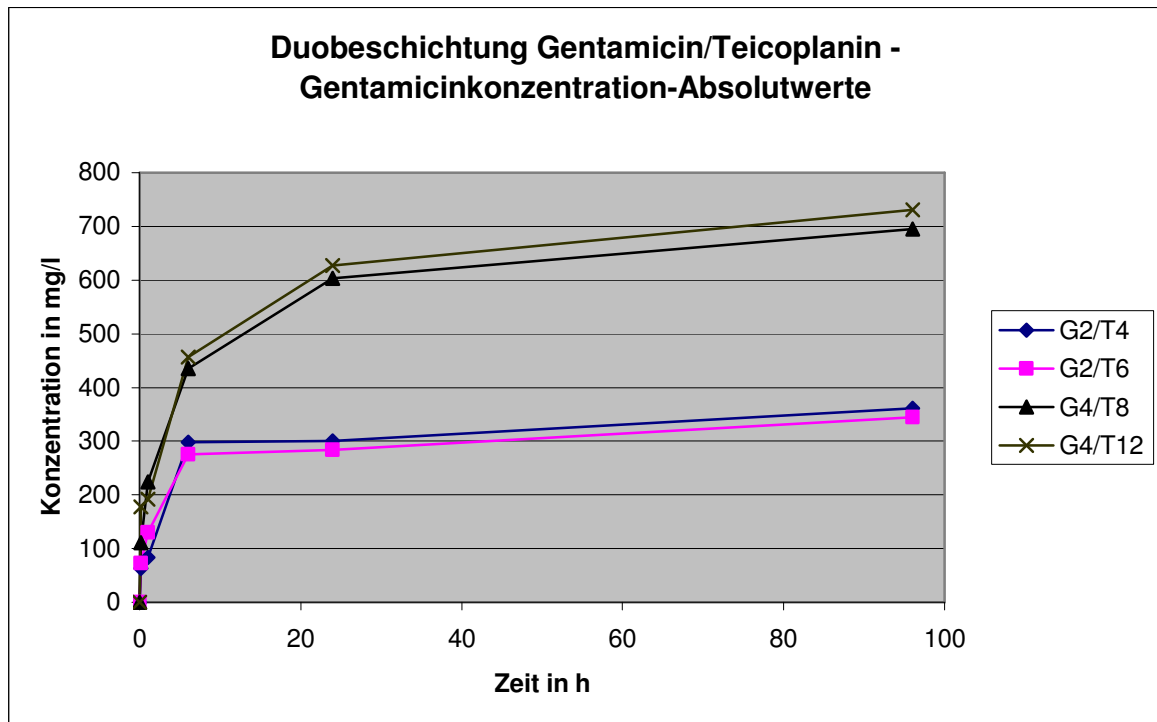


Abbildung 24: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Gentamicinkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA-Filzen, Absolutwerte

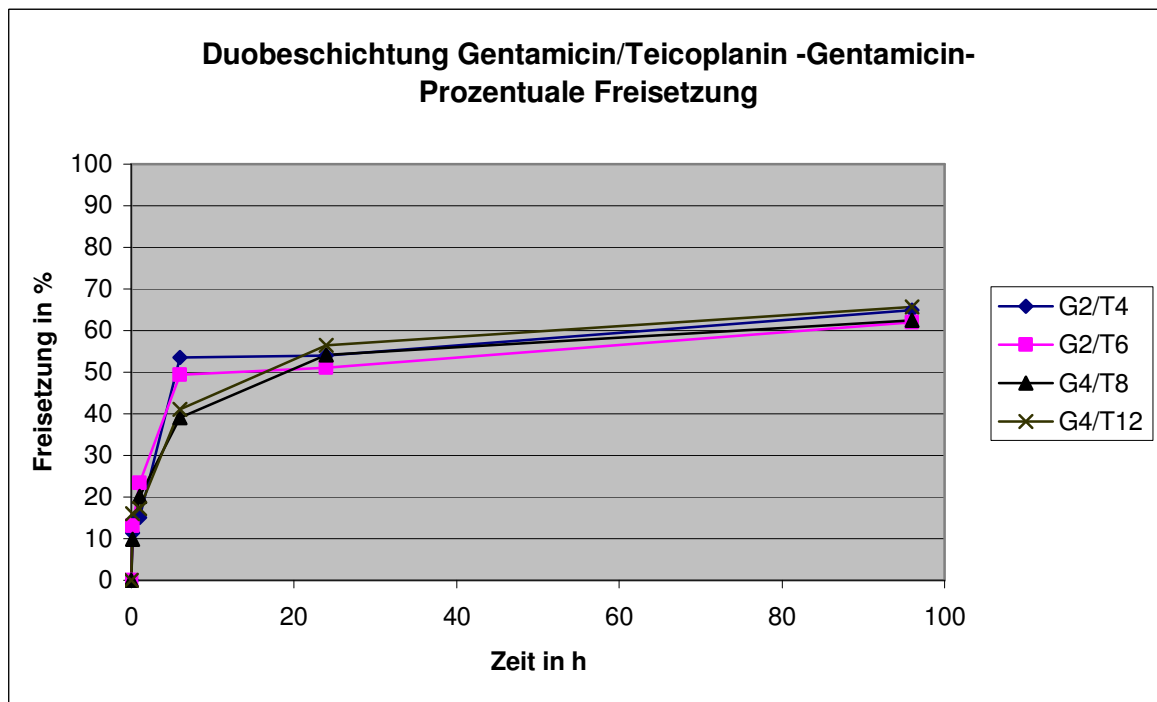


Abbildung 25: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung von Gentamicin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.2.4 Gentamicin/Teicoplanin-Beschichtung

Teicoplanin-Bestimmung

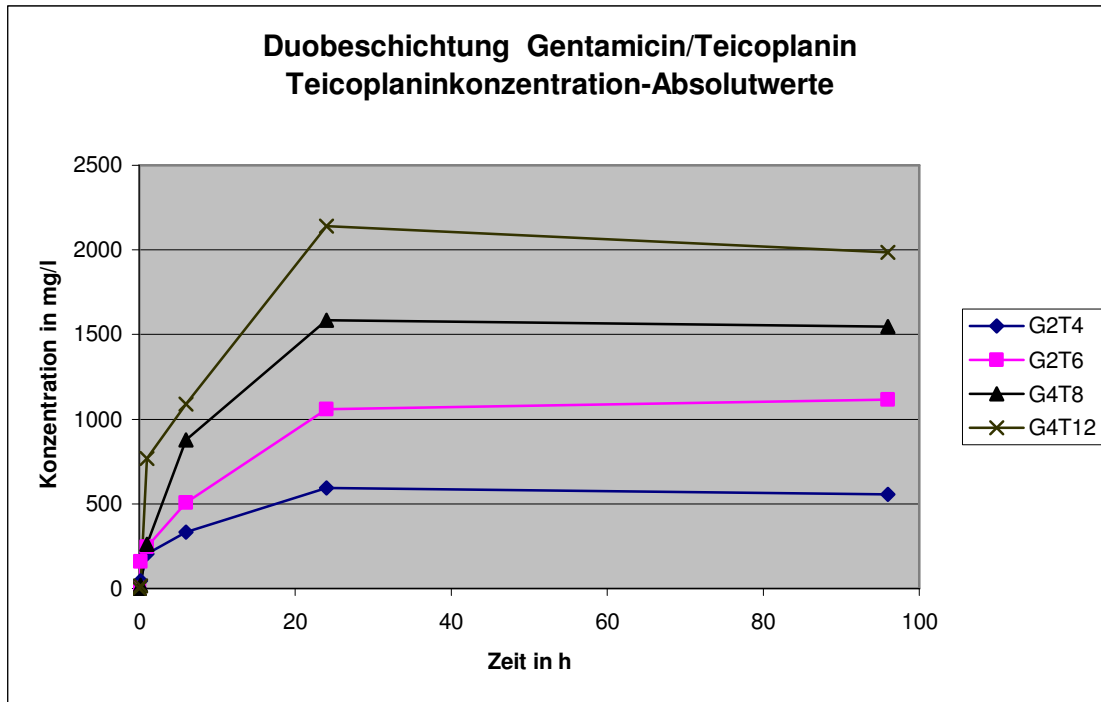


Abbildung 26: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA-Filzen, Absolutwerte

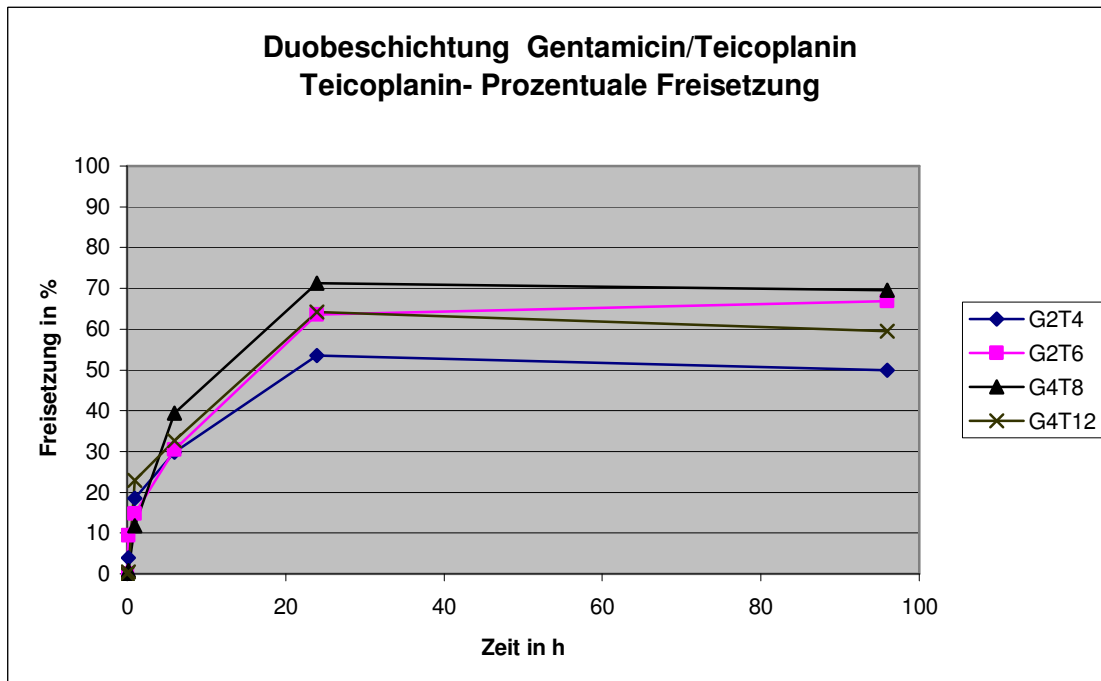


Abbildung 27: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung von Teicoplanin aus PGA-Filzen, Prozentuale Freisetzung

3.2.2.5 Teicoplanin/Gentamicin-Beschichtung

Gentamicin-Bestimmung

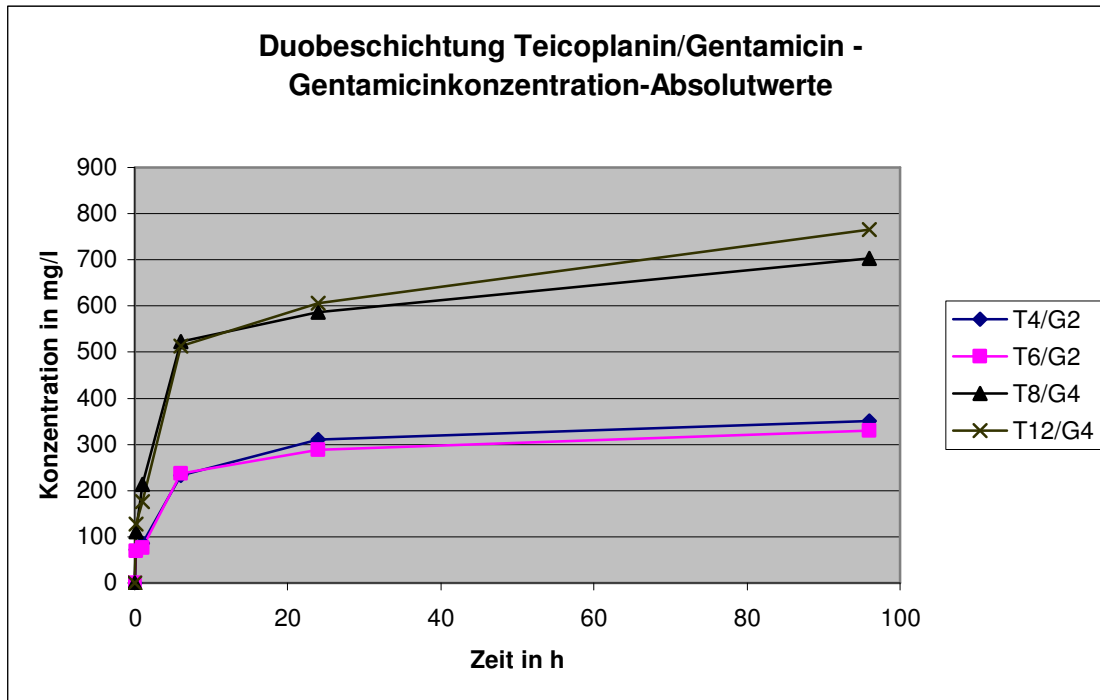


Abbildung 28: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Gentamicinkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA-Filzen, Absolutwerte

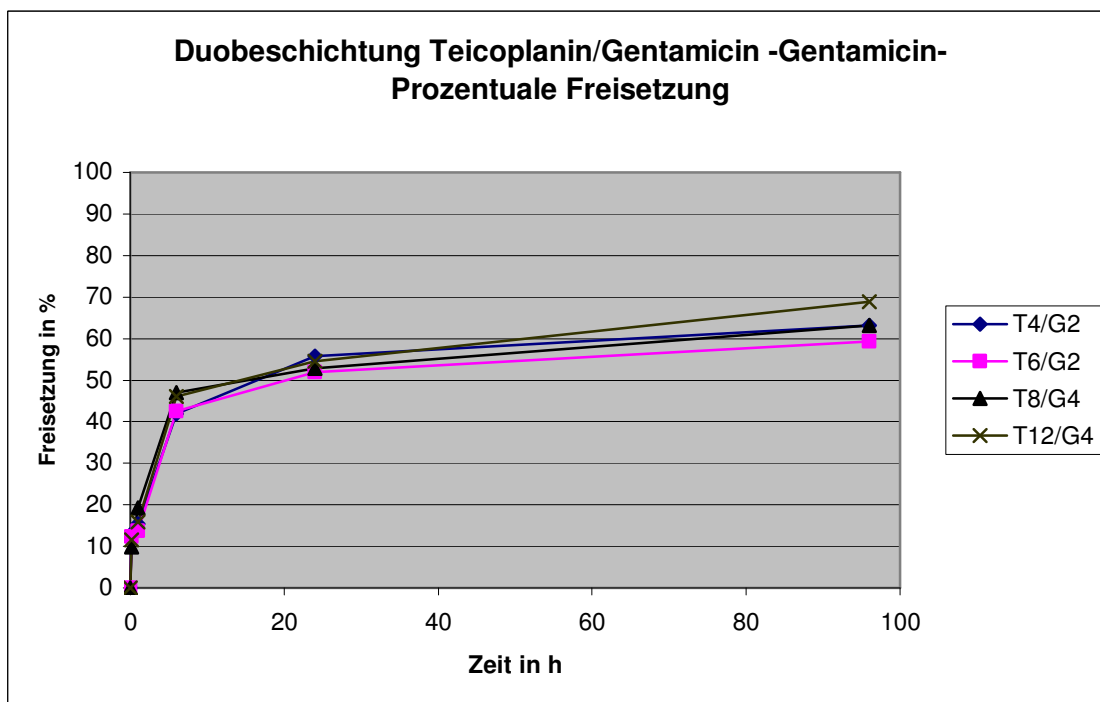


Abbildung 29: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung von Gentamicin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.2.6 Teicoplanin/Gentamicin-Beschichtung

Teicoplanin-Bestimmung

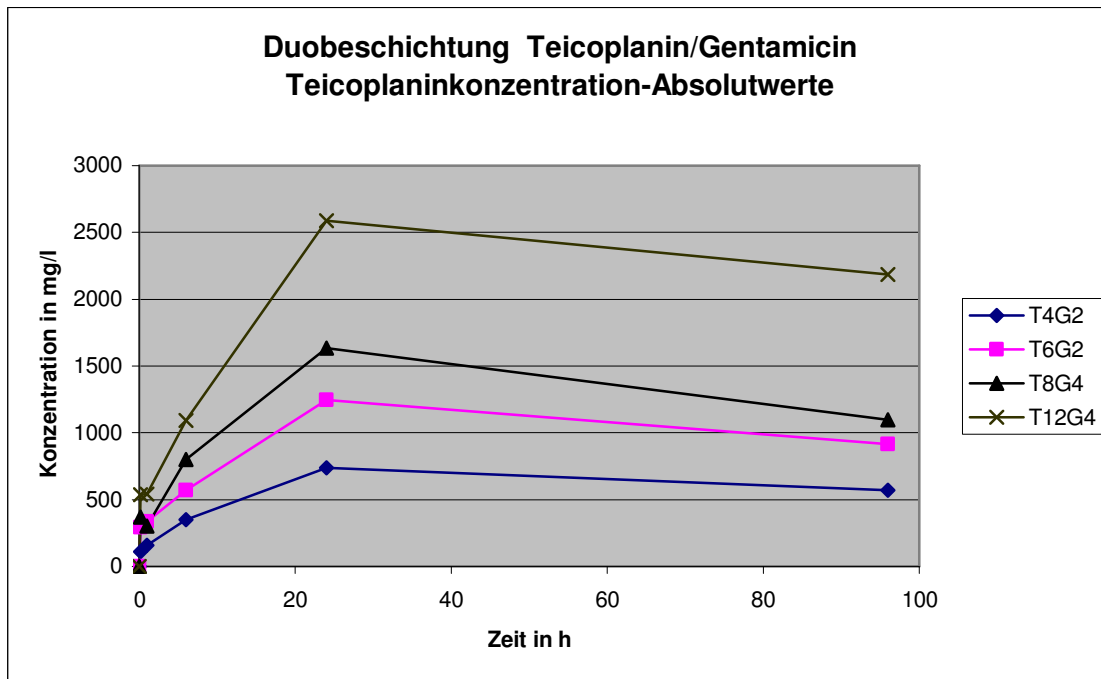


Abbildung 30: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Teicoplaninkonzentration in der Elutionsflüssigkeit aus PGA-Filzen, Absolutwerte

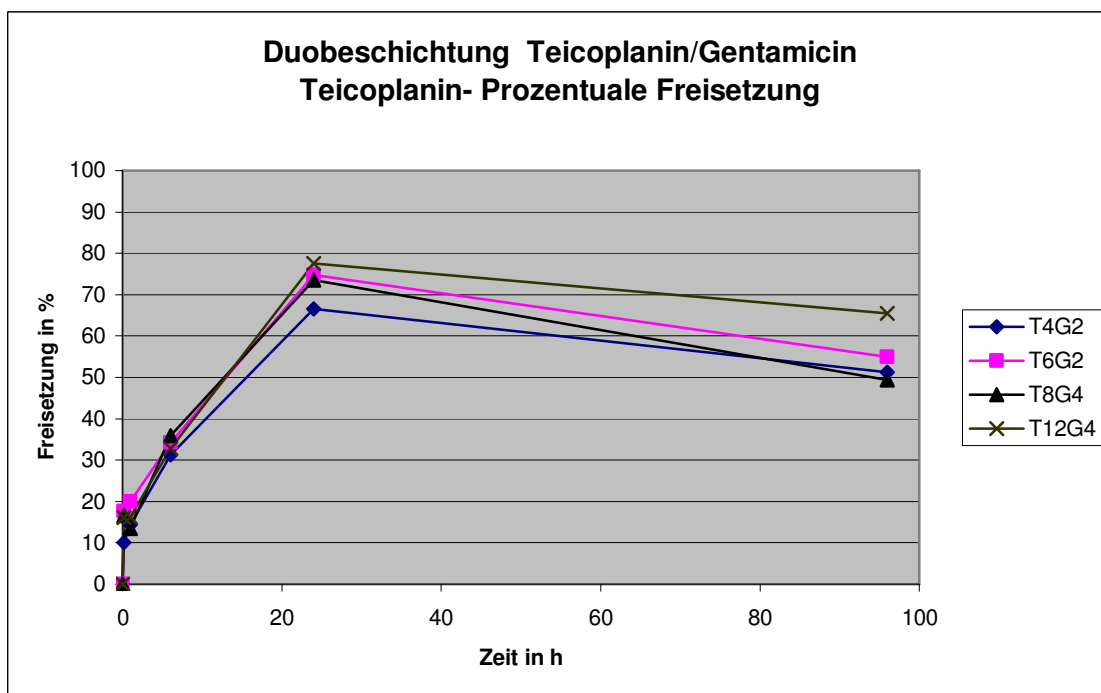


Abbildung 31: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung von Teicoplanin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.2.7 Gegenüberstellung Gentamicinfreisetzung Monobeschichtung vs Duobeschichtung

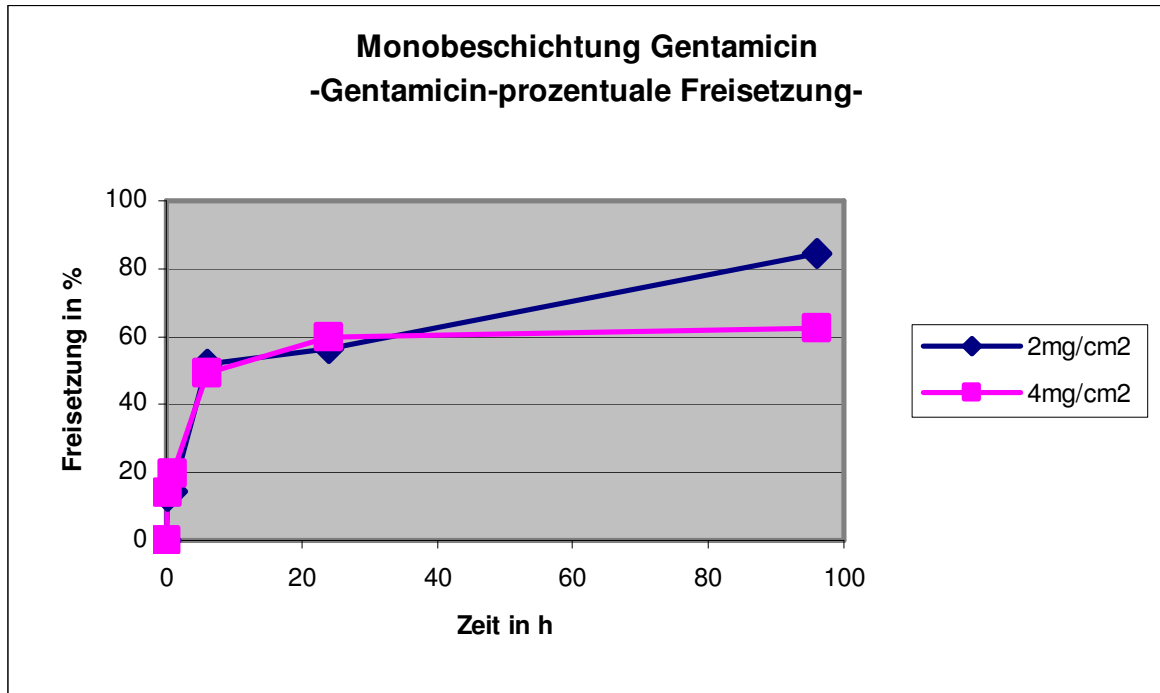


Abbildung 32: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung von Gentamicin aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

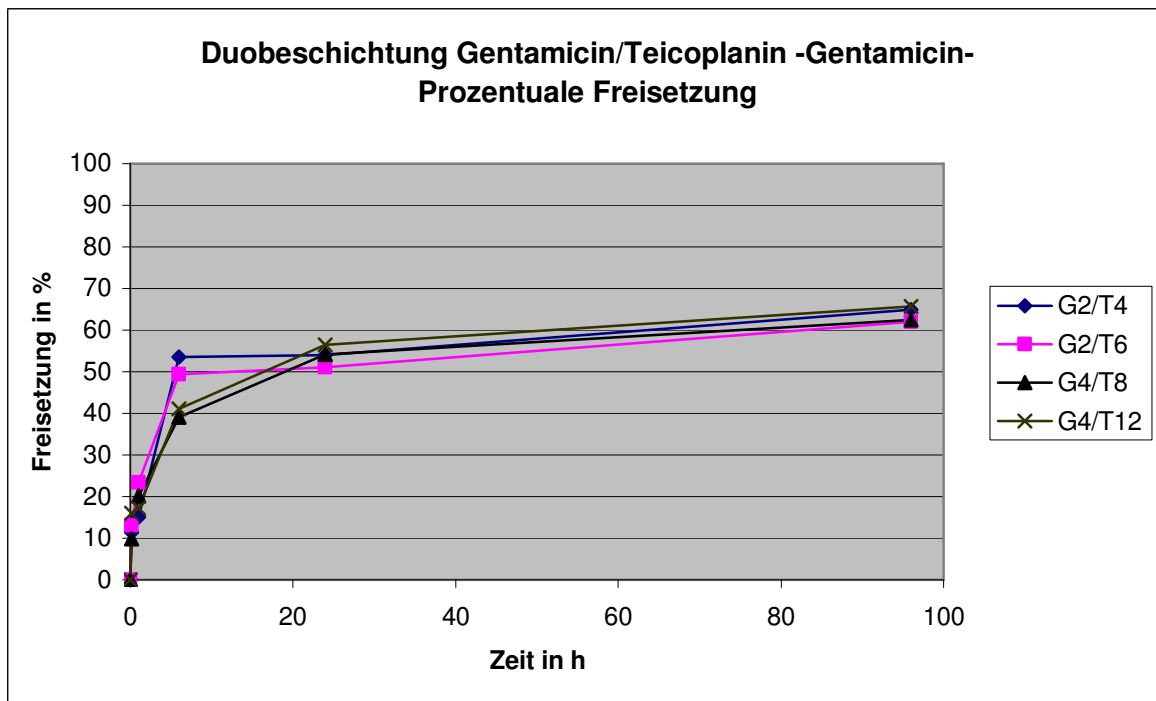


Abbildung 33: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung von Gentamicin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

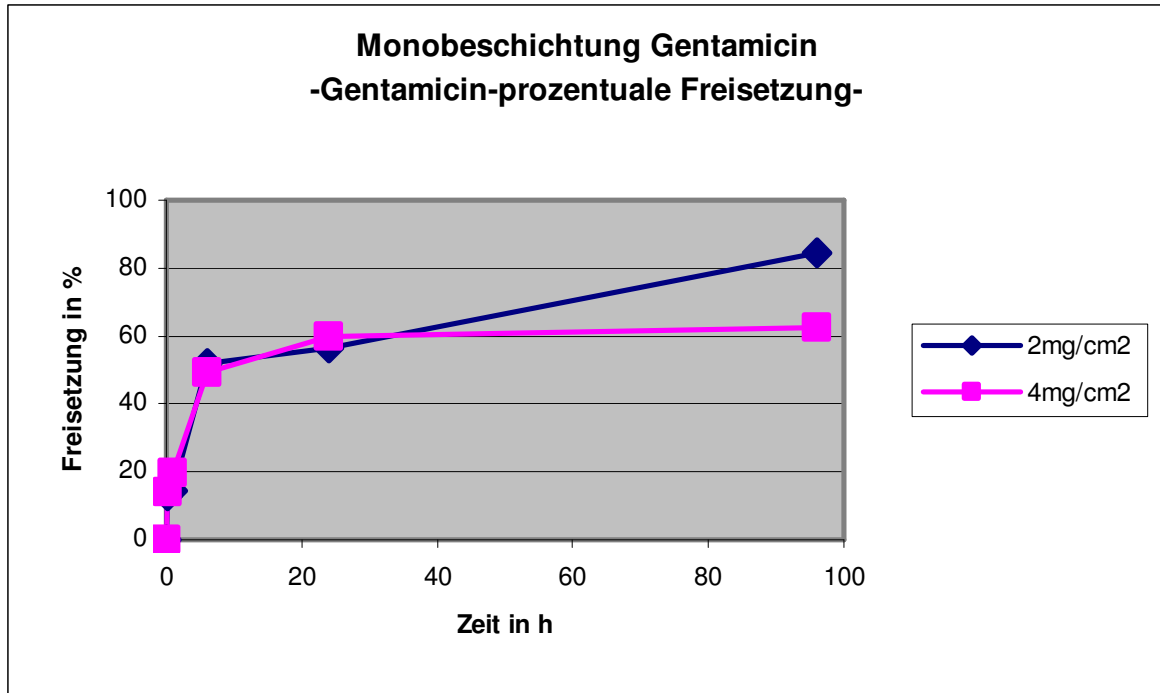


Abbildung 34: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung von Gentamicin aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

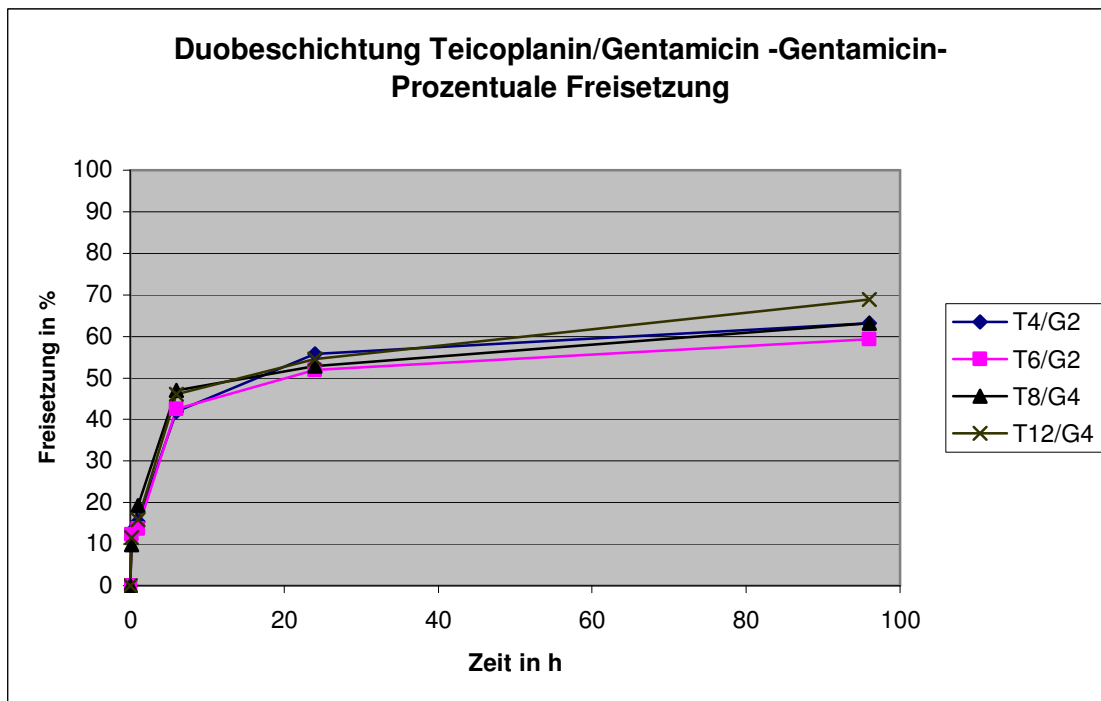


Abbildung 35: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung von Gentamicin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.2.8 Gegenüberstellung Teicoplaninfreisetzung Monobeschichtung vs Duobeschichtung

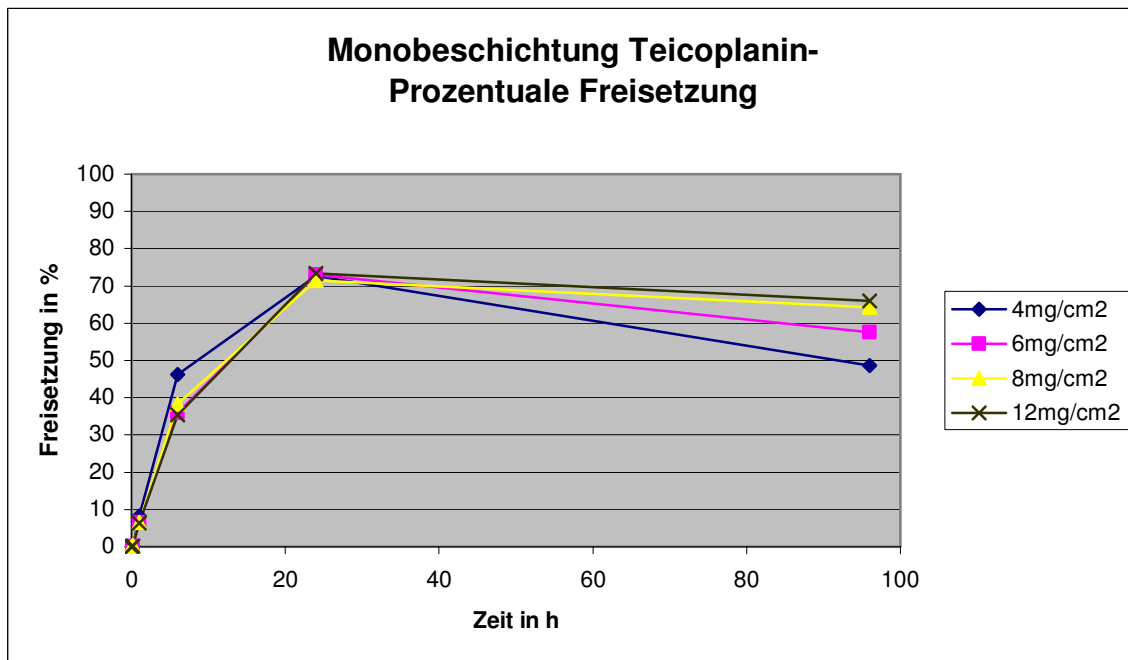


Abbildung 36: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung von Teicoplanin aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

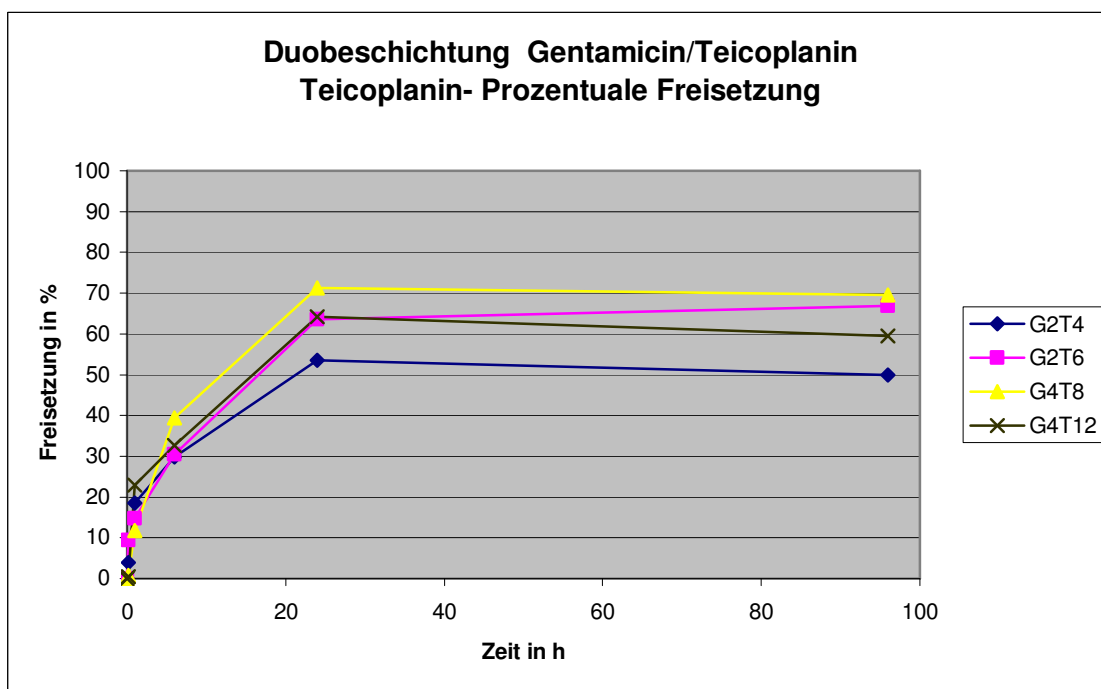


Abbildung 37: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung von Teicoplanin aus PGA-Filzen, Prozentuale Freisetzung

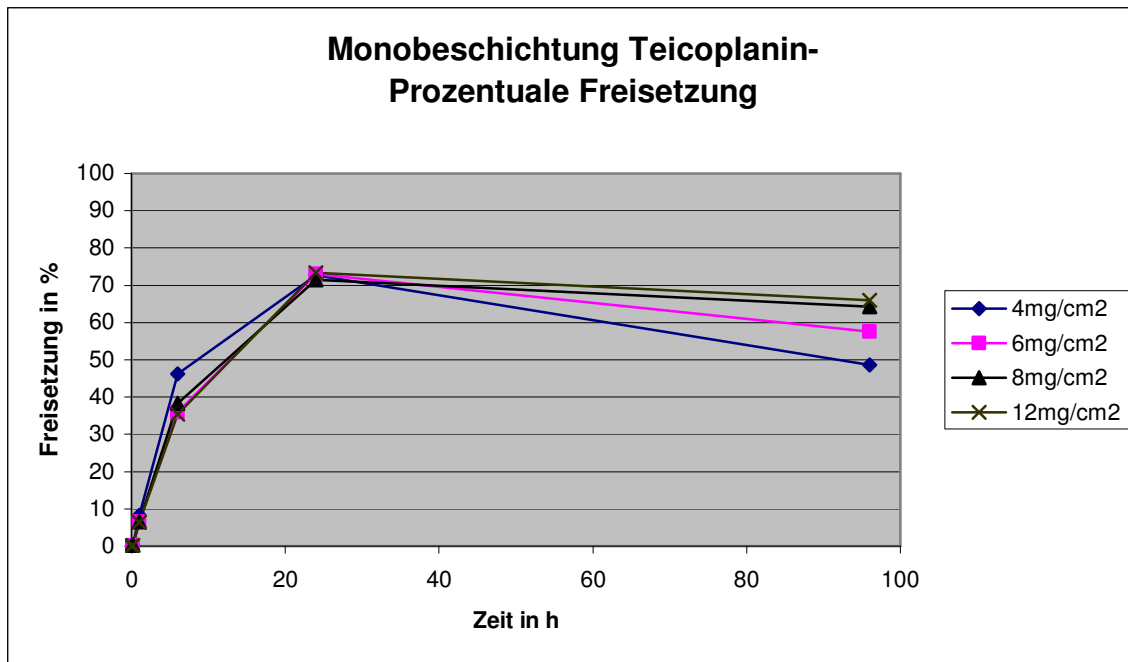


Abbildung 38: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung von Teicoplanin aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

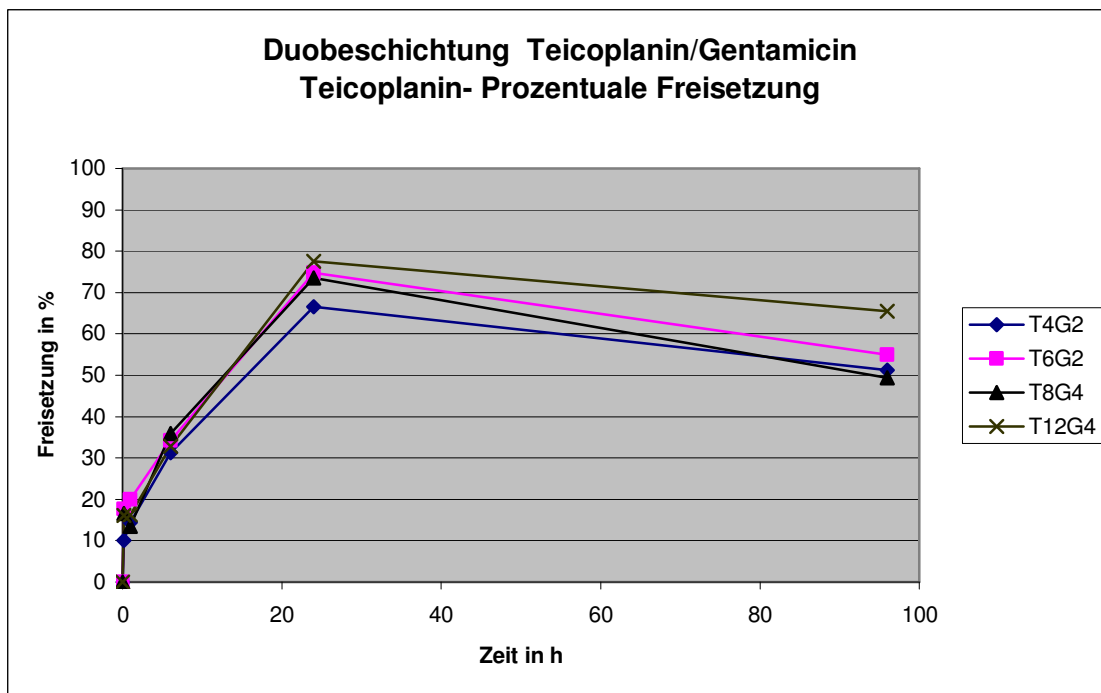


Abbildung 39: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung von Teicoplanin aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

3.2.3 Antibiotikaelution aus mit PDLLA-beschichteten PGA-Filzen

Um die Verwendung von PGA- Filzen in Kombination mit PDLLA als „drug delivery system“ zu testen, wurden 28 handelsübliche PGA- Filze mit R203 und Gentamicin in unterschiedlichen Konzentrationen beschichtet.

Die Gruppen zeigt folgende Tabelle:

Gruppe	Konzentration R203	Konzentration Gentamicin	Lösungsmittel
1:	33,3 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
2:	33,3 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat
3:	16,67 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
4:	16,67 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat

Tabelle 6: Übersicht der Gruppeneinteilung von mit Gentamicin und PDLLA- beschichteten PGA-Filzen

3.2.3.1 Gentamicin-Bestimmung

Gruppe 1	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
33 mg/ml R203 3,3 mg/ml Genta						
Mittelwert	0	25,27	26,5	26,43	26,41	22,06
Stabw	0	5,56	6,37	6,01	5,69	4,88
Freistz in %	0	63,17	66,24	66,09	66,01	55,16

Gruppe 2	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
33 mg/ml R203 1,67 mg/ml Genta						
Mittelwert	0	13,14	13,38	13,24	13,66	9,98
Stabw	0	3,47	3,59	3,82	3,54	2,82
Freistz in %	0	65,71	66,91	66,18	68,31	49,9

Gruppe 3	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
16,67 mg/ml R203 1,67 mg/ml Genta						
Mittelwert	0	13,29	14,06	14,06	14,09	12,48
Stabw	0	2,78	3,23	3,09	3,15	2,29
Freistz in %	0	66,44	70,32	70,31	70,46	62,39

Gruppe 4	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
16,67 mg/ml R203 0,83 mg/ml Genta						
Mittelwert	0	7,22	7,32	7,26	7,05	5,28
Stabw	0	1,62	1,48	1,72	1,42	1,36
Freistz in %	0	72,17	73,17	72,57	70,49	52,83

Tabelle 7: Mittelwerte der Gentamicinfreisetzung aus PDLLA- beschichteten PGA- Filzen

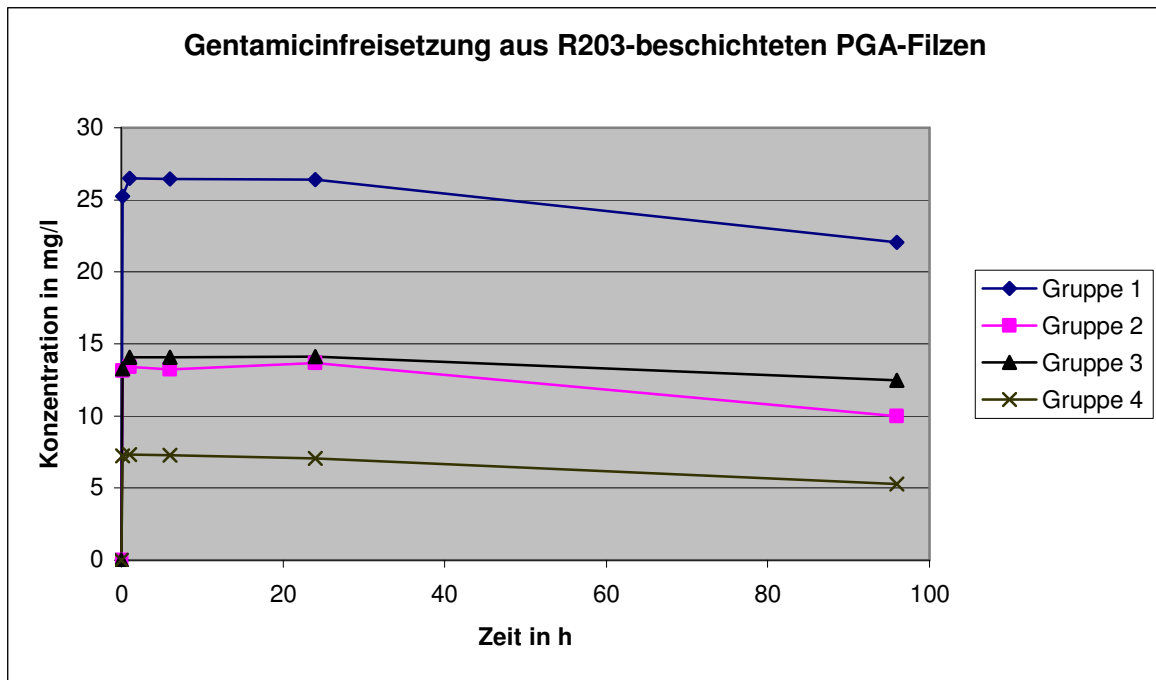


Abbildung 40: Bestimmung der Gentamicinspiegel aus mit R203- beschichteten PGA-Filzen, Absolutwerte

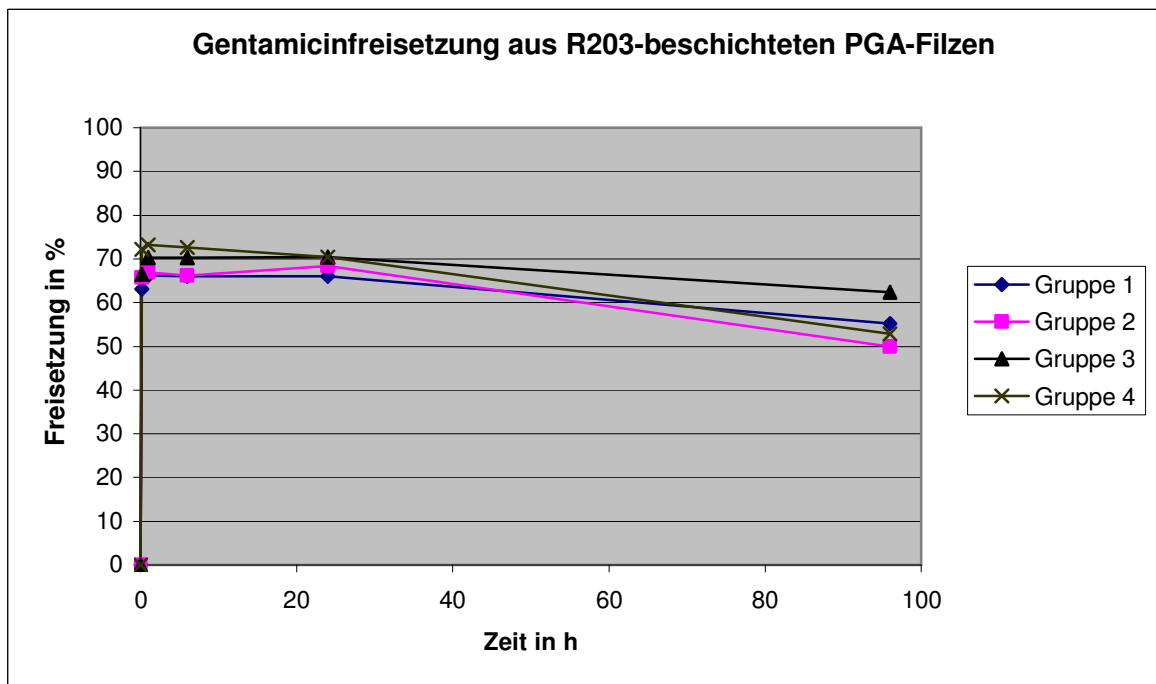


Abbildung 41: Bestimmung der Gentamicinspiegel aus mit R203- beschichteten PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Gruppe	Konzentration R203	Konzentration Gentamicin	Lösungsmittel
1:	33,3 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
2:	33,3 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat
3:	16,67 mg/ml	10% w/w	Ethylacetat
4:	16,67 mg/ml	5% w/w	Ethylacetat

3.3 Bakteriologische Untersuchungen

Die verschiedenen im Körper abbaubaren Polymere wurden hinsichtlich ihrer antiinfektiven sowie adhäsionsfördernden Eigenschaften untersucht. Um zu prüfen, ob ein Unterschied zwischen der Gesamtzahl der anhaftenden Bakterien und der Zahl der vermehrungsfähigen Keime besteht, wurden sowie anhaftende und vermehrungsfähige Keime bestimmt. Die Gesamtzahl der anhaftenden Bakterien wurde mittels radioaktiv-markierter Bakterien bestimmt. Die Anzahl der an den verschieden beschichteten Stahlplättchen anhaftenden wachstumsfähigen Bakterien wurde mittels Wachstumsversuch bestimmt. Diese Untersuchungen wurden sowohl für einen schleimbildenden als auch nicht-sleimbildenden Stamm von Staph. epidermidis getrennt durchgeführt. Die verschiedenen Versuchsgruppen zeigt folgende Tabelle:

Gruppe	Polymer	Konzentration	Lösungsmittel
1	Unbeschichtet		
2	R203	66 mg/ml	Ethylacetat
3	Poly(DTE) 0,26%	66 mg/ml	Chloroform
4	Poly(DTE) 5%	66 mg/ml	Chloroform

Tabelle 8: Die Versuchsgruppen des Wachstums- und Anhaftungsversuches, Untersuchungen an Stahlplättchen

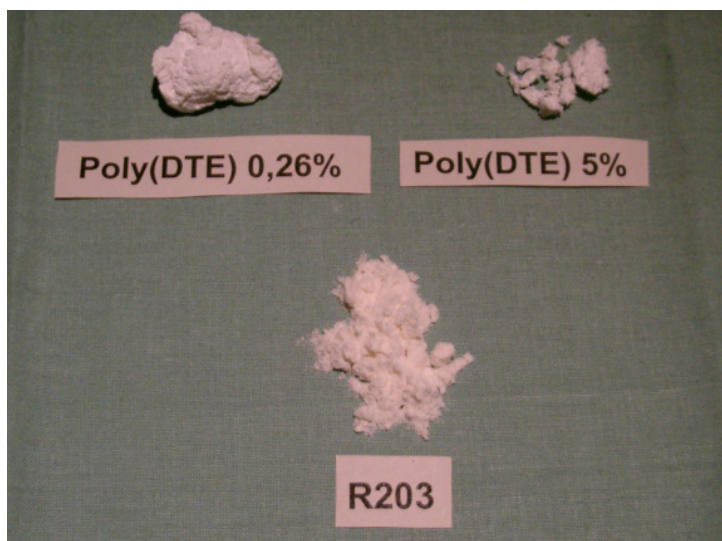


Abbildung 42: Die verwendeten Polymere Poly(DTE) 0,26%, Poly(DTE) 5% und R203

3.3.1 Bestimmung der bakteriellen Adhäsion mittels radioaktiver Markierung

Die Gesamtzahl der anhaftenden Bakterien wurde mittels radioaktiv-markierter Bakterien bestimmt. Die Messwerte der „counts per minute“ (cpm) sind hierbei direkt proportional zur Anzahl der am Implantat anhaftenden Bakterien.

Es wurden jeweils getrennte Betrachtungen der beiden Bakterienstämme vorgenommen. Für den nicht-schleimbildenden Stamm konnte unter den einzelnen Gruppen lediglich für die Gruppe 4 (Poly-DTE 5%) eine signifikant höher Anhaftung von Bakterien gegenüber den anderen Versuchsgruppen festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Mittelwerte der mit PDLA (Gruppe 2) und mit Poly-DTE 0,26% (Gruppe 3) beschichteten Gruppen zeigen eine nicht signifikante höhere Anhaftung.

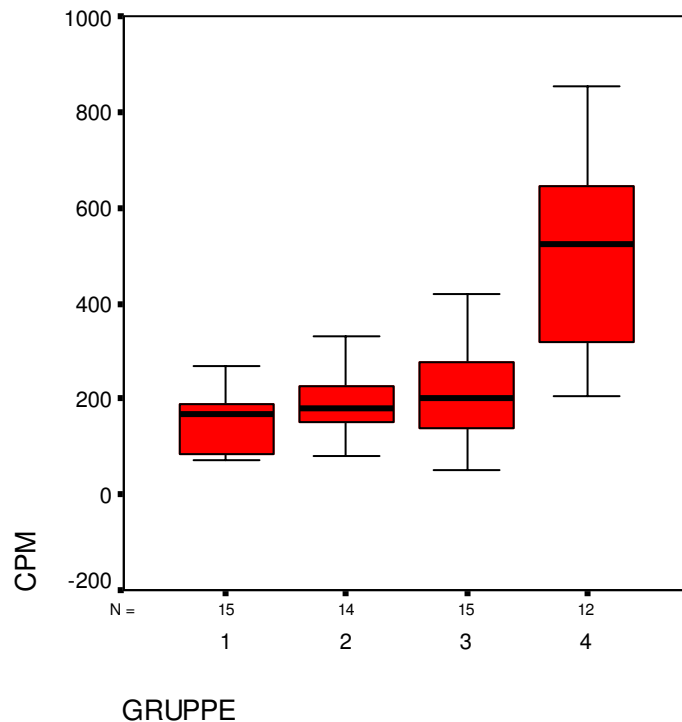


Abbildung 43: Anhaftung von radioaktiv markierten Staph. epidemidis (SE 11, nicht-schleimbildend) in Abhängigkeit von der Beschichtung an Stahlplättchen

Gruppe 1: Stahlplättchen unbeschichtet

Gruppe 2: Stahlplättchen beschichtet mit PDLA

Gruppe 3: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 0,26%

Gruppe 4: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 5%

Für den schleimbildenden Stamm konnte zwischen den unbeschichteten Proben (Gruppe1) und den mit PDLLA (Gruppe 2) bzw. Poly-DTE 0,26% (Gruppe3) beschichteten Proben eine signifikant geringe Anhaftung für die beschichteten beiden Gruppen gezeigt werden, im Gegensatz zu den mit Poly-DTE 5% beschichteten Proben, bei denen eine zu allen Gruppen signifikant höhere Anhaftung nachweisbar war ($p < 0.05$). Zwischen den mit PDLLA (Gruppe 2) und mit Poly-DTE 0,26% (Gruppe 3) beschichteten Proben konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

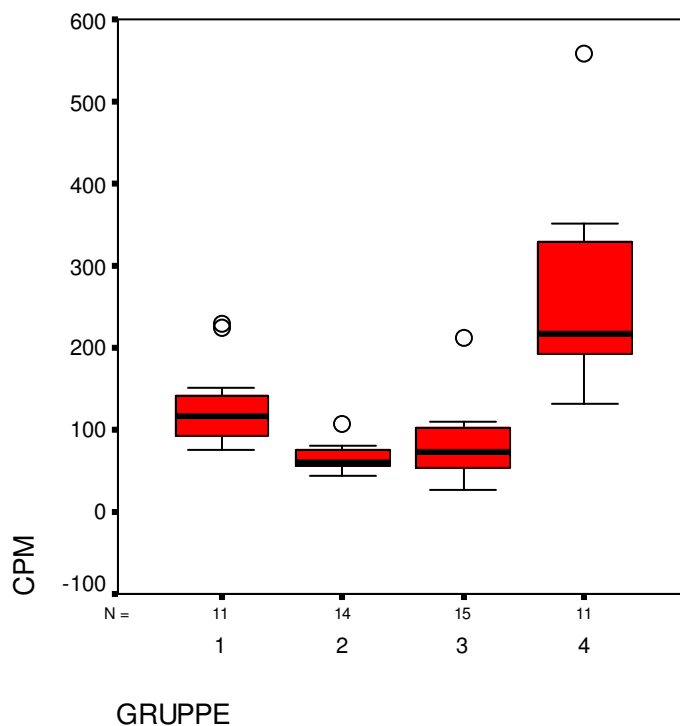


Abbildung 44: Anhaftung von radioaktiv markierten Staph. epidemidis (SE 183, schleimbildend) in Abhängigkeit von der Beschichtung an Stahlplättchen

Gruppe 1: Stahlplättchen unbeschichtet

Gruppe 2: Stahlplättchen beschichtet mit PDLLA

Gruppe 3: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 0,26%

Gruppe 4: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 5%

3.3.2 Bestimmung der Anzahl der anhaftenden vermehrungsfähigen Bakterien

Die Anzahl der an den verschiedenen beschichteten Plättchen anhaftenden wachstumsfähigen Bakterien wurde mittels Wachstumsversuch bestimmt. Dabei werden die Ergebnisse in Kolonie-bildende-Einheiten (KBE) dargestellt. KBE stellen somit die Anzahl der an den Implantaten anhaftenden vermehrungsfähigen Keime dar. Für die folgenden Untersuchungen wurden sowohl ein schleimbildender und nicht-sleimbildender Bakterienstamm verwendet. Für den nicht-sleimbildenden Stamm (SE 11-) konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden: die unbeschichteten Proben zeigten gegenüber den beschichteten Proben, unabhängig vom Polymer eine signifikant höhere Anhaftung vermehrungsfähiger Keime ($p < 0,05$). Zwischen den Proben der beschichteten Gruppen zeigten sich signifikant höhere Werte an KBE für die mit Poly-DTE 5% (Gruppe 4) beschichteten Proben im Vergleich zu den mit PDLLA (Gruppe 2) und Poly-DTE 0,26% (Gruppe 3) beschichteten Proben ($p < 0,05$), wohingegen sich die Gruppen mit der PDLLA (Gruppe 2) und Poly-DTE 0,26% (Gruppe 3) Beschichtung nicht signifikant unterschieden.

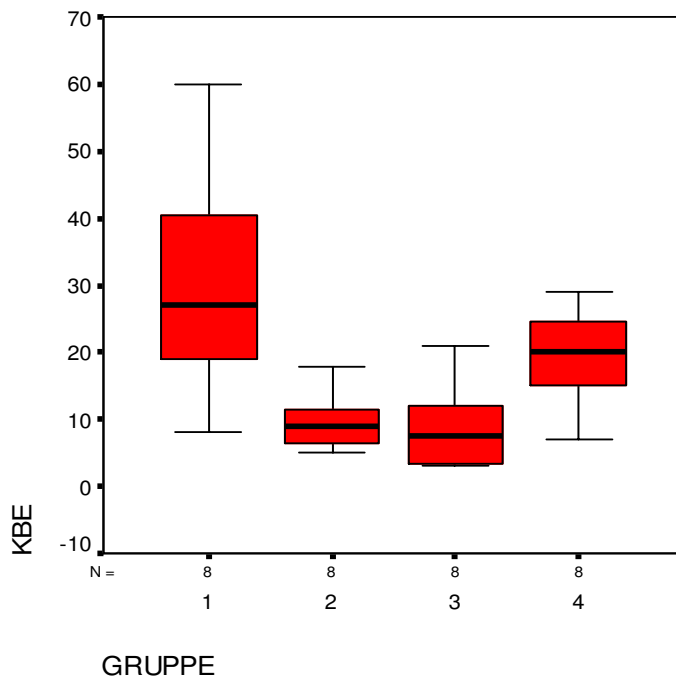


Abbildung 45: Anzahl KBE von Staph. epidermidis (SE 11, nicht-sleimbildend) in Abhängigkeit von der Beschichtung an Stahlplättchen

Gruppe 1: Stahlplättchen unbeschichtet

Gruppe 2: Stahlplättchen beschichtet mit PDLLA

Gruppe 3: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 0,26%

Gruppe 4: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 5%

Für den schleimbildenden Stamm (SE 3+) konnten nach Kontakt mit den blanken Stahlplättchen bzw. den beschichteten Plättchen folgende Ergebnisse beobachtet werden: die unbeschichteten Proben zeigten gegenüber allen anderen Proben eine signifikant höhere Anhaftung vermehrungsfähiger Keime ($p < 0,05$). Zwischen den beschichteten Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl vermehrungsfähiger Keime festgestellt werden, jedoch zeigt sich hier auch der Trend, dass die mit Poly-DTE 5% beschichteten Proben eine etwa doppelt bis dreifach so hohen Wert an KBE zeigen als die mit PDLLA und Poly-DTE 0,26% beschichteten Proben.

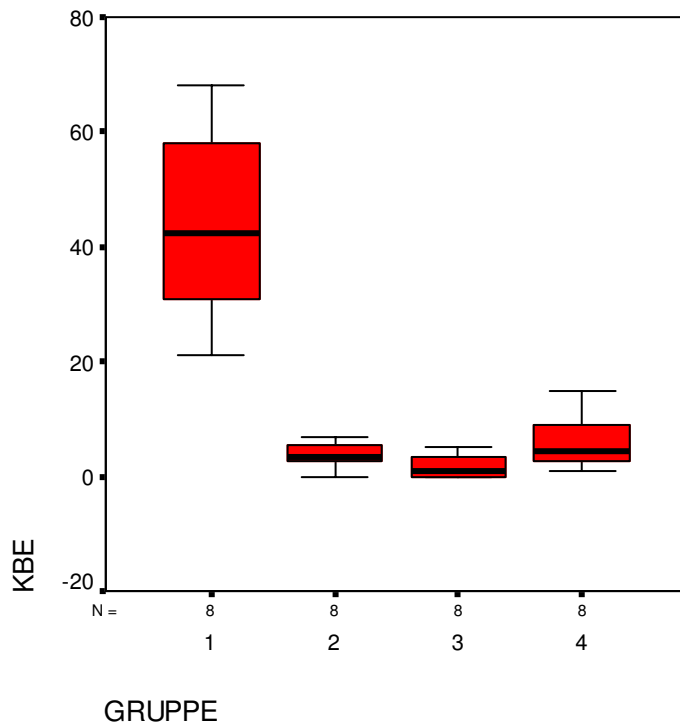


Abbildung 46: Anzahl KBE von Staph. epidermidis (SE 183, schleimbildend) in Abhängigkeit von der Beschichtung an Stahlplättchen

Gruppe 1: Stahlplättchen unbeschichtet

Gruppe 2: Stahlplättchen beschichtet mit PDLLA

Gruppe 3: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 0,26%

Gruppe 4: Stahlplättchen beschichtet mit Poly-DTE 5%

4 Diskussion

Biomaterialien verursachen bei ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung im menschlichen Körper auch heute noch Probleme. Zum einen ist die Biokompatibilität also die Verträglichkeit im Körper immer noch nicht zufrieden stellend gelöst. Von großer Bedeutung ist zum anderen, dass Biomaterialien das Auftreten schwer behandelbarer Infektionen, den sog. Implantat- assoziierten Infektionen begünstigen. Daher ist man auf der Suche nach neuen Materialien und Techniken zur Beschichtung bewährter Biomaterialien, um einen weitgehend sicheren Einsatz im Menschen zu gewährleisten. Maximale Anforderungen an Biomaterialien sind eine gute Gewebeverträglichkeit, vollständiger Abbau im Körper bei gleichzeitiger mechanischer Stabilität und fehlender Toxizität. Zudem kann es von Vorteil sein, wenn durch einen Überzug (Coating) und gleichzeitiger Beimischung von Arzneimitteln ein nur lokal wirkendes „drug delivery system“ entsteht. Eine systemische Belastung ist somit nicht gegeben. Die Freisetzung des Arzneimittels erfolgt je nach Art des Polymers entsprechend durch hydrolytische bzw. enzymatische Spaltung des Polymers. Eine genaue Kenntnis der Stabilität der Trägersubstanz sowie der Freisetzungskinetik der Arzneimittel ist Voraussetzung für den Einsatz am Menschen.

Probleme der Biomaterialien im Körper werden durch Bakterien verursacht. Biomaterialien können die Anhaftung von Bakterien begünstigen und in der Folge schwer beherrschbare Infektionen auslösen. Eine der ersten Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigte, war die von Elek und Conen aus dem Jahre 1957. Sie konnten eine signifikante Reduzierung der „minimum pustule forming dose“, also der mindestens benötigten Keimzahl *in vivo* nachweisen, die notwendig ist, eine Infektion auszulösen (Elek et al. 1957, S.582). Viele Bakterien sind in der Lage, nach der Adhäsion an Biomaterialien einen Biofilm auszubilden, der sie nicht nur vor der körpereigenen Immunabwehr schützt, sondern darüber hinaus eine erhöhte Resistenz gegenüber systemisch verabreichten Antibiotika verleiht (Costerton et al. 1995, S. 711; Donlan 2001, S.99; Olson et al. 2002). Sogar hohe Gewebekonzentrationen an Antibiotika, die weit über der „Minimalen Hemmkonzentration“ (MHK) für planktonische Bakterien liegen, reichen oft nicht für eine vollständige Eradikation von Bakterien, die sich innerhalb eines Biofilms befinden (Daroiche 1994, S.722; Dunne 1993, S.2522). Nach dem Einbringen in den Körper werden Biomaterialien von einer Proteinschicht aus Fibrinogen, Fibronectin, Albumin u.a. überzogen (Habash et al. 1999, S. 887f.; Gristina 1994, S. 109; von Eiff et al. 1998, S. 5). Dieser Film bietet den Bakterien ein biologisches Substrat, an das sie mittels eigener Proteine anhaften können. Sowohl Bakterien als auch körpereigene Zellen wetteifern um die Kolonisation des Implantats, was von Gristina et al. als „race for the

surface“ bezeichnet wurde (Gristina et al. 1994, S. 107). Ist die Oberfläche erst einmal bakteriell besiedelt, stellt die Eliminierung der Bakterien ein großes Problem dar. Rezidivierende Infektionen bis hin zur Sepsis, sowie eine ungenügende Gewebeintegration sind die Folgen (De Lalla 1999, S. 440). Gelingt die Sanierung trotz des Einsatzes moderner Antibiotika und intensiver chirurgischer Intervention nicht, bleibt oft als letzter Ausweg die Entfernung des Implantats bzw. die Amputation. Daher sollte das Augenmerk auf die Prävention der bakteriellen Kolonisation gerichtet werden. Eine viel versprechende Alternative zeigt sich in der Beschichtung der Implantate mit biodegradierbaren und biokompatiblen Substanzen, wie z.B. den resorbierbaren Polymeren.

Das bereits in der Einleitung erwähnte Poly D,L- Milchsäure- Polymer bietet die Möglichkeit einer einfachen und kostengünstigen Beschichtung von Implantaten, unabhängig davon, ob es sich um metallische Implantate oder Kunststoffe handelt, mit einer glatten oder porösen Oberfläche. Der Abbau dieser Polymere in vivo erfolgt durch Hydrolyse über mehrere Monate hinweg, abhängig von Molekulargewicht und der Masse des Polymers. Weiterhin wurde für PDLA eine gute Gewebeverträglichkeit nachgewiesen, da das Polymer durch die hydrolytische Spaltung am Ende des Abbaus in Milchsäure gespalten wird, die im Zitratzyklus verstoffwechselt wird. Darüberhinaus besitzt eine PDLA-Beschichtung von Implantaten eine hohe mechanische Stabilität, der Einsatz für orthopädische und unfallchirurgische Implantate ist somit möglich (Gollwitzer 2001).

Durch eine Kombination mit Arzneimitteln ist ein Arzneimittelträgersystem, ein sog. „drug delivery system“ herzustellen. Die Arzneimittel werden nach Kontakt mit Körperflüssigkeiten und während der hydrolytischen Spaltung von PDLA kontinuierlich freigesetzt. Durch die ausschließlich lokale Freisetzung und der geringen Menge kommt es bei geringer Rate an Nebenwirkungen nicht zu einer systemischen Belastung mit dem Arzneimittel. Allerdings können durch das Arzneimittelträgersystem um das Implantat herum ausreichend hohe Konzentrationen des Wirkstoffes erzielt werden. Diese Kombination aus hohen lokalen Wirkspiegeln bei gleichzeitiger minimaler systemischer Belastung ist besonders bei der systemischen Langzeitbehandlung mit sonst toxischen und mit vielen und schwerwiegenden Nebenwirkungen behafteten Substanzen wünschenswert.

Bei dem Poly(DTE)- Polymer handelt es sich um eine neue Klasse biodegradierbarer Polymere, den sog. „Pseudo“-Polyaminosäuren. Mit diesen Verbindungen können ebenso wie mit dem PDLA- Polymer Implantate aus Metall oder Kunststoff beschichtet werden, die notwendige Biokompatibilität dieser Verbindungen konnte nachgewiesen werden (Ertel et al. 1994, S. 919f; Choueka et al. 1996, S. 39). Jedoch ist die Festigkeit der Poly(DTE) geringer

im Vergleich zu den PLLA-Beschichtungen (Gollwitzer 2001). Poly(DTE) wird ebenso wie PDLLA hydrolytisch gespalten. Jedoch besitzen die „Pseudo“- Polyaminosäuren zwei hydrolytisch spaltbare Bindungen, eine sogenannte Karbonat- und eine Esterbindung, beide verantwortlich für die Degradationsraten des Polymers. Untersuchungen von Tangpasuthadol et al. konnten den Einfluss der Länge der gebundenen Ester auf die Hydrolyseraten des Polymers zeigen, wobei ein kurzkettiger Ester (so wie im vorliegenden Fall des Poly(DTE) ein Ethylester) nicht nur einen vereinfachten Einstrom von Wasser in das Molekül, sondern auch eine bessere Knocheneinheilung (aufgrund von Ca-Chelat-Bildung) ermöglicht. Die Art der entstehenden Abbauprodukte hängt davon ab, ob die Karbonat- oder die Esterbindung gespalten wird, wodurch bei bevorzugter Spaltung der Karbonatbindung ein Abbau der Masse erfolgt (Tangpasuthadol et al. 2000, S. 2371; James et al. 1999, S. 2203ff.). Durch Pegylierung, also durch Einbau von Polyethylenglykol (PEG) des Poly(DTE) scheint eine weitere Regulation des Polymers bezüglich der Anhaftungsfähigkeit von Proteinen gegeben zu sein (Tziampazis et al. 2000, S. 517).

Wie bereits oben erwähnt, ist die Verhinderung der bakteriellen Kolonisation eines Implantats oberstes Ziel. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Polymere bezüglich ihrer bakteriostatischen bzw. bakteriziden Wirkung miteinander verglichen. Weiterhin wurde durch Beimischung von Antibiotika zu PDLLA bzw. PGA ein „drug delivery system“ für die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten in der Medizin angedacht und die Freisetzungskinetik anhand verschiedener Antibiotika untersucht wurde.

4.1 Bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung der Polymere PLLA sowie Poly(DTE)

Es wurden drei verschiedene Polymere hinsichtlich der Anhaftungsfähigkeit und Vermehrungsfähigkeit von *Staphylococcus epidermidis* auf einem Modellbiomaterial wie Stahlplättchen untersucht. In der Literatur ist eine Vielzahl von Arbeiten zu finden, die sich entweder mit der Gesamtzahl der an einem Implantat anhaftenden Bakterien (Franson et al., 1984, S. 500; Barnes et al. 1999, S. 4543; Ahearn et al. 1995, S. 372; Carballo et al. 1991, S. 149) oder der Zahl der vermehrungsfähigen Keime beschäftigt (Schierholz et al. 2000, S. 45; McLean et al. 1993, S. 895; Kramer et al. 1981, S. 154). Die isolierte Betrachtung einer dieser Zahlen kann zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen, da aufgrund der Gesamtzahl der anhaftenden Bakterien nicht zwingend auf deren Vermehrungsfähigkeit

geschlossen werden kann. Kombiniert man beide Methoden, so erhält man wie diese Arbeit gezeigt hat aussagekräftigere Ergebnisse.

Die eingesetzten Polymere Poly-(DTE co 0.26% PEG 20K carbonate) und Poly-(DTE co 5% PEG 1K carbonate) gehören zu einer Gruppe von Tyrosin-abgeleiteten Polykarbonaten. Diese tragen einen als Ester gebundenen Alkylrest, der es erlaubt, die Eigenschaften des Polymers, wie z.B. die biologischen Wechselwirkungen mit Zellen und Gewebe oder ihre Abbaueigenschaften zu verändern. In den vorliegenden Polymeren besteht die Alkylester-Bindung aus Ethylester, das in der Literatur als geeignete Substanz für orthopädische Implantate beschrieben ist (Pulapura et al. 1992, S.411ff). Die Identifizierung dieser Polymere erfolgte nach dem Verfahren der sog. „kombinatorischen Chemie“ (nach Kohn).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass Bakterien nach radioaktiver Markierung signifikant besser an den PDLLA- sowie Poly-DTE-beschichteten Proben anhaften. Dies gilt für schleimbildende als auch für nicht-schleimbildende Bakterien. Der Grund hierfür könnte in der veränderten Oberflächenbeschaffenheit der beschichteten Implantate liegen. Da beispielsweise beim Lösen der Poly-DTE 5% eine äußerst viskose Lösung entsteht und die konsekutive Beschichtungsschicht sehr unregelmäßig und mit vielen Ecken und Kanten („clots“) versehen ist, bietet sich den Bakterien eine dementsprechend größere Angriffsfläche zur Besiedelung. Da einer der wichtigsten Voraussetzungen für die bakterielle Adhäsion an abiotischen Oberflächen deren Oberflächenbeschaffenheit darstellt (Bollen et al. 1997, S. 258; Quiryne 1994, S.13; Drake et al. 1999, S.226), beeinflussen die Beschichtungen damit auch die Anhaftung der Bakterien. Für die mit PDLLA und Poly-DTE 0,26% beschichteten Proben konnte für den schleimbildenden Stamm eine signifikant geringere Anhaftung, für den nicht-schleimbildenden Stamm kein signifikanter Unterschied zu den unbeschichteten Proben gefunden werden. Da es noch eine Vielzahl anderer Faktoren gibt, die für die initiale Adhäsion verantwortlich sind, wie beispielsweise die Oberflächenmembranproteine der Bakterien oder die an der Oberfläche des Implantats adsorbierten Proteine, kann für die geringere Anhaftung nur eine behindernde Wechselwirkung zwischen der Membran der Bakterien und den Beschichtungen vermutet werden, deren genauer Mechanismus unbekannt ist.

Betrachtet man jedoch die Vermehrungsfähigkeit der anhaftenden Keime, so wurde bei allen beschichteten Proben eine signifikante Verringerung der KBE beobachtet. Im Vergleich zu den unbeschichteten Implantaten konnte sowohl für alle Beschichtungen als auch für die verschiedenen Keime eine signifikante Reduktion der KBE beobachtet werden. Allerdings

ergaben sich wiederum Unterschiede hinsichtlich der schleimbildenden und nicht-schleimbildenden Stämme. Bei dem nicht-schleimbildenden Stamm konnte für alle beschichteten Proben eine signifikante Reduzierung gegenüber den unbeschichteten Implantaten gezeigt werden. Darüberhinaus konnte zwischen den mit PDLLA und Poly-DTE 0,26% einerseits und den mit Poly-DTE 5% beschichteten Proben andererseits eine weitere signifikante Reduzierung der KBE beobachtet werden. Jedoch lag die Verminderung für die PDLLA und die Poly-DTE 0,26% Beschichtung nur bei etwa 30% der KBE der unbeschichteten Proben. Bei der Betrachtung des schleimbildenden Stammes ist diese Reduzierung deutlicher ausgeprägt, so dass nur noch etwa 10 % der KBE auf den beschichteten Implantaten nachweisbar waren. Bei der mit Poly-DTE 0,26% beschichteten Gruppe war die Zahl der KBE insgesamt etwas geringer als bei den mit PDLLA-beschichteten Proben, jedoch war kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Da bei Bakterien eine Verminderung der vermehrungsfähigen Keime um den Faktor 10 in vivo meist unzureichend ist, sollte der kombinatorische Einsatz von Arzneimitteln (z.B. Antibiotika oder Antiseptika) in Betracht gezogen werden, um die Effektivität des Systems zu erhöhen.

So zeigten Gollwitzer et al., dass der zusätzliche Einsatz von PDLLA mit Gentamicin bzw. Teicoplanin oder deren Kombination zu einer weiteren Reduzierung der Vermehrungsfähigkeit von Staphylokokken führt (Gollwitzer 2001). Doch ebenso die Art des verwendeten Keims ist maßgeblich an den Ergebnissen beteiligt. So konnte in den vorliegenden Versuchen nachgewiesen werden, dass der schleimbildende Stamm von *Staph. epidermidis* durch die Beschichtung mit Polymeren stärker gehemmt wurde als der nicht-schleimbildende Stamm. Der Mechanismus für die Hemmung ist immer noch unbekannt und wird gegenwärtig erforscht.

Es ist zu beachten, dass alle Untersuchungen zur Adhäsion und Vermehrungsfähigkeit von *Staph. epidermidis* in vitro Versuche darstellen, die in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt wurden, so dass über die Wirkung in vivo, sowie der Interaktion mit Blutbestandteilen und Plasmaproteinen keine verbindlichen Aussagen getroffen werden können. Es ist bekannt, dass die Anhaftung von Bakterien u.a. abhängig von den am Implantat anhaftenden Proteinen ist, dem sog. „conditioning film“, für die einige Bakterienstämme passende Oberflächenproteine an ihrer Membran tragen. Über die Wirkung dieses „conditioning film“ sind unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Adhäsionsförderung beschrieben (Muller et al 1991, S.3325; Hermann et al. 1988, S. 697).

Ein weiterer Angriffspunkt zur Hemmung des Wachstums und der Ausbreitung von Bakterien stellt das o.g. „Quorum sensing“- System dar. Dieses Kommunikationssystem zwischen

Bakterien beeinflusst deren Fähigkeit zur Biofilmbildung und damit auch deren Virulenz (Sircilli et al. 2004, S. 2329). Diese ist unter anderem abhängig von umgebenden Faktoren, wie Untersuchungen an Staphylokokken gezeigt haben. So können sowohl Biofilmbildung als auch Virulenz unter der Kontrolle ein und desselben Regulatorgens (hier: accessory regulator gene, „agr“) stehen, das in Abhängigkeit der umgebenden Faktoren die verschiedenen Eigenschaften und Krankheitsbilder (wie z.B. Abszesse, Endokarditiden etc.) der Bakterien beeinflussen kann (Yarwood et al. 2003, S. 1622f). Die Überträgerstoffe variieren unter den Bakterienstämmen, jedoch können auch innerhalb eines Stammes aufgrund Mutationen verschiedene Variationen der Überträgersubstanzen gefunden werden (Yarwood et al., 2004, S.1838). Dieses „Quorum sensing“- System ist nicht nur auf Prokaryonten beschränkt, sondern auch in Eukaryonten nachweisbar. So sind bsp. für *Candida albicans* Tyrosol als „quorum sensing“-Molekül identifiziert worden (Chen et al. 2004, S. 5048 ff.). Humanes Atemwegsendothel besitzt die Potenz, das „quorum sensing“-Signal von *Pseudomonas aeruginosa* zu inaktivieren, beschädigtes Endothel verliert diese Eigenschaft (Chun et al. 2004, 3587ff.). Damit besitzt ein gesunder Organismus offensichtlich ausreichend Abwehrmechanismen zur Bekämpfung von Bakterien inklusive der Inhibierung des „quorum sensing“- Systems. Sobald jedoch Fremdmaterial in einen Organismus gebracht wird, entsteht dort ein hochentzündliches und immunsuprimiertes lokales Milieu, die die Bakterienbesiedlung erleichtert. Da die Biofilmbildung insbesondere für Implantat-assoziierte Infektion eine große Bedeutung hat, besteht in einer Hemmung derselben durch Blockade des „Quorum sensing“-Systems und damit der Biofilmbildung auf Implantaten eine hoffnungsvolle Möglichkeit zur Reduktion derartiger Infektionen. Optimalerweise sollten Implantate bereits mit diesen Substanzen beschichtet sein, um somit dieselben prophylaktisch vor Bakterienbesiedelung zu schützen. Durch die Kombination mit bsp. einem Polylaktid wie dem PDLA zur protrahierten Freisetzung der Substanzen wäre daher sinnvoll und empfehlenswert. Erste eigene Vorversuche konnten bereits eine Hemmung der Ausbreitung von *Pseudomonas aeruginosa* auf Kulturschalen zeigen. Weitere Erkenntnisse sowie deren klinische Relevanz werden die nächsten Jahre mit sich bringen.

4.2 Antibiotika- Elutionen

Durch die homogene Einarbeitung von Antibiotika in die PDLA-Beschichtung entsteht ein „drug delivery system“, aus dem das Arzneimittel mittels Diffusion freigesetzt wird (Heller

1996, S.353). Der Abbau der PDLLA-Beschichtung erfolgt hauptsächlich durch „bulk degradation“, die Freisetzung des Antibiotikums aus der Beschichtung durch Diffusion. Damit wird das Arzneimittel abhängig von der Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung sowie der Gesamtmenge des Polymers in die Umgebung abgegeben. Die Gesamtmenge an Polymer und Antibiotikum lässt sich leicht bei der Herstellung der Proben variieren, so dass ein geeignetes Verhältnis zwischen lokaler Freisetzung des Antibiotikums und geringen systemischen Spiegeln erreicht werden kann. Die Abbaugeschwindigkeit ist von Faktoren wie Art des Gewebes, Durchblutung, Temperatur u.a. abhängig. Für die Ermittlung der optimalen Beschichtungsmenge sind somit all die eben genannten Faktoren wie selbstverständlich auch der Erregertyp zu berücksichtigen. Um systemische Nebenwirkungen aber auch lokale Gewebereizungen zu vermeiden, muss jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Arzneimittels die eingesetzte Menge in geeignetem Verhältnis zu dessen Toxizität gesetzt werden.

Die Einarbeitung von Antibiotika als Arzneimittel in die PDLLA-Beschichtung hat eine große Bedeutung, um Biomaterialien mit einer antiinfektiösen Schutzschicht auszurüsten. Immer noch stellen Infektionen eine der schwerwiegendsten Komplikationen beim Einsatz von Biomaterialien dar. Durch eben diese Beschichtung ist es möglich, eine wirkungsvolle bzw. in Kenntnis des zu behandelnden Keimes eine gezielte, mit geringen systemischen Nebenwirkungen behaftete Prophylaxe zu erzielen.

4.2.1 Antibiotika- Elution aus PGA-Filzen

Wurden PGA-Filze direkt mit Gentamicin beschichtet, so zeigt sich eine nur sehr geringe retardierte Freisetzung der Antibiotika von der Oberfläche des Polymers, so dass selbst zwischen den Zeitpunkten 24h und 96h noch ein Anstieg der Gentamicinspiegel, unabhängig der eingearbeiteten Gesamtmenge beobachtet werden konnte. Bei den Zweifach-Beschichtungen machte es keinen Unterschied, ob die Proben erst mit Gentamicin und anschließend Teicoplanin bzw. erst mit Teicoplanin und anschließend mit Gentamicin beschichtet wurden. Die Gentamicinfreisetzung war nahezu identisch. Somit kann durch die Kombination der beiden Antibiotika keine Retardierung der Freisetzung mit den PGA-Filzen erreicht werden. Insgesamt werden etwa 60% der Gesamtmenge an aufgetragenem Antibiotikum innerhalb der ersten 24h freigesetzt, was von Vorteil ist, da die Infektionsgefahr in den ersten 24h nach Implantation am höchsten ist. Somit ist in dieser Zeit durch die kontinuierliche Arzneimittelfreisetzung ein Schutz gegenüber Keimen gewährleistet. Auch die

Tatsache, dass durch Variation der Menge der aufgetragenen Antibiotika die Gewebsspiegel in gleichem Maße gesteuert werden können, ist ein weiterer Vorteil.

Bei der Freisetzung des Teicoplanins aus PGA-Filzen stellt sich der Sachverhalt ähnlich dar. Hier werden innerhalb der ersten 24h etwa 70% der Gesamtmenge an Teicoplanin freigegeben. Auch hier macht es keinen Unterschied, ob die Proben in den Zweifachbeschichtungen erst mit Gentamicin bzw. erst mit Teicoplanin beschichtet wurden. Auffällig einzig war die Tatsache, dass bei Direktbeschichtung des Teicoplanin mit dem PGA-Filz (also bei Einfachbeschichtung mit Teicoplanin bzw. bei Zweifachbeschichtung die Teicoplanin/Gentamicin-Beschichtung) nach 96 h ein Abfall der Teicoplaninkonzentration um etwa 15% festzustellen war. Schwabe konnte dies zurückführen auf eine Instabilität des Teicoplanins im Laufe von 4 Tagen (Schwabe, Jürgen. Unveröffentlichte Daten).

Bei Verwendung von Kollagenen als Träger konnten bei der Duobeschichtung für beide Antibiotika eine Retardierung festgestellt werden (Bolkart, 1994, S.47ff).

4.2.2 Antibiotika- Elution aus mit PDLLA-beschichteten PGA-Filzen

Bei der Elution von Gentamicin aus PDLLA-beschichteten PGA-Filzen zeigt sich bereits nach 10 min ein steiler Anstieg der Gentamicin-Konzentration, der nach 1 Stunde nur noch unwesentlich ansteigt. Hierbei werden bereits etwa 65% der Gesamtmenge an eingearbeiteten Gentamicins freigesetzt. Dieser hohe Anteil an freigesetztem Arzneimittel ist im Wesentlichen auf die Struktur des PGA-Filzes zurückzuführen. Durch die netzartige Struktur entsteht eine, im Verhältnis zum Volumen betrachtet, große Oberfläche, die eine schnelle Freisetzung des Gentamicins ermöglicht. Jedoch lässt sich nach 96h ein Abfall der Gentamicin-Konzentration beobachten, was auf eine Zersetzung des Gentamicins bzw. eine Ausfällung aufgrund der sich in wässriger Lösung zersetzenden Polymere schließen lässt. Der Anteil der frei werdenden Gentamicinmenge ist vergleichbar mit dem der unbeschichteten PGA-Filze, jedoch wird der Anteil bei letzteren erst nach 96h erreicht.

4.2.3 Antibiotika- Elution aus PDLLA-beschichteten Stahldrähten

Bei der Elution von Gentamicin aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten zeigt sich ein anfänglicher Peak nach 10 min, bei dem bereits 34% der Gesamtmenge an Gentamicin freigesetzt wurde. In den darauffolgenden 96 Stunden werden kontinuierlich weitere 9,6% an

Gentamicin an die Umgebung abgegeben. Der anfängliche Peak lässt sich dadurch erklären, dass sowohl einige „clots“, als auch frei an der Oberfläche gebunden Partikel des Antibiotikums nicht aus dem Polymer diffundieren müssen, sondern lediglich ausgewaschen werden. Diese „clots“ bestehen aus Polymerisaten aus Polymer und Arzneimittel, die durch Tropfenbildung während des Beschichtungsvorganges entstehen, und nach dem Trocknen locker an der Oberfläche der Drähte haften. Betrachtet man die einzelnen Proben, so lässt sich ein Unterschied zwischen der prozentualen Freisetzung feststellen. Dies liegt daran, dass bei der Beschichtung unterschiedliche Mengen an „clots“ an den einzelnen Implantaten haften. Die nach diesem Peak freigesetzte Menge ist abhängig von der Abbaugeschwindigkeit der PDLLA-Beschichtung und bei allen Proben nahezu identisch.

Der große Vorteil der PDLLA-Beschichtung liegt in der Möglichkeit, Arzneimittel in eine mechanisch stabile und damit für die Beschichtung von Biomaterialien geeignete Matrix einzuarbeiten. Nahezu alle Gruppen von Arzneimitteln wie insbesondere Antibiotika und Gerinnungshemmer sind dafür geeignet. Der Abbau des PDLLA und somit die Freisetzung des Arzneimittels findet protrahiert und lokal statt. Somit wird direkt nach dem Einbringen eines beschichteten Implantates in dessen unmittelbarer Umgebung ein wirkungsvoller Arzneimittelspiegel erreicht, der eine bakterielle Besiedelung des Implantates erschwert. Mit dem Implantat eingebrachte Bakterien sind nicht in der Lage, sich auf dem Implantat anzusiedeln. Dies konnten Rössner et al. wirkungsvoll an Kaninchen demonstrieren (Rössner 2004). Durch die anschließende über mehrere Wochen dauernde kontinuierliche Freisetzung an Antibiotikum in unmittelbarer Umgebung des Implantats wird ebenso eine spätere Besiedelung wirkungsvoll verhindert. Gerade perioperativ, wenn das Immunsystem des Patienten angeschlagen ist, benötigt er eine Infektionsprophylaxe, wobei gerade die lokale Gabe durch ein „drug delivery system“ eine sinnvolle Ergänzung zur systemischen Verabreichung darstellt. Es bleibt zu hoffen, dass dadurch eine Vielzahl von Implantat-assoziierten Infektionen und Erkrankungen, die nicht selten mit dem Tode des Patienten enden, verhindert werden können.

5 Zusammenfassung

Implantat-assoziierte Infektionen sind gefürchtete Komplikationen, da diese in hohem Maße zum Verlust des Implantates führen können verbunden mit lebensbedrohenden Problemen. Um dies zu verhindern wurden in den letzten Jahren fortwährend neue Materialien entwickelt. Ziel dieser Arbeit war es, durch Beschichtung von Implantaten mit im Körper abbaubaren Polymeren als Träger für Antibiotika wie z.B. Gentamicin und Teicoplanin ein „drug delivery system“ zu entwickeln. Hierdurch gelingt die anti-infektiöse Ausrüstung der Implantate. Als Polymere wurden zum einen das Poly-D,L-Laktid, zum anderen verschiedene Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester verwendet. Es wurden Wirkspiegel in vitro bestimmt, sowie Untersuchungen zur Anhaftung und Vermehrungsfähigkeit von Keimen durchgeführt. Dabei wurde zum einen die bakterielle Anhaftung mittels radioaktiver Markierung mit Tritium-markierten-Thymidin, zum anderen die Vermehrungsfähigkeit der Keime in vitro untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Anhaftung der Bakterien durch die reine Beschichtung von Kirschnerdrähten mit den untersuchten Polymeren bereits ohne Antibiotika eine signifikante Reduktion der KBE erzielt werden konnte.

Weiterhin wurde durch Beimischung von Antibiotika zu den Polymeren und der nachfolgenden Beschichtung von Biomaterialien wie Kirschnerdrähten und PGA-Filzen ein „drug delivery system“ entwickelt, mit dem Ziel, diese Implantate beim Einbau in lebende Organismen vor Infektionen zu schützen und damit lebensbedrohliche Zustände vermeiden zu können.

Durch Kombination der Antibiotika mit dem Polymer R203 konnte bei Beschichtung von Kirschnerdrähten nach bereits 10 Minuten eine Freisetzung von etwa 34% der eingearbeiteten Antibiotikamenge nachgewiesen werden, welche im Laufe von 96 Stunden auf 44% stieg. Bei den Monobeschichtungen von PGA-Filze zeigte sich sowohl für Gentamicin als auch für Teicoplanin nach 6 Stunden eine hohe prozentuale Freisetzung von 30-50% der Medikamente. Somit ist der Beweis erbracht, dass die bei einem Einbringen der Systeme in lebende Organismen notwendigen hohen lokalen Wirkspiegel um das Implantat herum erreicht werden können.

Durch Beschichtung von PGA-Filzen mit der Kombination Gentamicin und Arzneistoffträger mit dem Polymer R203 konnte den Kirschnerdrähten vergleichbare Freisetzungskinetik ermittelt werden. Auch hier sind hohe Wirkspiegel über mindestens 48 Stunden nachweisbar, womit akute perioperative Infektionen wirkungsvoll verhindert werden könnten.

Somit zeigen sich in der Entwicklung von „drug delivery systems“ bestehend aus beschichteten Biomaterialien mit dem Polymer R203 alleine oder in der Kombination mit Antibiotika wie dem Gentamicin oder Teicoplanin eine sichere und wirkungsvolle Therapiekonzeption als Ergänzung zur Vermeidung von Infektionen bei der Verwendung von prothetischem Material.

6 Literaturverzeichnis

Ahearn, D.G., May, L.L. & Gabriel, M.M. (1995). Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 372-6

Ahlborg HG, Josefsson PO. Pin-tract complications in external fixation of fractures of the distal radius. *Acta Orthop Scand* 1999 Apr;70(2):116-8

Anderson JM, Gibbons DF, Martin RL, Hiltner A, Woods R. The potential for poly-alpha-amino acids as biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1974;8(3):197-207

Anderson JM, Spilizewski KL, Hiltner A. (1985). Poly- α amino acids as biomedical polymers. In *Biocompatibility of Tissue Analogs*, D. F. Williams, ed CRC Press, Boca Raton, FL, S. 67-88.

Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. & Chamberlain, A.H. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4543-8.

Benger JR, Kelly AJ, Winson IG. Does early wound infection after elective orthopaedic surgery lead on to chronic sepsis? *J R Coll Surg Edinb* 1998 Feb;43(1):43-4

Bengston, S. & Knutson, K. (1991). The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 62, 301-11.

Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* 1997 Jul;20(3-4):291-303

Bolkart, B. Teicoplanin-Gentamicin-Kollagen als Retardsystem für die lokale Antibiotikatherapie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der LMU-München. 1994

Bollen, C.M., Lambrechts, P. & Quirynen, M. (1997). Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dental Materials* 13, 258-69.

Botte M., Davis J., Rose B., von Schroeder H., Gellman H., Zinberg E., Abrams R. Complications of Smooth Pin Fixation of Fractures and Dislocations in the Hand and Wrist. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 276 (1992), 194-201

Bunt, T.J. (2001). Vascular graft infection: an update. *Cardiovascular Surgery* 9, 225-33

Carballo, J.C., Ferreira, M. & Criado, M.T. (1991). Importance of experimental design in the evaluation of the influence of proteins in bacterial adherence to polymers. *Medical Microbiology and Immunology* 180, 149-55.

Chen H, Fukita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6; 101 (14): 5048-52

Choueka J, Charvet JL, Koval KJ, Alexander H, James KS, Hooper KA, Kohn J. Canine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid). *J Biomed Mater Res* 1996 May;31(1):35-41

Christensen G, Baddour L, Hasty D, Lowrance J, Simpson W. *Microbial and Foreign Body Factors in the Pathogenesis of Medical Device Infections*. Edited by A. L. Bisno and F. A. Waldvogel. 1989 American Society for Microbiology, Washington DC 20006

Chun CK, Ozer EA, Welsh MH, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9; 101 (10) : 3587-90

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45

Crane, G. M., Ishaug, S. L., Mikos, A. G., Bone Tissue Engineering. *Nat. Med.* 1 (1995) 1322-1324

Darouiche, R.O., Dhir, A., Miller, A.J., Landon, G.C., Raad, I.I. & Musher, D.M. (1994). Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *The Journal of Infectious Diseases* 170, 720-3.

Davies DG; Parsek MR; Pearson JP; Iglewski BH; Costerton JW; Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998 Apr 10; 280(5361):295-8

De Kievit TR; Gillis R; Marx S; Brown C; Iglewski BH. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 2001 Apr; 67(4): 1865-73

De Lalla, F. (1999). Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications. *Journal of Chemotherapy* 11, 440-5

Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 2001 Jun 14;411(6839):813-7. Comment in: *Nature*. 2001 Jun 14;411(6839):748-9.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):167-93

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 Sep;8(9):881-90

Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2001 Jan-Feb;47(1):99

Drake, D.R., Paul, J. & Keller, J.C. (1999). Primary bacterial colonization of implant surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 14, 226-32.

Dunne, W.M. Jr., Mason, E.O. Jr. & Kaplan, S.L. (1993). Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2522-6.

- Elek S.D., Conen P.E. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man: a study of the problems of wound infection. *Br. J. Exp. Pathology*, 38 (1957), 573-586
- Ertel SI, Kohn J. 1994. Evaluation of a series of tyrosine- derived polycarbonates for biomedical applications. *J. Biomed Mater. Res.* 28: 919-930.
- Garberina, M.J., Fitch, R.D., Hoffmann, E.D., Hardaker, W.T., Vail, T.P. & Scully, S.P. (2001). Knee arthrodesis with circular external fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 382, 168-78.
- Garric X, Moles JP, Garreau H, Braud C, Guilhou JJ, Vert M. Growth of various cell types in the presence of lactic and glycolic acids: the adverse effect of glycolic acid released from PLAGA copolymer on keratinocyte proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13(11):1189-201
- Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001 Jul 26;412(6845):442-5 Comment in: *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):772.
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjelleberg S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling *J Bacteriol* 1996 Nov;178(22):6618-22
- Gollwitzer H, Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der TU-München. 2001.
- Gotschlich A, Huber B, Geisenberger O, Togl A, Steidle A, Riedel K, Hill P, Tummler B, Vandamme P, Middleton B, Camara M, Williams P, Hardman A, Eberl L. Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Syst Appl Microbiol* 2001 Apr;24(1):1-14
- Green S. A. (1983). Complications of external skeletal fixation. *Clin Orthop* 1983 Nov;(180):109-16
- Gristina AG. Implantat Failure and the Immuno-Incompetent Fibro-Inflammatory Zone. *Clinical Orthopaedics and Related Reseach* (1994) 298, 106-118
- Gristina, A G. Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration. *Science* (1987)237: 1588-1595
- Gristina, A.G., Naylor, P.T. & Myrvik, Q.N. (1991). Mechanisms of musculoskeletal sepsis. *The Orthopedic Clinics of North America* 22, 363-71.
- Habash, M. & Reid, G. (1999). Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *Journal of Clinical Pharmacology* 39, 887-98.
- Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K, Fischer JH, Wagner M, Kruger G, Wintermantel E, Gerlach KL. Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials*. 2001 Sep;22(17):2371-81.

- Heller, J. Drug delivery systems. In: "Biomaterials Science", Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (Hrsg), Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, 1996, 346-356
- Herbert, C.K., Williams, R.E., Levy, R.S. & Barrack, R.L. (1996). Cost of treating an infected total knee replacement. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 331, 140-5
- Hermann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew DP, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel FA. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.*, 158 (1988), 693-701
- Herrmann, R., Schmidmaier, G., Märkl B., Resch A., Hähnel I., Stemberger A., Alt E. Antithrombogenic Coating of Stents using a Biodegradable Drug Delivery Technology. *Thromb Haemost* 1999; 82: 51-7
- Holtom PD, Obuch AB, Ahlmann ER, Shepherd LE, Patzakis MJ. Mucormycosis of the tibia: a case report and review of the literature. *Clin Orthop* 2000 Dec;(381):222-8
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S, Eberl L. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 2001 Sep;147(Pt 9):2517-28
- Inman R., Gallegos K., Barry B., Redecha P., Charles C. (1984). Clinical and Microbial Features of Prosthetic Joint Infection. *The American Journal of Medicine* 77, 47-53
- Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002 Jan;184(1):290-301
- James K, Levene H, Parsons JR, Kohn J. Small changes in polymer chemistry have a large effect on the bone-implant interface: evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects. *Biomaterials* 1999 Dec;20(23-24):2203-12
- Johnson G, Lee D, Regelman W, Gray E, Peters G, Quie P. Interference with Granulocyte Function by *Staphylococcus epidermidis* Slime. *Infection and Immunity* 54, (1986) 13-20
- Karchmer A., Bisno A. Infections of Prosthetic Heart Valves and Vascular Grafts. Infections Associated with Indwelling Medical Devices. Edited by A. L. Bisno and F. A. Waldvogel. 1989 American Society for Microbiology, Washington DC 20006
- Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* 2002 Jun;5(3):254-8
- Kramer, S.J., Spadaro, J.A. & Webster, D.A. (1981). Antibacterial and osteoinductive properties of demineralized bone matrix treated with silver. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 161, 154-62.
- Kramthoft, M., Bodtger, S. & Carlsen, A. (1994). Outcome of infected total knee arthroplasty. *Journal of Arthroplasty* 9, 617-21.

- Kuchma SL, O'Toole GA. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 2000 Oct;11(5):429-33
- Li YH; Tang N; Aspiras MB; Lau PC; Lee JH; Ellen RP; Cvitkovitch DG. A quorum-sensing signalling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2002 May;184(10):2699-708
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001 Jan;9(1):34-9 Comment in: *Trends Microbiol.* 2001 May;9(5):204.
- Mahan J, Seligson D, Henry SL, Hynes P, Dobbins J. Factors in pin tract infections. *Orthopedics* 1991 Mar;14(3):305-8
- Manefield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 1999 Feb;145 (Pt 2):283-91
- McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Höök M. Characterisation of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 247, 416-424 (1997).
- McLean, R.J., Hussain, A.A., Sayer, M., Vincent, P.J., Hughes, D.J. & Smith, T.J. (1993). Antibacterial activity of multilayer silver-copper surface films on catheter material. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 895-9.
- Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, Vaudaux P. Role of *staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995 Dec; 63 (12): 4738-43
- Muller E, Takeda S, Goldmann DA, Pier GB. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect Immun* 1991 Sep;59(9):3323-6
- Nasser, S. (1994). The incidence of sepsis after total hip replacement arthroplasty. *Seminars in Arthroplasty* 5, 153-59
- O'Brien, T. & Collin, J. (1992). Prosthetic vascular graft infections. *The British Journal of Surgery* 79, 1262-7
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002 Apr;66(2):86-92
- Palma M, Wade D, Flock M, Flock JI. Multiple Binding Sites in the Interaction between an Extracellular Fibrinogen-binding Protein from *Staphylococcus aureus* and Fibrinogen. (1998) *The Journal of Biological Chemistry*, 273, No21, 131177-13181
- Parenteau, *Scientific American*, April 1999, (4), S.221f.
- Parkins MD; Ceri H; Storey DG. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* 2001 Jun;40(5):1215-26

Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8789-8793

Pascual A, Tsukayama D, Wicklund B, Bechthold J, Merritt K, Peterson P, Gustilo R. The Effect of Stainless Steel, Cobalt-Chromium, Titanium Alloy, and Titanium on the Respiratory Burst Activity of Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1992 July 280, 281-287

Pei L, Palma M, Nilsson M, Guss B, Flock JI. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1999 Sep; 67(9): 4525-30

Peters, G., Gray, E.D. & Johnson, G.M. (1989). Immunomodulating properties of extracellular slime substance. In *Infections associated with indwelling medical devices*, (Bisno, A.L. & Waldvogel, F.A., Eds), pp. 61-74. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Peters, G., Locci, R. & Pulverer, G. (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *The Journal of Infectious Diseases* 146, 479-82.

Pulapura S, Kohn J. Tyrosine-Derived Polycarbonates: Backbone-Modified "Pseudo"-Poly(Amino Acids) Designed for Biomedical Applications. *Biopolymers*, Vol 32, 411-417 (1992)

Quirynen, M. (1994). The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *Journal of Dentistry* 22, Suppl. 1, S13-6.

Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Hoiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 2001 Dec;147(Pt 12):3249-62

Riegels-Nielsen P., Espersen F., Rosenkrantz-Hölmich L., Frimodt-Møller N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. *Acta Orthop. Scand.*, 66 (1995), 69-72

Rössner, M. Induktion und Prophylaxe Implantat assoziierter Knocheninfektionen am Modell eines antiinfektiv beschichteten Marknagels- eine experimentelle Studie am Kaninchenmodell. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der LMU-München. 2004

Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994 Aug;19(2):231-43

Schembri MA, Givskov M, Klemm P. An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. *Sci STKE* 2002 May 14;2002(132):

Schierholz, J.M. & Beuth, J. (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *The Journal of Hospital Infection* 49, 87-93.

Schierholz, J.M., Fleck, C., Beuth, J. & Pulverer, G. (2000). The antimicrobial efficacy of a new central venous catheter with long-term broad-spectrum activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 45-50.

Schmidmaier G., Wildemann B, Bail H, Lucke M., Fuchs T., Stemberger A., Flyvbjerg A., Haas NP., Raschke M. Lokal Application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001 Apr; 28(4): 341-50

Shawn Lewenza, Barbara Conway, E. P. Greenberg, and Pamela A. Sokol Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologs CepRI *Journal of Bacteriology*, February 1999, p. 748-756, Vol. 181, No. 3

Sircilli MP, Walters M, Trabulsi LR, Sperandio V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect Immun.* 2004 Apr; 72 (4): 2329-37

Tangpasuthadol V, Pendharkar SM, Kohn J. Hydrolytic degradation of tyrosine-derived polycarbonates, a class of new biomaterials. Part I: study of model compounds. *Biomaterials* 2000 Dec;21(23):2371-8

Tziampazis E, Kohn J, Moghe PV. PEG-variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: model surfaces for controlled cell adhesion and migration. *Biomaterials* 2000 Mar;21(5):511-20

von Eiff, C., Heilmann, C. & Peters, G. (1998). New aspects on staphylococcal infections associated with orthopaedic implants. *Hip International* 8, 1-9.

Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI, Bycroft BW. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000 May 29;355(1397):667-80

Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 2004 Mar; 186 (6): 1838-50.

Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 2003 Dec, 112 (11). 1620- 5.

7 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Mittelalterliche Darstellung eines Soldaten mit Beinprothese

Abbildung 2: Hermann Staudinger (1881-1965), Nobelpreis für Chemie 1953
(<http://histoirechimie.free.fr/Lien/STAUDINGER.htm>)

Abbildung 3: Chemische Struktur der Monomere der Polyglycolsäure und Poly-L-Milchsäure

Abbildung 4: Grundgerüst der Tyrosin-abgeleiteten Polyiminocarbonate (R=NH) und Polycarbonate (R=O). Die Art der Endgruppen (X1 und X2) beeinflusst die mechanischen Eigenschaften des Polymers (nach Pulapura 1992, S.412).

Abbildung 5: Tyrosin (Tyr) mit seinen Derivaten Desaminotyrosin (Dat) und Tyramin (Tym).
Synthese von Dat, Tyr und Hexanol (Hex) zu DTH (Dat-Tyr-Hex) . Nach Pulapura 1992, S.415

Abbildung 6: Surface erosion und bulk degradation, vereinfachtes eigenes Schema

Abbildung 7: Prinzipien des Tissue engineering

Abbildung 8: Tissue engineering: Knorpelgewebe in Form eines menschlichen Ohres auf dem Rücken einer Maus

Abbildung 9: "drug delivery system", lokale Freisetzung eines Antibiotikum (AB) wird kombiniert mit systemischer Gabe (s. Legende), eigene Abbildung

Abbildung 10: Struktur des Gentamicin (www.medicine-worldwide.com)

Abbildung 11: Struktur des Teicoplanin (www.medicine-worldwide.com)

Abbildung 12: Sir Alexander Fleming (1881-1955), Nobelpreis für Physiologie und Medizin 1945
<http://www.herb.lsa.umich.edu/XML/Fleming.jpg>

Abbildung 13: Infizierte Pins bei externer Fixation
www.gentamed.com

Abbildung 14: Staph. aureus und Staph. epidermidis, die häufigsten Implantat- assoziierten Keime
(<http://www.uihealthcare.com> und Wilma Ziebuhr)

Abbildung 15: Biofilmbildung am Beispiel von *V. cholerae*, in Klammern die Mutanten, die entsprechenden Schritt nicht vollziehen können; MOT= Flagellar-Mutanten, MSHA= Mutanten Typ IV MSHA-Pili, EPS= Mutanten in der Synthese von Exopolysaccharide (nach Watnick et Kolter, 1999, S. 2677)

Abbildung 16: Biofilm von *Staphylococcus epidermidis*. Scanning-Elektronenmikroskopie. Gut zu erkennen ist der gerüstartige Aufbau des Biofilms, wodurch kanalartige Hohlräume

entstehen, die zur Versorgung der tiefergelegenen Bakterien notwendig sind (Mit freundlicher Genehmigung des Friedrich-Baur-Forschungsinstitutes für Biomaterialien der Universität Bayreuth).

Abbildung 17: Struktur der AHLs, die von *Serratia liquefaciens* produziert wurden und zwei Furanone, produziert von *Delisea pulchra*. Nach Givskov, 1997, S. 6619

Abbildung 18 Die Polymere in der Übersicht.

Abbildung 19: Gentamicin-Elution (kumulativ) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

Abbildung 20: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA- Filzen, Absolutwerte

Abbildung 21: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 22: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA- Filzen, Absolutwerte

Abbildung 23 Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

Abbildung 24 Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, Absolutwerte

Abbildung 25: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 26: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, Absolutwerte

Abbildung 27: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, Prozentuale Freisetzung

Abbildung 28: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, Absolutwerte

Abbildung 29: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 30: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, Absolutwerte

Abbildung 31: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 32: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 33: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 34: Monobeschichtung Gentamicin, Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA- Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 35: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Gentamicinspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 36: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

Abbildung 37: Duobeschichtung Gentamicin/ Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, Prozentuale Freisetzung

Abbildung 38: Monobeschichtung Teicoplanin, Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA- Filzen, Prozentuale Freisetzung

Abbildung 39: Duobeschichtung Teicoplanin/ Gentamicin- Bestimmung der Teicoplaninspiegel aus PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 40: Bestimmung der Gentamicinspiegel aus mit R203- beschichteten PGA-Filzen, Absolutwerte

Abbildung 41: Bestimmung der Gentamicinspiegel aus mit R203- beschichteten PGA-Filzen, prozentuale Freisetzung

Abbildung 42: Die verwendeten Polymere Poly(DTE) 0,26%, Poly(DTE) 5% und R203

Abbildung 43: Anhaftung von radioaktiv markierten Staph. epidemidis (SE 11) an Stahlplättchen

Abbildung 44: Anhaftung von radioaktiv markierten Staph. epidemidis (SE 183) an Stahlplättchen

Abbildung 45: Anzahl KBE von Staph. epidermidis (SE 11)

Abbildung 46: Anzahl KBE von Staph. epidermidis (SE 183)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen mit Angabe der Konzentrationen an R203, Gentamicin und des Lösungsmittels

Tabelle 2: Übersicht über die Antibiotika- Mono- und Duobeschichtungen: T= Teicoplanin, G= Gentamicin

Tabelle 3: Mittelwerte der Masse der aufgetragenen Beschichtungsmenge auf PGA-Filze

Tabelle 4: Freisetzung von Gentamicin (mg/l) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten in Abhängigkeit der Zeit

Tabelle 5: Übersicht über die Antibiotika- Mono- und Duobeschichtungen: T= Teicoplanin, G= Gentamicin

Tabelle 6: Übersicht der Gruppeneinteilung von mit Gentamicin und PDLLA- beschichteten PGA-Filzen

Tabelle 7: Mittelwerte der Gentamicinfreisetzung aus PDLLA- beschichteten PGA- Filzen

Tabelle 8: Die Versuchsgruppen des Wachstums- und Anhaftungsversuches

8 Abkürzungsverzeichnis

KBE	Kolonie bildenden Einheiten
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin resisteter Staphylococcus epidermidis
PBS-Puffer	“phosphate buffered saline”-Puffer
PDLLA	Poly-D,L-Laktid

9 Lebenslauf

Personalien:

Vor- und Zuname: Karim Ibrahim
Geburtstag: 20.08.1975
Geburtsort: Sulzbach-Rosenberg
Wohnort: 01277 Dresden, Ermelstr. 27
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/81 - 07/85 Pestalozzi-Grundschule in Sulzbach-Rosenberg
09/85 - 06/94 Herzog-Christian-August-Gymnasium in
Sulzbach-Rosenberg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

11/95 - 10/97 Studium der Medizin an der Universität in Regensburg
10/97 - 05/02 Studium der Medizin an der Technische Universität in
München
05/02 Abschluß: III. Staatsexamen
seit 04/03 Tätigkeit als AiP Medizinische Klinik II der TU-Dresden,
Abteilung Kardiologie (Frau Prof. Strasser)

Famulaturen:

03/98 Innere Medizin (Gastroenterologie und Tropenmedizin,
Prof. Hunter) Kairo, Ägypten
08/98 Pädiatrie Dr.-Cnopf-Kinderklinik Nürnberg
03/99 Dermatologie-Praxis (Dr. Ibrahim) Sulzbach-Rosenberg
08/99 Kardiologie (Prof.Niederer) Krankenhaus Barmherzige
Brüder Regensburg

PJ-Tertiale:

04/01 – 08/01 Neurologische Klinik der TU-München (Prof.Conrad)
08/01 – 12/01 Chirurgische Klinik Hospital Universitario Lozano Blesa
Zaragoza, Spanien
12/01 – 03/02 Innere Medizin Hospital Universitario Lozano Blesa

Zaragoza, Spanien

Ärztliche Tätigkeit:

04/03 – 09/04

AiP an der Technischen Universität Dresden,
Medizinische Klinik II, Kardiologie (Frau Prof. Strasser)

Seit 10/04

Assistenzarzt im Herzzentrum Dresden (Frau Prof.
Strasser)

Ersatzdienst:

08/94 - 09/95

Bayerisches Rotes Kreuz,
Zusatzausbildung Rettungssanitäter

Sprachen:

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (gute bis sehr gute Kenntnisse in Sprechen und
Verstehen)

Spanisch (gute Kenntnisse in Sprechen und Verstehen)

Publikationen:

“ACE-Inhibition suppresses angiotensin II- induced
chemokine expression by reduction of NF-kappaB
activity and downregulation of AT₁-receptors”
Poster on the 24th European Section Meeting of the
International Society for Heart Research, June 2-5, 2004
Dresden, Germany

10 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher, der es mir ermöglichte, am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung die vorliegende Dissertation durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger, meinem Doktorvater, für die ausgezeichnete und ausgesprochen kompetente Betreuung während der gesamten Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Ines Kappstein für die hilfreichen Ratschläge zur Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen. Mein besonderer Dank gebührt auch Frau Vicky Vatou und Frau Moussi Chihaja für die engagierte Unterstützung.

Ebenso danken möchte ich Frau Dipl.- math. Raymonde Busch für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt gebührt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, deren entgegengebrachte Geduld und Unterstützung ich hier nicht ausreichend würdigen kann.

Karim Ibrahim

Anhang- Rohdaten

Tabelle 1a: Mittelwerte der Masse der aufgetragenen Beschichtungsmenge auf PGA-Filze

**Tabelle 2a: Freisetzung von Gentamicin (mg/l) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten in
Abhängigkeit der Zeit**

Tabelle 3a: Mittelwerte der Gentamicin- Freisetzung aus mit PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten

Tabelle 4a: Gentamicin-Monobeschichtung von PGA-Filzen

Tabelle 5a: Teicoplanin-Monobeschichtung von PGA-Filzen

**Tabelle 6a: Gentamicin/ Teicoplanin- Duobeschichtung von PGA-Filzen; Bestimmung der
Gentamicinwerte**

**Tabelle 7a: Gentamicin/ Teicoplanin- Duobeschichtung von PGA-Filzen; Bestimmung der
Teicoplaninwerte**

**Tabelle 8a: Teicoplanin / Gentamicin- Duobeschichtung von PGA-Filzen; Bestimmung der
Gentamicinwerte**

**Tabelle 9a: Teicoplanin / Gentamicin- Duobeschichtung von PGA-Filzen; Bestimmung der
Teicoplaninwerte**

Abbildung 1a: Gentamicin-Elution (kumulativ) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

Abbildung 2a: Gentamicin-Elution (Einzelwerte) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

ProbenNr.	Masse (mg) vorher	Masse (mg) nachher	Differenz in mg
1	14,7	16,4	1,7
2	12,7	14,1	1,5
3	22,1	24,8	2,7
4	17,8	19,5	1,7
5	23,4	25,5	2,1
6	14,7	16,2	1,5
7	20,7	23,3	2,6
8	18,2	20,1	1,9
9	24,3	27,2	2,9
10	15,5	17,2	1,7
11	12,7	14,0	1,3
12	27,2	29,5	2,3
13	18,7	20,8	2,1
14	21,3	23,6	2,3

Mittelwert	18,85	20,8714286	2,02142857
Stdabwch	4,34424907	4,74754502	0,47234759

Tabelle 1a: Mittelwerte der Masse der aufgetragenen Beschichtungsmenge auf PGA-Filze

	Zeitpunkte	10 min	1h	24h	96h
Probe Nr.					
1		11,1	11,9	12,69	15,27
2		12,8	13,48	13,93	14,89
3		13,3	14,04	14,64	15,8
4		9,5	10,92	11,77	13,13
5		11,2	12,58	14,44	15,81
6		14,5	15,16	15,84	17,39
7		9,2	9,84	10,77	11,85
8		7,8	8,46	9,33	10,65
9		10,3	11,32	11,94	13,42

10		10,3	10,96	11,99	13,05
Mittelwert		11	11,9	12,7	14,1
Stabweichung		2	2	2	2,1

Tabelle 2a: Freisetzung von Gentamicin (mg/l) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten in Abhängigkeit der Zeit

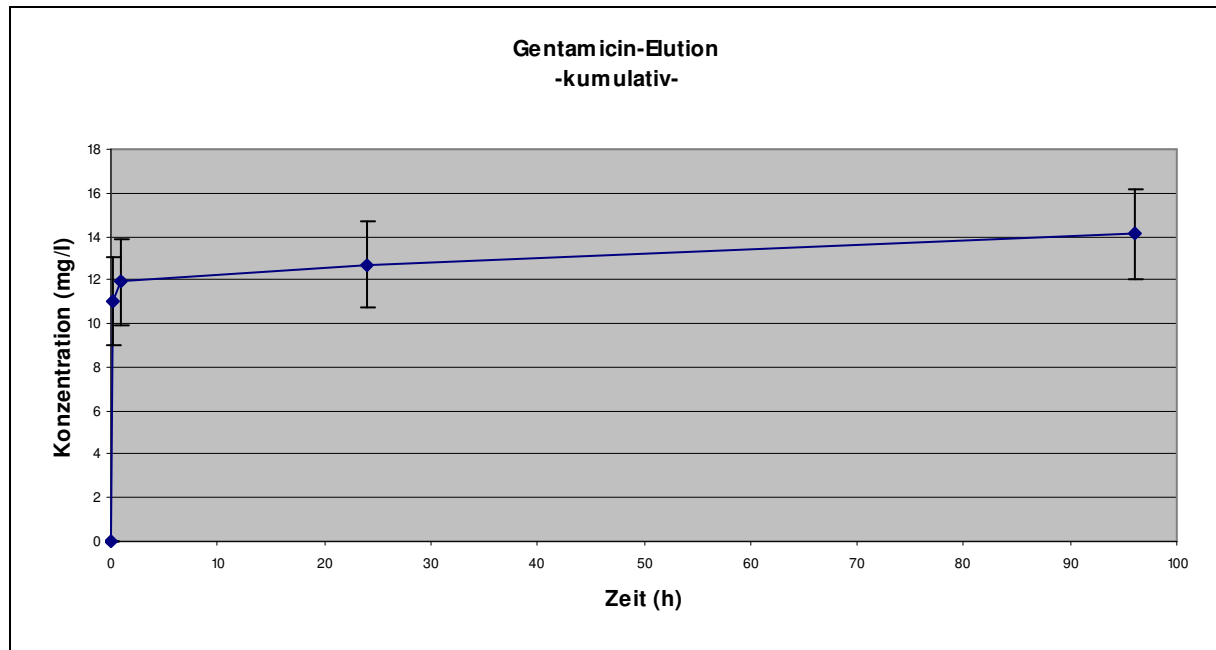


Abbildung 1a: Gentamicin-Elution (kumulativ) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

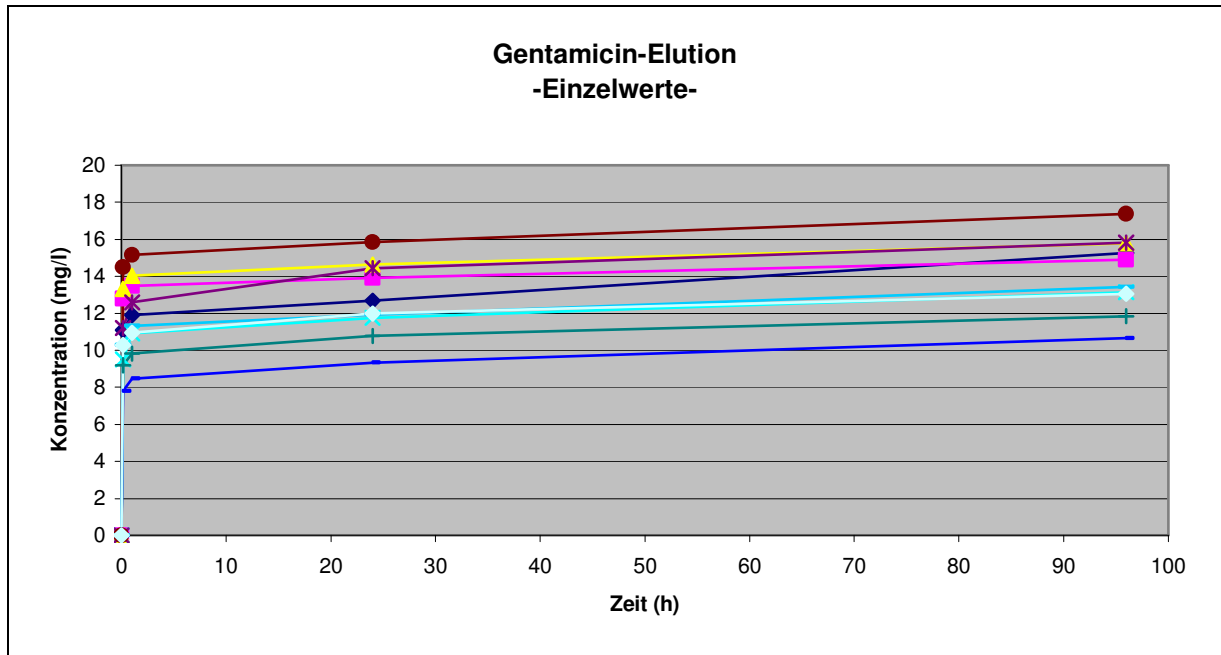


Abbildung 2a: Gentamicin-Elution (Einzelwerte) aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten

	Zeitpunkte	10 min	1h	24h	96h
Gentamicin in mg/l		11	11,9	12,7	14,1
In % der Gesamtmenge		34,1±6,0	36,9±5,9	39,4±5,8	43,7±6,0

Tabelle 3: Mittelwerte der Gentamicin- Freisetzung aus mit PDLLA- beschichteten Kirschnerdrähten

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
2mg/cm2		24	106	252	311	462
		92	70	336	321	580
		99	65	279	311	366
Mittelwert		71,6666667	80,3333333	289	314,333333	469,333333
Stabw		41,4286535	22,3681321	42,8835633	5,77350269	107,188308
Freistz in %		12,8896882	14,4484412	51,9784173	56,5347722	84,41247

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
4mg/cm2		250	305	511	724	710
		144	187	583	606	798
		79	169	549	669	577
Mittelwert		157,666667	220,333333	547,666667	666,333333	695
Stabw		86,3153134	73,8737662	36,0185138	59,0451804	111,260955
Freisetz in %		14,1786571	19,8141487	49,2505995	59,9220624	62,5

Tabelle 4: Gentamicin-Monobeschichtung von PGA-Filzen

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
4mg/cm2		0,79	128,04	368,28	826,32	500,94
		2,05	91,08	495,66	873,18	555,72
		1,06	53,46	676,5	727,98	568,26
Mittelwert		1,3	90,86	513,48	809,16	541,64
Stabw		0,66340033	37,2904867	154,880781	74,1053925	35,8005642
Freistz in %		0,11690647	8,17086331	46,176259	72,7661871	48,7086331

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
6mg/cm2		2,05	148,5	672,54	1220,34	996,6
		4,16	84,48	566,28	1342,44	1021,68
		1,52	96,36	555,72	1087,68	861,3
Mittelwert		2,57666667	109,78	598,18	1216,82	959,86
Stabw		1,39657915	34,0545504	64,6137416	127,416471	86,2717034
Freistz in %		0,15447642	6,58153477	35,8621103	72,9508393	57,5455635

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
8mg/cm2		6,67	98,34	783,42	1788,6	1403,16
22,24mg		2,05	151,8	848,76	1690,26	1506,78
		11,35	189,42	926,64	1289,64	1381,38
Mittelwert		6,69	146,52	852,94	1589,5	1430,44
Stabw		4,65003226	45,7689895	71,7014393	264,300404	67,0032745
Freistz in %		0,30080935	6,5881295	38,3516187	71,4703237	64,3183453

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
12mg/cm2		2,97	282,48	1743,72	2652,54	2182,62
		6,73	170,94	727,32	2506,68	2151,6
		2,64	184,14	1066,56	2187,9	2273,04
Mittelwert		4,11333333	212,52	1179,2	2449,04	2202,42
Stabw		2,27209888	60,9455593	517,477601	237,622305	63,0947573
Freistz in %		0,12330136	6,3705036	35,3477218	73,41247	66,0197842

Tabelle 5: Teicoplanin-Monobeschichtung von PGA-Filzen

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G2T4	0	74	57	250	291	397
	0	59	106	324	243	345
	0	56	88	320	366	340
Mittelwert	0	63	83,6666667	298	300	360,666667
Stabw	0	9,64365076	24,7857486	41,6173041	61,991935	31,5647483
Freistz in %	0	11,3309353	15,0479616	53,5971223	53,9568345	64,8681055

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G2T6	0	76	119	293	281	423
5,56mg	0	79	110	280	299	316
	0	64	161	252	273	295
Mittelwert	0	73	130	275	284,333333	344,666667
Stabw	0	7,93725393	27,2213152	20,9523268	13,3166562	68,6464371
Freistz in %	0	13,1294964	23,381295	49,4604317	51,1390887	61,9904077

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G4T8	0	138	182	464	592	666
11,12mg	0	125	131	396	594	641
	0	68	360	446	623	777
Mittelwert	0	110,333333	224,333333	435,333333	603	694,666667
Stabw	0	37,2334975	120,226176	35,2325607	17,3493516	72,3901467
Freistz in %	0	9,92206235	20,1738609	39,1486811	54,2266187	62,470024

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G4T12	0	162	185	498	627	640
11,12mg	0	174	178	388	651	783
	0	196	214	483	605	768
Mittelwert	0	177,333333	192,333333	456,333333	627,666667	730,333333
Stabw	0	17,2433562	19,0875177	59,6517672	23,0072452	78,5896516
Freistz in %	0	15,9472422	17,2961631	41,0371703	56,4448441	65,677458

Tabelle 6: Gentamicin/ Teicoplanin- Duobeschichtung; Bestimmung der Gentamicinwerte

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G2T4	0	46,2	262,02	394,02	626,34	564,3
11,12mg	0	13,2	201,96	364,98	541,2	534,6
	0	72,6	153,78	234,3	618,42	566,94
Mittelwert	0	44	205,92	331,1	595,32	555,28
Stabw	0	29,7610484	54,2285497	85,0794358	47,0362881	17,9579843
Freistz in %	0	3,95683453	18,5179856	29,7751799	53,5359712	49,9352518

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G2T6	0	130,02	260,7	619,74	1080,42	955,02
16,68mg	0	83,16	245,52	364,32	1056,66	1549,68
	0	260,7	231,66	538,56	1042,8	843,48
Mittelwert	0	157,96	245,96	507,54	1059,96	1116,06
Stabw	0	92,0086713	14,5249991	130,504883	19,0258666	379,644599
Freistz in %	0	9,47002398	14,7458034	30,4280576	63,5467626	66,9100719

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G4T8	0	11,88	386,76	491,7	1587,3	1598,52

22,24mg	0	13,2	174,24	1261,92	1582,68	1496,88
	0	31,68	223,74			
Mittelwert	0	18,92	261,58	876,81	1584,99	1547,7
Stabw	0	11,0701762	111,198412	544,627785	3,26683333	71,8703332
Freistz in %	0	0,85071942	11,7616906	39,4249101	71,267536	69,5908273

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
G4T12	0	7,92	610,5	1063,26	2240,04	1932,48
33,36mg	0	25,08	784,08	1220,34	2064,48	2187,9
	0	14,52	905,52	982,08	2115,96	1841,4
Mittelwert	0	15,84	766,7	1088,56	2140,16	1987,26
Stabw	0	8,65581885	148,27592	121,128132	90,2472072	179,627945
Freistz in %	0	0,47482014	22,9826139	32,6306954	64,1534772	59,5701439

Tabelle 7 : Gentamicin/ Teicoplanin- Duobeschichtung;; Bestimmung der Teicoplaninwerte

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T4G2	0	70	71	232	328	405
5,56mg	0	57	81	256	296	364
	0	91	104	212	307	284
Mittelwert	0	72,6666667	85,3333333	233,333333	310,333333	351
Stabw	0	17,1561456	16,9213869	22,0302822	16,2583312	61,5386058
Freistz in %	0	13,0695444	15,3477218	41,9664269	55,8153477	63,1294964

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T6G2	0	46	88	260	295	417
5,56mg	0	59	83	216	286	308
	0	101	57	234	284	264
Mittelwert	0	68,6666667	76	236,666667	288,333333	329,666667
Stabw	0	28,7460142	16,643317	22,12088	5,85946528	78,7675906
Freistz in %	0	12,3501199	13,6690647	42,5659472	51,8585132	59,2925659

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T8G4	0	141	178	548	585	775
11,12mg	0	101	299	498	580	677
	0	89	165	524	596	657
Mittelwert	0	110,333333	214	523,333333	587	703
Stabw	0	27,2274371	73,8985791	25,0066658	8,18535277	63,1506136
Freistz in %	0	9,92206235	19,2446043	47,0623501	52,7877698	63,2194245

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T12G4	0	145	129	538	575	772
11,12mg	0	107	265	484	599	842
	0	132	134	517	644	682

Mittelwert	0	128	176	513	606	765,333333
Stabw	0	19,3132079	77,1167945	27,2213152	35,0285598	80,2080628
Freistz in %	0	11,5107914	15,8273381	46,1330935	54,4964029	68,82494

Tabelle 8: Teicoplanin / Gentamicin- Duobeschichtung; Bestimmung der Gentamicinwerte

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T4G2	0	81,84	126,06	335,94	837,54	589,38
11,12mg	0	182,82	132,66	431,64	681,78	547,14
	0	71,28	220,44	277,2	701,58	570,9
Mittelwert	0	111,98	159,72	348,26	740,3	569,14
Stabw	0	61,5760311	52,6885073	77,9536093	84,7922355	21,1749286
Freistz in %	0	10,0701439	14,3633094	31,3183453	66,573741	51,1816547

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T6G2	0	283,14	310,86	463,32	1258,62	965,58
16,68mg	0	249,48	390,72	695,64	1227,6	764,28
	0	347,82	299,64	549,12	1255,98	1019,04
Mittelwert	0	293,48	333,74	569,36	1247,4	916,3
Stabw	0	49,9787515	49,663995	117,475056	17,1980348	134,339321
Freistz in %	0	17,5947242	20,0083933	34,1342926	74,7841727	54,9340528

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T8G4	0	440,88	351,12	658,02	1625,58	1122
22,24mg	0	362,34	284,46	654,72	1643,4	1166,22
	0	299,64	266,64	1083,72	1637,46	1003,86
Mittelwert	0	367,62	300,74	798,82	1635,48	1097,36
Stabw	0	70,7678825	44,5308477	246,736155	9,07349988	83,9377126
Freistz in %	0	16,5296763	13,522482	35,9181655	73,5377698	49,3417266

	Zeitpunkte	10 min	1h	6h	24h	96h
T12G4	0	747,12	514,8	1188,66	2839,98	2224,86
33,36mg	0	480,48	572,88	1039,5	2408,34	2273,7
	0	378,18	542,52	1050,72	2510,64	2055,9
Mittelwert	0	535,26	543,4	1092,96	2586,32	2184,82
Stabw	0	190,472615	29,0499983	83,0682828	225,552365	114,287406
Freistz in %	0	16,044964	16,2889688	32,7625899	77,5275779	65,4922062

Tabelle 9: Teicoplanin / Gentamicin- Duobeschichtung; Bestimmung der Teicoplaninwerte