

**Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Beschichtung von PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen
mit schwer löslichen Gentamicinsalzen**

Mit Versuchen zur Beschichtungstechnik sowie Freisetzung,
antimikrobiellen Wirksamkeit, Hämokompatibilität und Zytotoxizität der
entwickelten Gentamicinsalz-Beschichtungen

Joachim Schwabe

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. H.-H. G. U. Eckstein

Die Dissertation wurde am 25.02.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.09.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1 Pathogenese implantatassoziiierter Infektionen	2
Die initiale Anhaftung	4
Das Wachstum auf dem Implantat	7
1.2 Die gefäßprothetische Versorgung	10
1.3 Komplikationen eines prothetischen Gefäßersatzes	12
Thrombotische Verschlüsse	13
Infektionen.....	14
1.4 Aufgabenstellung	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien	20
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Beschichtungstechnik.....	23
Die Beschichtungslösung.....	23
Aufbringen der Beschichtung.....	23
Beschichtungen mit dem Resomer R203.....	25
2.2.2 Freisetzungsversuche	26
2.2.3 Untersuchungen zur Hämokompatibilität.....	27
Rotationsthrombelastographie	27
Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems...	28
2.2.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität.....	30
2.2.5 Mikrobiologische Versuche	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Beschichtungstechnik	34
3.2 Elutionen.....	39

3.3 Untersuchungen zur Hämokompatibilität	43
Rotationsthrombelastographie	43
Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems.....	45
3.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität	56
3.5 Mikrobiologische Versuche	61
4. Diskussion	66
4.1 Die Beschichtungstechnik.....	67
4.2 Das Elutionsverhalten	69
4.3 Beeinflussung von Hämostase und Komplementsystem	70
4.4 Gewebeverträglichkeit - Zytotoxizität	72
4.5 Antiinfektive Eigenschaften.....	74
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	81
7. Abbildungsverzeichnis.....	93
8. Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
Atl	-	Autolysin
CT	-	Clotting Time = Gerinnungszeit
CFU	-	Colony Forming Unit = Koloniebildende Einheit
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
ePTFE	-	expandiertes Polytetrafluorethylen
Faktor XIIa	-	aktivierter Faktor XII (Hageman-Faktor)
Komplement C3a	-	aktivierter Komplementfaktor C3
MCF	-	Maximum Clot Firmness = größte Gerinnselfestigkeit
p.A.	-	pro Analyse
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PGA	-	Polyglykolsäure
PIA	-	Polysaccharide intercellular adhesin
PTFE	-	Polytetrafluorethylen
ROTEM	-	Rotationsthrombelastometrie
SDS	-	Sodiumdodecylsulfat
S.	-	Staphylokokkus
TAT	-	Thrombin-Antithrombin III-Komplex
TEG	-	Thrombelastogramm
TSB	-	Tryptone Soya Broth

1. Einleitung

Die bakterielle Besiedlung ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen bei der Implantation prothetischer Materialien. Als Auslöser einer periprothetischen Infektion genügt oft ein minimales bakterielles Inokulum, welches sich aus einem atypischen Erregerspektrum mit einem hohen Anteil von niedrig virulenten Keimen der normalen Hautflora zusammensetzt. Eine solche Infektion stellt ein schwer zu therapierendes Problem dar und führt in den meisten Fällen zu einer vollständigen chirurgischen Entfernung des Fremdmaterials, verbunden mit der Gefahr einer chronischen Keimpersistenz.

1.1 Pathogenese implantatassoziiertes Infektionen

Bei implantierten Fremdkörpern wie z.B. Kathetern, Gefäßprothesen oder Endoprothesen gibt es kein Verfahren, welches die absolut sterile Implantation garantiert und es besteht somit prinzipiell immer die Gefahr einer peri- und postoperativen bakteriellen Besiedlung. Diese kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Bei der Implantation ist eine direkte Kolonisation des Fremdmaterials an der Wunde oder über den Luftweg möglich, außerdem können über den Kontakt zu einem benachbarten Infektionsherd sowie durch eine hämatogene oder lymphogene Aussaat neue Keimquellen entstehen. Aufgrund der mitunter sehr langen Inkubationszeiten von niedrigvirulenten Keimen über Monate und Jahre hinweg, ist die eindeutige Zuordnung des Erregerursprungs üblicherweise nicht immer möglich. Die Effizienz von intraoperativen Präventionsmaßnahmen, wie z.B. der Antibiotikaphylaxe und Umsetzung moderner Hygienerichtlinien, spricht durch eine nachgewiesene Reduktion von postoperativen Infektionen für einen sehr großen Anteil von intraoperativ verursachten Kontaminationen (Deacon 1996, S. 1760).

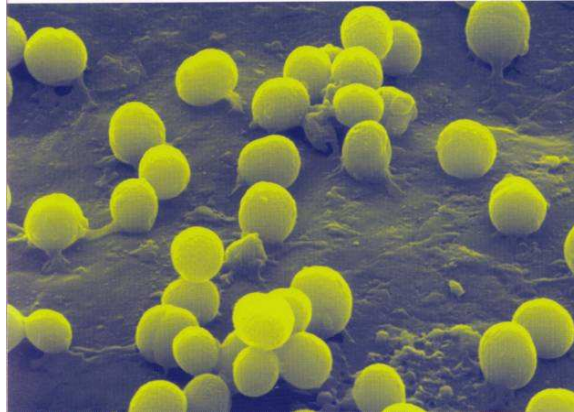


Abb. 1.1: Staphylokokkus aureus auf einer Implantatoberfläche, ohne Biofilm (Geipel 2005, S. 965)

Eine Besiedlung von implantierten Materialien erfolgt über mindestens zwei Schritte: erstens die primäre Adhäsion, welche die Voraussetzung für eine als zweites folgende Akkumulation darstellt.

Während der erste Schritt, die rezeptorvermittelte Adhäsion einzelner Bakterien noch als ein möglicherweise reversibles Stadium anzusehen ist, wird nach einer Akkumulation die Wiederherstellung der lokalen Keimfreiheit durch das Immunsystem und eine antibiotische Therapie äußerst problematisch. Abbildung 1.2 gibt eine Übersicht über die zahlreichen, eine Infektion beeinflussenden Faktoren:

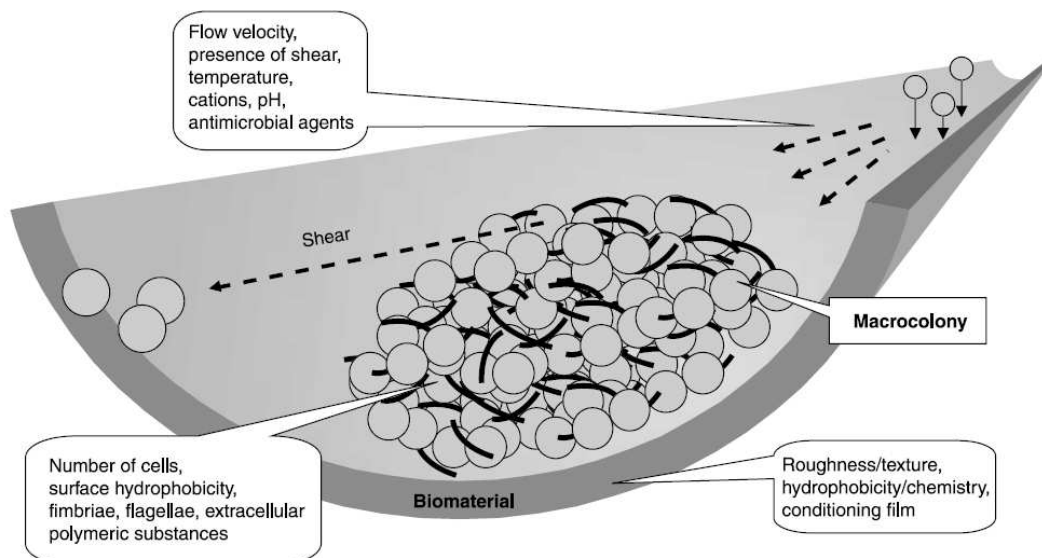


Abb. 1.2: Beeinflussende Faktoren der Keimbesiedlung (von Eiff 2005, S.183)

Die initiale Anhaftung

Zahlreiche Blut- bzw. Exsudatbestandteile reagieren unmittelbar beim Kontakt mit einem Fremdkörper, also auch dem Implantat. Primär entsteht aus den sehr schnell anhaftenden Proteinen ein die Oberfläche bedeckender Überzug, der so genannte „*conditioning film*“. Zu der weiter ablaufenden Proteinhftung kommt mit der Zeit die Auflagerung von Zellen wie z.B. Fibroblasten, aktivierten Endothelzellen und den im Blutstrom vorhandenen Thrombozyten, Leukozyten usw. hinzu.

Durch diese natürlichen Vorgänge verändern sich die Voraussetzungen für die Adhäsion eines Mikroorganismus deutlich. Dieser findet unterschiedliche Oberflächen-beschaffenheiten sowohl vor und nach Kontakt der Biomaterialien mit den Körper-flüssigkeiten, als auch abhängig von der Implantationszeit vor (siehe auch Abbildung 1.3).

Die Oberflächeneigenschaften eines Implantates selbst werden zum Beispiel durch die vorhandenen Ladungen oder eine hydrophobe Oberfläche beeinflusst. Die direkte Anhaftung von Bakterien an das Prothesenmaterial erfolgt durch physikochemische Interaktionen, wie den van der Waals-Kräften (Hogt 1983, S. 2963). Der Einfluss des Materials wird im Vergleich von Stahl- und Titanmaterialien deutlich: Während heraus gelöste Fe^{2+} -Ionen des Stahls positiv chemotaktisch auf z.B. *S.aureus* und *S.epidermidis* wirken, hemmt Titan die Adhärenz der Bakterien, was dessen Bedeutung in der Revisionschirurgie erklärt. Die Affinität von Keimen zu Kunststoffen ist noch nicht endgültig geklärt.

Erste Ablagerungen im Sinne eines entstehenden *conditioning films* werden schon innerhalb der ersten Sekunde nachgewiesen, ein das Implantat vollständig bedeckender Monofilm ist innerhalb von Sekunden bis Minuten erreicht (Dickinson 1989, S.597). Die entstehende Proteindichte in der Auflagerung zeigt im Vergleich zu der im Blutstrom vorhandenen freien Konzentrationen eine bis zu 1000fach dichtere Packung auf dem Implantat. Diese Auflagerung variiert entsprechend der unterschiedlichen Affinitäten von Proteinen zu den spezifischen Oberflächeneigenschaften des Biomaterials (Baier 1984, S. 330).

Aus diesem Grund beschränkt sich die Bedeutung der Oberflächeneigenschaften des Implantats auf die sehr kurze Zeitspanne zwischen der Implantation und der

Etablierung eines Biofilms. Im weiteren Verlauf wird die Adhäsion von Keimen an den entstandenen *conditioning film* bestimmt.

Alle Möglichkeiten einer festen Bindung zwischen Bakterium und Biomaterial bzw. dem *conditioning film* setzen eine intakte Bakterienoberfläche voraus, mit den für Serumproteine spezifischen Bindungsstellen ausgerüsteten Proteinen. Deutlich wird dies nach der proteolytischen Spaltung der bakteriellen Oberflächenproteine, nach welcher die direkte Anhaftung des *S. epidermidis* an Implantate unterbleibt (Hogt 1986, S. 296).

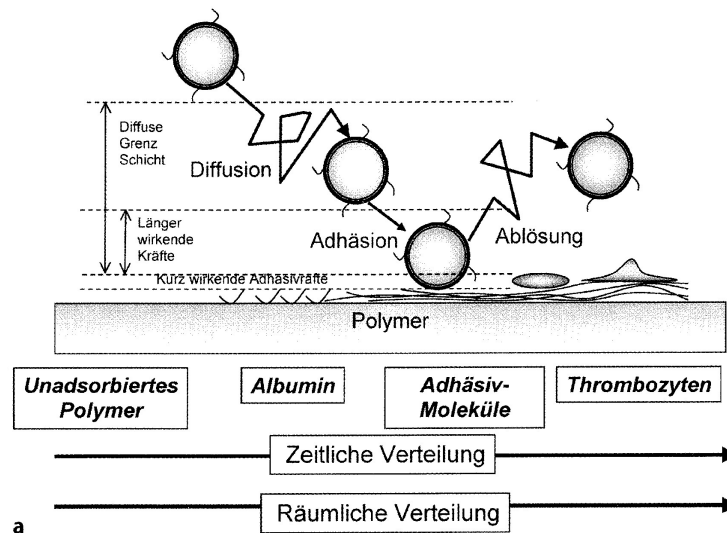


Abb. 1.3: Mikrobielle Adhäsion als dynamischer Prozess (Geipel 2005, S. 964)

Da sich die für diese Interaktionen verantwortlichen Rezeptoren zwischen den Bakterienstämmen stark unterscheiden, sind auch die bei einer Gefäßprotheseninfektion am häufigsten zu findenden Spezies *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis* hinsichtlich ihrer Bindungsmöglichkeiten verschieden:

S. aureus zeigt für zahlreiche Blutproteine, wie z.B. Fibronectin, Fibrin(ogen), Kollagen, Laminin, Vitronectin, Thrombospondin, Elastin und von Willebrand Faktor eine deutliche Affinität (Kuusela 1985, S. 79; Hartleib 2000, S. 2151; Herrmann 1997 S. 986). Die Bindung wird durch Oberflächenproteine wie den clumping factor (ClfA, ClfB), fibrinogen-binding protein (FbpA, FbpB), ein Kollagenadhesin, ein Elastinbinding Protein, Protein A und zahlreiche weitere vermittelt (Cheung 1995, S.1915). Durch Inkubationsversuche mit vorbehandelten Materialien, welche durch definiertes Serum oder Proteinlösungen mit einer bekannten Proteinbeschichtung

versehen wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Besiedlung vor allem durch die Bindungen an das sich schnell ablagernde Fibrin(ogen) und Fibronectin bestimmt wird (Greene 1995, S. 1146; Vaudaux 1984; Vaudaux 1995, S. 587).

Im Vergleich zu den Bindungsmöglichkeiten des *S. aureus* kann der niedrigvirulente Keim *S. epidermidis* durch die ihm eigene Expression einer weitaus geringeren Anzahl von Adhäsinen auch entsprechend weniger mit Blut- und Gewebeproteinen in Kontakt treten. Mit der Besiedlung eines *conditioning films* wird außer Proteinen, welche die Anheftung an Fibronectin (Delmi 1994, S. 435; Simpson 2002, S. 48), Fibrin(ogen) (Arciola 2004, S. 4827) und Vitronectin (Heilmann 1997, S. 1017) ermöglichen, auch noch ein in der Zellwand vorkommendes Polysaccharid, das Polysaccharide/Adhesin (PS/A), in Verbindung gebracht (Muller 1993, S. 554). Für den direkten Kontakt mit dem Implantat verfügt *S. epidermidis* unter anderem über die „*staphylococcal surface proteins*“ 1 und 2 (SSP-1, SSP-2), bei deren Ausschaltung die Anhaftung, z.B. an Polystyrol deutlich vermindert wird (Veenstra 1996, S. 538), oder das Autolysin AtlE, welches eine Anhaftung an Polymere vermittelt (Heilmann 1997, S. 1014; Rupp 2001, S. 1039). Da das Autolysin AtlE zudem die Anhaftung an das im *conditioning film* vorkommende Vitronectin vermittelt wird deutlich, dass ein Rezeptor gleichzeitig die Anhaftung an das Biomaterial selbst oder an abgelagerte Proteine bewirken kann.

Der Unterschied zwischen den Möglichkeiten, den entstandenen *conditioning film* für die Besiedlung auszunutzen, konnte durch einen vorangegangenen Kontakt der Proben mit Serum deutlich gemacht werden: Während die Besiedlung durch *S. aureus* deutlich zunahm, zeigte sich bei *S. epidermidis* keine verbesserte Ansiedlung (Malangoni 1993, S. 169). In der Praxis ist die Technik des sogenannten „*preclottings*“ gängig, d.h. der Erzeugung eines Proteinüberzuges durch einen Kontakt des Implantats mit sterilem Humanplasma und Aktivierung der Blutgerinnung. Dies wurde ursprünglich vor dem Hintergrund einer verbesserten blutdichten Ausrüstung von Gefäßprothesen auf der Basis von Dacron durchgeführt. Als zusätzlicher Effekt dieser Methode oder einer Beschichtung mit Albumin wurde eine etwas verminderte Besiedlung durch *S. epidermidis* nachgewiesen, welche aus der spezifischen Rezeptorverteilung resultiert (Muller 1991, S. 3324; Siverhus 1990, S. 615).

Die im *conditioning film* abgelagerten Proteine bilden die Basis für die weitere Bedeckung des Implantats durch die im Blutstrom befindlichen Zellen. Besonders Fibrin(ogen) und von Willebrand Faktor beschleunigen die Ablagerung der Thrombozyten (Kwak 2005, S. 73; Tsai 2002, S. 351). Während der Ausbildung eines Thrombus werden weitere Blutzellen sowie Proteine angelagert. Von Adhäsinen des *S. aureus*, als auch von *S. epidermidis* kann diese Schicht genutzt werden. Insbesondere die Anlagerung von *S. epidermidis* wird hier wieder deutlich besser möglich, da diese sehr gut an aktivierte Thrombozyten erfolgen kann (Wang 1993, S. 331).

S. aureus ist es somit möglich insbesondere die durch einen entstehenden *conditioning film* angebotenen Bindungsmöglichkeiten zu nutzen, während *S. epidermidis* etwas leichter die unbehandelte Prothese und im weiteren Verlauf den mit Zellen besetzten *conditioning film* besiedeln kann. Diese wiederholt gemachten Beobachtungen und die Häufigkeit der Infektionen durch *S. epidermidis* führten zu der Annahme vieler Autoren, eine intraoperative Kontamination und nicht eine hämatogene Streuung des Hautkeims *S. epidermidis* als Ursprung einer entstehenden Infektion zu sehen.

Das Wachstum auf dem Implantat

Der initialen Adhäsion folgt die Keimakkumulation und bei entsprechender Oberflächenausstattung die Bildung eines mehrschichtigen Zelllayers durch interzelluläre Kontakte. Eine elektronenmikroskopische Dokumentation von inkubierten Kathetern zeigte die vereinzelte Anlagerung von *S. epidermidis* nach fünf Minuten. Mikrokolonien hatten sich bereits nach 40 Minuten gebildet, eine massive Besiedlung konnte nach sechs Stunden beobachtet werden (Peters 1982, S. 480).

Das Wachstum von anhaftenden Bakterien wird hierbei sowohl durch physiochemische Interaktionen zwischen Nährstoffen und Bakterien, als auch durch die Rauigkeit des Biomaterials beeinflusst. So änderten sich bei annähernd gleich bleibender initialer Anhaftung beispielsweise die Teilungszeiten von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* auf verschiedenen Biomaterialien (Gottenbos 2000, S. 211).

Für die Entstehung von Mikrokolonien benötigen die Bakterien wiederum die Ausstattung mit verschiedenen Oberflächenmolekülen. *S. epidermidis* verfügt hierzu

über das „*polysaccharide intercellular adhesin*“ (PIA) bzw. PS/A (Heilmann 1996, S. 1088), von welchen inzwischen angenommen wird, dass es sich um die selben Moleküle handelt (Sadovskaya 2005, S. 3015) sowie das „*accumulation-associated antigen*“ (AAP) (Hussain 1997, S. 523). Die Infektrate zentralvenöser Katheter im Tiermodell zeigte eine deutlich gesteigerte Virulenz der Koloniebildung durch PIA (Rupp 1999, S. 2628). Hinzu kommt noch die bewiesene deutliche Hemmung der zellvermittelten Immunabwehr durch das PIA (Voung 2004, S. 271).

Ein zusätzliches wichtiges Pathogenitätsmerkmal ist die Produktion eines Biofilms während der Entstehung von Kolonien. Über diese Eigenschaft verfügen allerdings nicht alle koloniebildenden Bakterien.

Da der Faktor Biofilm eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika und die Immunabwehr bewirkt (s.u.) ist der Vergleich verschiedener nicht-biofilm bildender Stämme von *S. epidermidis* und *S. aureus* (Stamm 502a) mit dem Biofilm bildenden *S. epidermidis* (Stamm RP62a) mit einer deutlich höheren Besiedlung von unbehandelten Dacron- und PTFE-Gefäßprothesen durch die RP62a-Variante (Schwank 1998, S. 896) von klinischer Relevanz.

Ein Biofilm stellt eine die Bakterien umgebende Matrix dar, durch welche ein verbessertes Umgebungsmilieu entsteht (Davey 2000, S. 854). Er besteht aus Polysacchariden, Wasser, weiteren Zellprodukten und Resten von Zelltrümmern und variiert je nach Bakterienstamm und Umgebungsbedingungen (Sutherland 2001, S. 223).

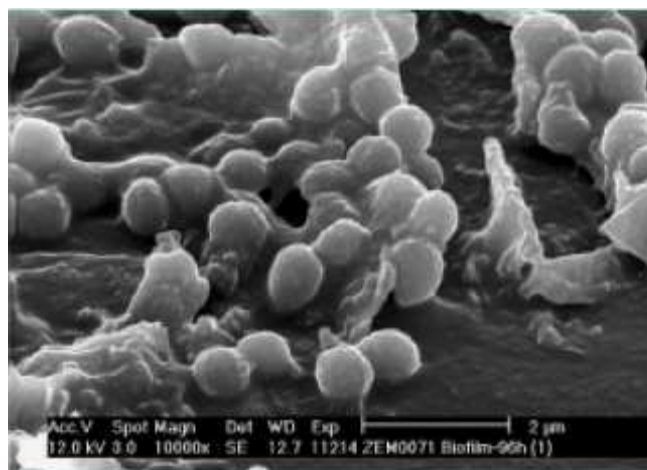


Abb. 1.4: *S. aureus* in einem entstehenden Biofilm (Geipel 2005, S. 965)

Die Regulation des Pathogenitätsfaktors Biofilm entsteht durch interzelluläre Signalvermittlung via Botenstoffen, welche abhängig von der bestehenden Zelldichte eine veränderte Genexpression hervorruft (Vuong 2000, S. 1689). Dieser Vorgang wird als *quorum sensing* bezeichnet und konnte bei zahlreichen Bakterienspezies wie *S. epidermidis* und *S. aureus* nachgewiesen werden. Durch diese Stoffe ist die Produktion des Biofilms bei geringer Zelldichte, d.h. bei Infektbeginn, am größten (Vuong 2003, S. 711; Yarwood 2004, S. 1842). Bei *S. epidermidis* bestehen außerdem weitere Effekte des *quorum sensing* in einer Veränderung der durch AutolysinE vermittelten Anhaftung, der freigesetzten Lipase und Protease (Vuong 2000, S. 1050).

Eine peri- und postoperativ durchgeführte Infektionsprophylaxe wird durch die Tatsache einer Steigerung der antibiotischen Resistenz, z.B. des *S. epidermidis* um bis zu 30%, allein durch die Anhaftung an das Implantat erschwert (Arciola 2002, S. 1497). Zusätzlich spielt der Biofilm für die Immunabwehr und antibiotische Therapie abgesiedelter Mikroorganismen eine bedeutende Rolle. Es entsteht ein Schutz gegen die Immunantwort und zusätzlich eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Tiermodell nachgewiesen werden (Costerton 1995, S. 730; Schwank 1998, S. 896).

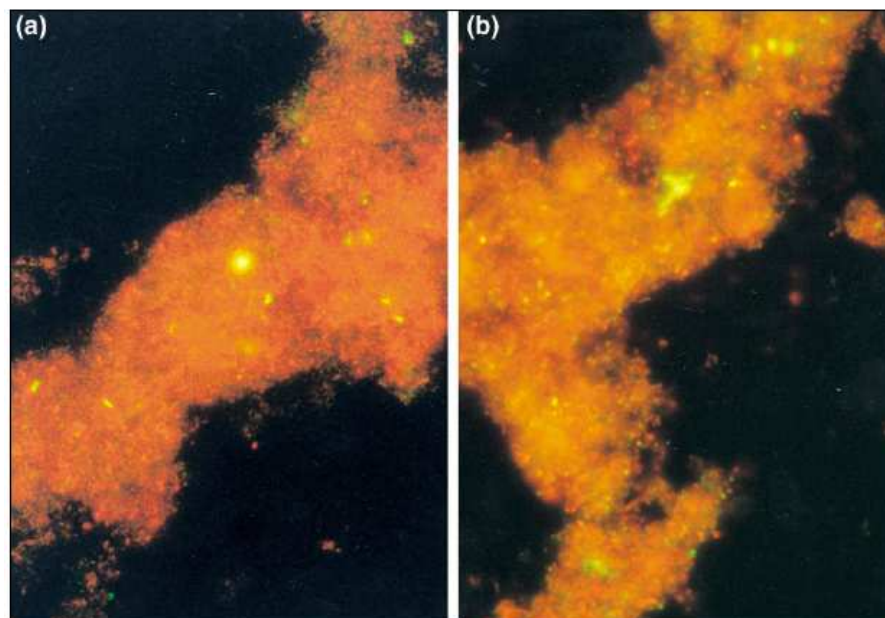


Fig. 1. Microcolonies from a 16 h dual enteric species biofilm on a glass coverslip showing the heterogeneity found within even a small part of a biofilm. Cultures were treated with 10 mM cetyl pyridinium chloride followed by 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ propidium iodide. Cells expressing green fluorescent protein (GFP) appear green or yellow, and the second species is red. Staining reveals large amounts of exopolysaccharide (EPS) associated with the cells and contributing to the biofilm heterogeneity.

Abb. 1.5: Biofilm produzierende Kolonien (Sutherland 2001, S. 223)

Die Fähigkeit einen Biofilm zu bilden, wird nur bei einem Teil der Bakterienstämme gefunden. Von 151 klinisch gewonnenen *S. epidermidis*-Isolaten wiesen nur 46% eine Biofilmbildung auf. Diese konnte interessanter Weise nicht, wie oft vermutet wurde, mit einer immer erhöhten primären Anhaftung in Zusammenhang gebracht werden. Nur Stämme mit PS/A Expression (68% der 151), die unabhängig von der Biofilmproduktion ist, zeigten eine stärkere Besiedlung von Kathetern (Muller 1993, S. 1213). Ein Zusammenhang der initialen Anhaftung durch hydrophobe Interaktionen und der Bildung eines Biofilms besteht nicht (Cerca 2005, S. 510).

1.2 Die gefäßprothetische Versorgung

Der bestehende oder drohende Verlust der arteriellen Durchblutung kann verschiedene Ursachen haben. Die Häufigsten sind aneurysmatische Veränderungen, der arteriosklerotische Verschluss, z.B. im Zusammenhang mit Diabetes mellitus und Nikotinabusus, oder Traumata (siehe Abbildung 1.6).

	Aortoiliiofemoral (%)		Extracavitary (%)
No.	68 (58)		51 (42)
Indication			
Aneurysmal disease	41 (59)		2 (71)
Occlusive disease	25 (37)		49 (16)
Trauma	2 (71)		-
Graft location			
Aortoiliac	12 (16)	Axillofemoral	16 (31)
Aortofemoral	53 (73)	Femorofemoral	16 (31)
Iliofemoral	3 (74)	Infrainguinal	19 (72)
Graft material			
Polyester	64 (69)		6 (12)
PTFE	4 (49)		45 (64)

Abb. 1.6: Häufigste Ursachen und Lokalisationen von Gefäßimplantaten (Bandyk 2001, S. 412)

In der heutigen Gefäßchirurgie bieten sich verschiedene Möglichkeiten eines Ersatzes obstruierter, erweiterter oder traumatisierter Gefäßsegmente. Dabei hat jedes der unterschiedlichen Verfahren spezielle Vor- und Nachteile, die berücksichtigt werden müssen.

Der autogene Gefäßersatz durch ein entnommenes Venenstück, wie z.B. der V. saphena magna, stellt heute den „Goldstandard“ für Gefäßersatzoperationen an den Extremitäten dar. Die Vorteile dieser Methode liegen besonders in den antithrombogenen und antiinfektiven Eigenschaften des vitalen Endothels sowie der hohen mechanischen Belastbarkeit des Gefäßes, welche besonders bei gelenküberbrückenden Operationen vorteilhaft ist. Nachbeobachtungen ergaben eine Rate von 75% hämodynamisch intakter Prothesen nach fünf Jahren. Solch ein gutes Ergebnis kann nur durch den venösen Ersatz erreicht werden (Taylor 1990, S. 200). Klinisch nachteilig sind das zusätzliche Trauma an der Entnahmestelle sowie eine häufig eingeschränkte Verfügbarkeit, verursacht durch die Verkürzung der anatomisch verfügbare Länge in Folge von degenerativen oder entzündlichen Gefäßveränderungen. Gefäßtransplantationen durch frisch entnommene oder kryokonservierte Venen und Arterien bieten in diesem Fall eine Möglichkeit des homogenen Ersatzes (Mirelli 2005, S. 2689). Da kryokonservierte Gefäße im Langzeitverlauf allerdings unbefriedigende Ergebnisse zeigen, sollte abhängig vom Implantationsort auch immer der Ersatz durch eine synthetische Prothese erwogen werden (Harris 2001, S. 529).

Alle autogen verfügbaren Gefäße können nur für den Gefäßersatz bis zu einem bestimmtem Kaliber dienen und sind z.B. für den Aortenersatz ungeeignet. Zudem verfügen bis zu 30% der Patienten aufgrund von degenerativen Veränderungen oder Voroperationen nicht über eine zur Entnahme geeignete Vene (Veith 1979, S. 255). Da deshalb der Gefäßersatz durch venöse Interponate oft nicht möglich ist, können in diesen Fällen Gefäßprothesen aus Dacron (Polyethylenterephthalat) oder ePTFE (expandiertes Polytetrafluorethylen) als alloplastische Gefäßinterponate eingesetzt werden.

Klinische Studien belegten deren gute Langzeitergebnisse beim Ersatz von Gefäßstrecken, welche über hohe Druck- und Flussraten verfügen.

Eigenschaften der Gefäßprothesen wie Quer- und Längselastizität, Porosität oder mechanische Stabilität zur Überbrückung von stark beanspruchten Gefäßstrecken konnten über die Jahre hinweg durch verbesserte Herstellungsverfahren optimiert werden. Die Hauptgründe für das postoperative Versagen synthetischer Prothesen liegen in Nachblutungen, Serombildung, thrombotischen Verschlüssen und Infektionen (Abbildung 1.7).

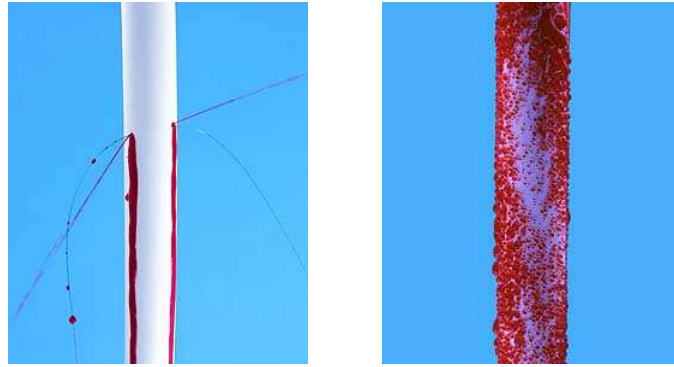


Abb. 1.7: Risiken für postoperatives Versagen von PTFE-Gefäßprothesen: Stichkanalblutung (links) und Durchtritt von Flüssigkeit („Schwitzen“, rechts) (Vascutek Internet Information 2007)

Neuere Verfahren wie das „Tissue engineering“ versuchen die Eigenschaften von Gefäßprothesen zu optimieren und die Verbindung zwischen synthetischem Ersatz und natürlichem Gewebe herzustellen. Hierzu werden verschiedene Verfahren, wie z.B. die Endothelialisierung von PTFE-Gefäßprothesen experimentell angewandt, diese sind jedoch noch nicht für die klinische Routine verfügbar (Baguneid 2006, S. 283; Shum-Tim 1999, S. 2300).

1.3 Komplikationen eines prothetischen Gefäßersatzes

Die speziellen Komplikationen der Gefäßchirurgie liegen in der Entwicklung einer Stenose bis zum Verschluss des Prothesenlumens, einem Versagen der Prothese durch Ruptur oder Anastomoseninsuffizienz sowie der Entwicklung periprothetischer Hämatome, Serome und Pseudaneurysmen. Auf die Probleme des stenotischen Versagens und der Entwicklung einer Infektion soll hier hinsichtlich der Aufgabenstellung dieser Arbeit weiter eingegangen werden:

Thrombotische Verschlüsse

Der Vorteil von Dacron- und PTFE-Gefäßprothesen liegt in ihrer ständigen Verfügbarkeit. Problematisch sind bei diesen Gefäßprothesen vor allem die Komplikationen eines Verschlusses des Gefäßlumens durch thrombotische Ablagerungen oder die überschießende Bildung einer Neointima (Seeger 1990, S. 623). Hierbei besteht kein signifikanter Unterschied im Vergleich von PTFE- und Dacron-Gefäßprothesen, wie retrospektiv z.B. an femoropoplitealen Bypässen gezeigt werden konnte. Die Durchgängigkeiten in den ersten drei Jahren lagen für PTFE-Gefäßprothesen bei 61% und für Dacron-Gefäßprothesen bei 64% (Durchmesser der Gefäßprothesen: 92% 6mm, 8% 8mm) (Post 2001, S. 228). Interponate durch die V. saphena magna zeigen sich hier dank der antithrombogenen Eigenschaften des noch vorhandenen Gefäßendothels überlegen. Nach 5 Jahren war in 76% der venösen Gefäßersatz ein Durchfluss messbar, bei PTFE-Gefäßprothesen nur in 52% (Berglund 2005, S. 415; Klinkert 2003, S. 151). Der Einsatz von synthetischen unbeschichteten Gefäßprothesen mit einem Durchmesser unter 6mm führt im Regelfall zu einem schnellen Verschluss und ist somit nicht sinnvoll. Gefäßimplantate aus Polyurethan bieten in diesem Bereich eventuell neue Möglichkeiten (Tiwari 2002, S. 192). Auch über das nötige Minimallumen hinaus zeigen Gefäßprothesen mit einem größeren Durchmesser Vorteile hinsichtlich des Auftretens von Verschlüssen. Die Durchgängigkeit bei für Dialysezwecke eingesetzten PTFE-Gefäßprothesen mit einem Durchmesser von 8mm lag nach einem Jahr bei 85%. Bei 6mm waren nur 62% intakt und Stenosen hatten eine chirurgische Intervention doppelt so häufig erforderlich gemacht (Polo 2004, S. 321).

Um den Gefahren von thrombotischen Verschlüssen entgegenzuwirken, bietet sich bei den Dacron- und PTFE-Gefäßprothesen das Auftragen von Beschichtungen an. Mit Gelatine oder Kollagen beschichtetes Dacron zeigt im Vergleich zu unbeschichtetem PTFE vergleichbare Ergebnisse (Prager 2003, S. 83). Eine antithrombogene Beschichtung durch Heparin kann in den ersten Jahren eine niedrigere Verschlussrate vorweisen (Devine 2004, S. 926).

Infektionen

Septische Komplikationen bei der Gefäßrekonstruktion entstehen wie oben beschrieben durch die intraoperative Kontamination der Wunde, respektive des Prothesenmaterials oder einer postoperativen Besiedlung durch z.B. hämatogen streuende Keime. Zu unterscheiden sind bei dieser Komplikation die verschiedenen Lokalisationen des Entzündungsgeschehens. Rein oberflächlich liegende postoperative Infektionen der Cutis und Subcutis sind strikt von den tiefen, das Prothesenlager und –material betreffenden Infektionen zu trennen (Szilagyí 1972, S. 328). Die oberflächlichen Wundkomplika-tionen sind im Vergleich zu tiefen Infektionen deutlich einfacher therapierbar, bergen jedoch auch immer die Gefahr einer in die Tiefe fortschreitenden Infektion. Periprothetische Infektionen hingegen stellen eine unmittelbare Bedrohung einer Extremität oder des Lebens des Patienten dar!

Eine aktuelle Analyse aller septischer Komplikationen von 410 autogenen und alloplastischen Gefäßinterponaten zeigt eine Komplikationsrate von bis zu 11%, welche zu 80% bei infrainguinalen Eingriffen entstehen und zu 67% als tiefe Infektion das Implantat mit betreffen. Ein Viertel der von einer tiefen Infektion betroffenen Patienten verloren als direkte Folge eine Extremität, für 11% endete die Infektion tödlich (Pounds 2005, S. 514).

Eine Sammelstatistik von 16 Autoren mit über 26 000 Patienten zeigt eine Gesamtinzidenz tiefer postoperativer Wundheilungsstörungen von 2,1%, die berichteten Einzelinzidenzen liegen zwischen 1,3% und 6% und werden auch in der aktuellen Literatur bestätigt (Berglund 2005, S. 414; Zühlke 1994, S.13). Statistiken bezüglich der Infektionsraten können nur als ungefähre Richtlinien für das durchschnittliche Infektionsrisiko gelten, da deren Vergleichbarkeiten durch Differenzen in den Patientenkollektiven hinsichtlich Alter, Begleiterkrankungen, Stadium und Ausmaß der Gefäßerkrankung, Prothesenmaterialien, Operationstechniken, infektionsprophylaktischer Maßnahmen und weiterer Einflussfaktoren eingeschränkt wird. Zu den allgemeinen Risikofaktoren wie Alter, Begleiterkrankungen usw. konnten als eindeutige weitere Risikofaktoren für die Entwicklung septischer Komplikationen ein in der Leistenregion liegendes Operationsgebiet, oberflächliche Wundkomplika-tionen und eine präoperative Hospitalisierung, durch welche nachweislich eine deutlich antibiotikaresistentere Hautbesiedlung entsteht, ermittelt werden (Antonios 2006, S. 51; Levy 1990, S. 666).

Auch der Zeitpunkt einer Revisionsoperation beeinflusst das Risiko einer Implantatsinfektion maßgeblich, revidierte Prothesen innerhalb des ersten Monats werden bis zu 25% infiziert (Kolakowski 2007, S. 61)!

Die Diagnose einer Gefäßprotheseninfektion wird anhand von klinischen Zeichen, unterstützt von radiologischen und mikrobiologischen Untersuchungen gestellt (Fitzgerald 2005, S. 996). Da die Symptome innerhalb von wenigen Tagen bis zu mehreren Monaten nach Implantation auftreten können, wurden in der Literatur die Begriffe des „*early onset*“ und „*late onset*“ eingeführt. Das *early onset* bezeichnet üblicherweise eine symptomatische Infektion innerhalb der ersten vier Monate nach Prothesenimplantation, das *late onset* ein späteres Auftreten. Bei Aortenersatz treten 2/3 als *late onset* und lediglich 1/3 als *early onset* direkt nach Implantation auf, bei anderen Gefäßersätzen sind es sogar bis zu 84% *late onsets* (Santini 1993, S. 20; Soetevent 2004, S. 447). Diese Einteilung ist bedingt durch Unterschiede des Infektionsgeschehens. Früh auftretende Infektionen zeigen klinisch meist die Zeichen einer akuten Entzündung mit Wundheilungsstörungen, Fieber, Leukozytose und Sepsis. Das Auftreten einer späten Infektion, welche im Mittel bei 10 bis zu 41 Monaten nach Implantation liegt, wird mit wesentlich diskreter ausgeprägten Befunden symptomatisch. Die aus einer spät symptomatisch werdenden Infektion resultierenden Probleme liegen in dem Versagen der Prothesen durch Thrombosen und Blutungen oder periprothetische Befunde wie Abszesse, Fisteln, falsche Aneurysmen und Schwellungen (Bandyk 2001, S. 413; Jones 1997, S. 487; Seabrook 1990, S. 631).

Die Ergebnisse mikrobiologischer Analysen von explantierten Gefäßprothesen variieren zwischen den verschiedenen Autoren hinsichtlich der Keimverteilung und deren Häufigkeit, doch waren Staphylokokken immer die am häufigsten gefundenen Keime. Der hochvirulente *S. aureus* wurde bei bis zu 64% der Proben beim *early onset* gefunden, während der niedrigvirulente *S. epidermidis* bis zu 70% der spät auftretenden Infektionen verursacht. Auch andere Bakterienstämme wie z.B. *E. coli* oder *P. aeruginosa* sind nachzuweisen. Abbildung 1.8 zeigt eine typische Keimverteilung (Bandyk 1984 104; Kaebnick 1987, S. 159; Pounds 2005, S. 514).

Microorganism isolated	Type of graft		Total (%)
	Aortoiliofemoral grafts	Extracavitary	
No growth	2	3	5 (71)
Streptococcus	0	1	1 (<1)
Staphylococcus			
S. aureus	13	27	40 (31)
S. epidermidis	33	11	44 (34)
Gram-negative rods			
E.coli	18	2	20 (15)
Pseudomonas species	6	5	11 (8)
K. pneumoniae	2	1	3 (59)
Enterococcus	5	2	7 (74)
Candida species	2	0	2 (60)
	79 isolates	49 isolates	128 isolates

Abb. 1.8: Mikrobiologisches Spektrum explantierter Gefäßprothesen (Bandyk 2001, S. 412)

Hinsichtlich bildgebender Verfahren dient die Computertomografie als Verfahren der Wahl unterstützend in der Diagnostik bei klinischem Verdacht eines Protheseninfektes, doch können gerade in frühen Stadien einer Infektion operationsbedingte Veränderungen in der Umgebung einer Prothese nicht von Entzündungsreaktionen unterschieden werden. Befunde von periprothetischen Gasansammlungen, Flüssigkeitsansammlungen und Pseudoaneurysmen können für das Vorliegen einer Infektion sprechen (Orton 2000, S. 979). Die Diagnose eines Protheseninfektes muss letztendlich jedoch durch die Summe aus klinischen, laborchemischen, mikrobiellen und bildgebenden Ergebnissen begründet werden.

Das Vorgehen bei gesicherter Infektion des Implantats besteht neben einer möglichst erregerspezifischen antibiotischen Therapie üblicherweise in der Entfernung der Prothese, des radikalen Debridements des umgebenden infizierten Gewebes und anschließender Wiederherstellung der Blutversorgung durch Reimplantation einer Gefäßprothese. Bei insuffizienter anastomotischer Versorgung der distal des Infektes liegenden Strukturen kann die zur Wiederherstellung nötige erneute Prothesenversorgung durch das Infektgebiet oder extraanatomisch erfolgen (Bunt 2001, S. 225). Obwohl die Verwendung einer unbeschichteten synthetischen Gefäßprothese gute Ergebnisse zeigt, werden bei solchen Revisionseingriffen üblicherweise Venen oder antibiotisch beschichtete Prothesen verwendet. Sie zeigen

einen besseren Schutz gegen eine Reinfektion (Kieffer 1993, S. 351; Vogt 1996, S. 642; Chiesa 2002, S. 242).

Neben den Versuchen durch verschiedene Beschichtungen einen mikrobiellen Schutz der Gefäßprothesen zu erzeugen, stellt die antibiotische Abschirmung die derzeit effektivste Methode dar. Es stehen zwei Möglichkeiten der peri- und intraoperativen Applikation von Antibiotika zur Verfügung: die systemische und die lokale Anwendung. Durch beide Therapieformen kann die Infektionsgefahr nachweislich deutlich vermindert werden (Lehnhard 2002, S. 129). Aufgrund der gestörten lokalen Infektabwehr, verursacht durch die postoperativ gestörte Blutversorgung und das Gewebetrauma, besteht die lokale Applikation mittels einer Beschichtung hierbei durch einen bereits bestehenden Schutz während der Implantation und einer lokal wesentlich höheren erreichbaren Wirkstoffkonzentration. Der beste Schutz wird durch eine Kombination beider Verfahren erzielt (Santini 1997, S. 13; Turgut 2005, S. 3).

Mit einer Gelatinebeschichtung versehene Dacron-Gefäßprothesen zeigen eine gewisse Resistenz gegenüber der Besiedlung durch *S. epidermidis* (Farooq 1999, S. 59). Eine zusätzliche Tauchbehandlung dieser Dacron-Gefäßprothesen in einem Rifampicinbad konnte einen weiter verbesserten Schutz im Tiermodell unter Beweis stellen (Goeau-Brissonniere 1994, S. 740; Lachapelle 1994, S. 678; Sardelic 1996, S. 390). Die Kombination von Rifampicin mit Gelatine oder Albumin erwies sich dabei im Vergleich zu anderen auf Gelatine oder Albumin aufgetragenen Antibiotika, darunter Vancomycin und Teicoplanin, überlegen (Galdbart 1996, S. 175; Malassiney 1996, S. 1124). Eine Gentamicinbeschichtung wurde bereits an gelatinebeschichteten Gefäßprothesen untersucht und erzeugte einen sehr wirksamen Schutz (Ginalska 2005, S. 421). Ebenfalls bewies Gentamicin bereits seine Effektivität in der Keimreduktion bzw. -entfernung bereits besiedelter Gefäßprothesen (Edmiston 2006, S. 347).

Des Weiteren wird versucht, die antibiotischen Eigenschaften von Silber zu nutzen. Ein Vergleich im Tiermodell zwischen einer auf PTFE-Gefäßprothesen aufgetragenen Silberacetatbeschichtung und einer Gelatine-Rifampicin Beschichtung konnte keinen Vorteil des Silbers gegenüber unbehandelten Prothesen belegen. Die Behandlung mit Rifampicin hingegen erzeugte einen wirksamen Schutz (Vicaretti 1998, S. 269; Goeau-Brissonniere 2002, S. 1261). Auch in einer

Beschichtungskombination aus Silber und Ciprofloxacin wird eine nachgewiesene verringerte Keimbesiedlung in vitro letztendlich nur auf den Einfluss des Antibiotikums zurückgeführt (Benvenisty 1988, S. 3).

1.4 Aufgabenstellung

Die in dieser Arbeit verwendete Biomaterialien waren Gefäßprothesen aus expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) und Filze aus Polyglykolsäure. Sie haben verschiedene Materialeigenschaften und ihr Einsatz erfolgt aufgrund unterschiedlicher Indikationen:

Alpha Graft® ePTFE-Gefäßprothesen finden Verwendung in der chirurgischen Behandlung okklusiver Arteriosklerosen, aneurysmatischer Erkrankungen, Gefäßverletzungen und der Anlage von Dialysezugängen. PTFE wurde in vielen Fällen in lebendes Gewebe implantiert, ohne dass eine Unverträglichkeit festgestellt werden konnte. Die Materialeigenschaften sorgen zum einen durch die chemische Beständigkeit für eine lange Lebensdauer und gute Verträglichkeit, zum anderen verringert die glatte Oberfläche die Entstehung von Blutgerinnseln. Der Einsatz ist daher sowohl im Medizin- als auch im Lebensmittelbereich zulässig. Sehr positiv weist sich in diesem Zusammenhang die Beständigkeit gegen Heißdampf aus, so dass PTFE-Teile im medizinischen Einsatzbereich, der Pharma- oder Lebensmittelindustrie mit Dampf gut sterilisiert werden können.

Der Soft PGA Felt® ist ein resorbierbarer Filz und besteht aus reiner Polyglykolsäure (PGA), entsprechend dem Material resorbierbarer Nahtmaterialien. Die Resorption erfolgt im Wesentlichen nach 40 bis 60 Tagen, die mechanische Festigkeit beträgt nach 7 Tagen noch 50%. Seinen Einsatz findet der Filz vor allem im kurzfristigen mechanischen Schutz unterliegenden Gewebes oder zur intraoperativen Blutungsstillung.

Sowohl PTFE-Gefäßprothesen, als auch PGA-Filze sind für verschiedene Indikationen aufgrund der sehr guten Materialeigenschaften etabliert. Eine wirkungsvolle antibiotische Beschichtung kann diese Implantate noch weiter verbessern und dadurch ihr Einsatzgebiet erweitern. Da in der Beschichtungstechnik

jedoch auch die Gefahr einer Veränderung mit unerwünschten Nebenwirkungen liegt, muss die Beschichtung folgenden Voraussetzungen gerecht werden:

Die Beschichtung sollte trotz einer ausreichenden biomechanischen Stabilität und hoher Beladung mit dem Wirkstoff die physikalischen Eigenschaften, wie z.B. Flexibilität, Porosität und Festigkeit, welche das Handling des Implantats beeinflussen, nicht oder nur geringfügig verändern. Unbedingt erforderlich ist die Biokompatibilität zur Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte im Bereich der Immunabwehr, Hämostase und Einheilung. Eine antimikrobielle Beschichtung muss auch noch nach verschiedenen Verarbeitungsschritten und insbesondere der Sterilisation einen wirksamen Schutz aufbauen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die als Lyophilisat vorliegenden Gentamicinsalze der Palmitinsäure, Laurinsäure und Natriumdodecylsulfat hinsichtlich ihrer Möglichkeiten zur Herstellung einer Beschichtung zu prüfen sowie ihre Eigenschaften als biokompatible Oberflächenbeschichtung von PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen zu testen:

- Die Herstellung einer Beschichtung sollte durch verschiedene Lösungsversuche der Wirkstoffe und den Einsatz verschiedener Techniken zum Auftragen der Beschichtung auf die Materialien ermöglicht und nachgewiesen werden.
- Untersuchungen zur mechanischen Stabilität der Beschichtung und dem Freisetzungverhalten des Gentamicins waren erforderlich.
- Einflüsse auf die Hämostase und das Komplementsystem waren nachzuweisen.
- Die Gefahr von Gewebeschädigungen aufgrund einer entstehenden Zytotoxizität musste ausgeschlossen werden.
- Der antiinfektive Schutz in Gegenwart steigender Keimzahlen war zu beweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Gentamicinsalze / Arzneistoffträger

Die Beschichtungen wurden mit den von der Firma Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland) zur Verfügung gestellten Gentamicinsalzen der Laurinsäure (Gentamicin-Laurat-Verbindung), der Palmitinsäure (Gentamicin-Palmitat-Verbindung) sowie mit Sodiumdodecylsulfat (Gentamicin-SDS-Verbindung) hergestellt.

Das Resomer R203 der Firma Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland) diente als Arzneistoffträger für verschiedene Beschichtungslösungen.

Lösungsmittel

Methanol p.A., Chloroform p.A. sowie Ethylacetat p.A. wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Materialien zur Beschichtung

Auf folgende Materialien wurden die Gentamicinbeschichtungen aufgebracht:

- Alpha Graft[®] PTFE-Gefäßprothesen (Durchmesser 6mm) der Firma Alpha Research (Berlin, Deutschland)
- Soft PGA Felt[®], ein resorbierbarer Filz aus reiner Polyglykolsäure der Firma Alpha Research (46x68x0,5mm)
- Soft PGA Felt[®], mit Gentamicin-SDS beschichtet und sterilisiert. Von der Firma Alpha Research zur Verfügung gestellt.
- Küvetten und Stempel aus Aluminium für das ROTEM[®], hergestellt in der feinmechanischen Werkstätte des Instituts für Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar München

- Reagenzgläser der Firma Assistent (Sondheim, Deutschland) (Durchmesser 10-11mm, Länge 80mm)

Biomaterialien für Kontrolluntersuchungen

- SEALPTFE™ (Gelatin Sealed Expanded PTFE Vascular Prosthesis), Durchmesser 6mm, Firma Sulzer Vascutek GmbH (Hamburg, Deutschland)
- InterGard® Knitted Silver (silberbeschichtete Dacron-Gefäßprothese), Durchmesser 6mm, Firma InterVascular® (La Ciotat, Frankreich)
- Palasept®-Tabletten der Firma Heraeus, enthalten Gentamicin-SDS.

Antibiotika

Eremfat® i.v. 600mg (Firma Fatol, Schiffweiler, Deutschland) zur Rifampicinbehandlung der SEALPTFE™ Gefäßprothesen gemäß der Gebrauchsanweisung.

Assays

Enzymimmunoassays:

- Enzygnost® F₁₊₂ micro, Firma Dade Behring (Marburg, Deutschland)
- Enzygnost® TAT micro, Firma Dade Behring
- Complement C3a-desArg ELISA, Firma Progen Biotechnik (Heidelberg, Deutschland)
- Activated Factor XIIa ELISA Kit, Firma Shield Diagnostics (Dundee, UK)

Farbstoffassay:

- Cell Proliferation Reagent WST-1, Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Biologische Materialien

- Mausfibroblasten, NIH 3T3
- Staphylokokkus epidermidis RP62a, ATCC 35984

Puffer und Nährlösungen

- PBS (Phosphate-Buffered-Saline), pH 7,2
- TSB (Tryptone Soya Broth), Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lsg., Firma Oxoid (Wesel, Deutschland)

Materialien und Zusätze zur Untersuchung der hämokompatiblen Eigenschaften

- Natriumcitrat-Lösung 3,13% der Firma Eifelfango (Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)
- EDTA-Monovetten 2,7ml der Firma Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
- INTEG und STARTEG (Firma Pentapharm, München, Deutschland) für die Bestimmungen am ROTEM[®]

Materialien zur Sterilfiltration und mikrobiologische Verfahren

- Sterilfilter (0,22µm, Minisart RSP25), Firma Sartorius (Goettingen, Deutschland)
- Mueller-Hinton II Agarplatten (Fa. Becton-Dickinson, Deutschland)

Geräte

- Präzisionswaage MC1 Research RC 210P, Firma Sartorius
- Zentrifuge Rotanta 46RC, Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- ROTEM[®]-Analysegerät, Firma Pentapharm
- Ultraschallgerät Sonorex, Firma Bandelin (Berlin, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Beschichtungstechnik

Um die in Pulverform zur Verfügung gestellten Gentamicinsalze Gentamicin-SDS, Gentamicin-Palmitat und Gentamicin-Laurat zur Herstellung einer möglichst gleichmäßigen Beschichtung verwenden zu können, mussten diese Salze in einer ausreichenden Konzentration in schnell abdampfenden organischen Lösungsmitteln vollständig gelöst werden. Hierfür wurden orientierende Lösungsversuche durchgeführt und die Technologie der Beschichtung dem jeweiligen zu beschichtenden Material angepasst.

Die Beschichtungslösung

Chloroform, Methanol sowie Ethylacetat wurden für die Versuche zur Lösung der Gentamicinsalze ausgewählt. Die Durchführung der Lösungsversuche erfolgte bei Raumtemperatur und die Löslichkeiten der Gentamicinsalze konnte in den einzelnen Lösungsmitteln bzw. einem Chloroform/Methanol-Gemisch ermittelt werden. Das Chloroform/Methanol-Verhältnis ergab sich durch die wiederholte Zugabe von 50µl Methanol zu 500µl Chloroform und 10mg Gentamicinsalz, bis sich durch das Lösen des Salzes eine klare Lösung einstellte.

Entsprechend den aus den Lösungsversuchen resultierenden Ergebnissen ergaben sich zunächst zwei unterschiedliche Beschichtungslösungen hinsichtlich der Lösungsmittel: Eine reine Methanollösung und ein Methanol/Chloroform-Gemisch.

Eine Sterilfiltration gewährleistete die nötige Keimfreiheit der Beschichtungslösung für die Untersuchungen der Zytotoxizität mit den Mausfibroblasten sowie der mikrobiellen Besiedlungsresistenz.

Aufbringen der Beschichtung

Vor dem Beschichtungsgang wurden PTFE-Gefäßprothesen, Gläser sowie ROTEM®-Materialien mit Chloroform von Fettrückständen und anhaftenden Schmutzpartikeln gesäubert.

Die Herstellung der Proben für die Untersuchungen zur Mikrobiologie und Zytotoxizität erfolgte unter „lamina-air-flow“ Bedingungen und, wenn erforderlich, unter Verwendung von sterilfiltrierten Lösungen.

Mittels einer Präzisionswaage war es möglich, die aufgebrauchte Beschichtungsmenge durch die Bestimmung der Gewichts Differenz zwischen unbeschichtetem und beschichtetem Werkstück zu ermitteln.

PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze

Die vor dem Beschichtungsgang auf die nötigen Maße zugeschnittenen Gefäßprothesen und PGA-Filze wurden 30 Minuten in die entsprechende Gentamicinlösung eingetaucht. Ein anschließendes Lufttrocknen, bei welchem die Prothesen bzw. Filze mit Hilfe von Nadeln fixiert wurden, gewährleistete die möglichst gleichmäßige Beschichtung auf der gesamten Oberfläche. Um bei den Versuchen zur Hämokompatibilität eine Veränderung der Gefäßprothesenlänge zu verhindern, wurden die Proben während des Trocknens an beiden Enden mit Hilfe von Nadeln in der für den Versuch bereits zugeschnittenen Länge fixiert.

Des Weiteren wurden die von der Firma Alpha Research Deutschland mit Gentamicin-Palmitat beschichteten und durch Ethylenoxid sterilisierten PTFE-Gefäßprothesen ohne weitere Behandlung für die nachfolgenden Versuche verwendet.

ROTEM®-Materialien

In die aus Aluminium gefertigten Küvetten und Stempel wurden 600µl Beschichtungslösung (entspricht 10mg gelöstem Gentamicinsalz) einpipettiert und das Lösungsmittel bei 37°C im Trockenschrank abgedampft. Ein Tauchen der dazugehörigen Stempel über mehrere Minuten ermöglichte deren gleichmäßige Beschichtung.

Beschichtete Reagenzgläser

An den Reagenzgläsern wurde außen eine 3ml Einfülllinie markiert. Die Beschichtung erfolgte über das Befüllen mit 1ml Beschichtungslösung (entspricht 16,7mg gelöstem Gentamicinsalz), welche zur schnelleren Verdunstung bei 50°C in

den Trockenschrank gestellt wurde. Durch regelmäßiges schräges Drehen zum Benetzen der Gläser bis zur markierten Einfülllinie wurde versucht, die Beschichtung bis zum Verdunsten der Lösungsmittel möglichst gleichmäßig aufzutragen.

Beschichtete Wells

In jedes der Wells einer 96-Well-Platte wurden 50µl der Beschichtungslösung (entspricht 0,8mg gelöstem Gentamicinsalz) pipettiert und unter dem Abzug luftgetrocknet. Als Beschichtungslösung diente hier die reine Methanollösung ohne Chloroformzusatz.

Beschichtungen mit dem Resomer R203

Zwei Beschichtungsvarianten wurden mit dem Arzneistoffträger R203 für die Elutionsversuche hergestellt: Das Resomer R203 diente als Überzug einer bereits aufgetragenen Gentamicin-Palmitat-Beschichtung oder als Zusatz zu einer mit Gentamicin-Palmitat hergestellten Lösung.

Für die Herstellung eines R203-Überzugs wurde eine zuvor beschichtete PTFE-Gefäßprothese einem zweiten, 10 Sekunden andauernden Beschichtungsgang in einer Lösung aus 400mg R203 und 3ml Chloroform unterzogen. Sowohl nach der Gentamicin-Palmitat-Beschichtung als auch nach der R203-Beschichtung wurde die Gewichts Differenz mittels Präzisionswaage bestimmt.

Als weiterer Beschichtungsansatz wurde 1g R203 mit 100mg Gentamicin-Palmitat in 1ml Methanol und 6,5ml Chloroform gelöst. Die anschließende Beschichtung der PTFE-Gefäßprothese erfolgte wieder über einen 30-minütigen Tauchgang. (Zur Übersicht der R203-haltigen Beschichtungslösungen siehe Tabelle 2.1)

Beschichtungsart	Beschichtungsmenge	Lösungsmittel
R203-Lösung	400mg R203	3ml Chloroform
Kombination aus R203 und G-Palmitat	1000mg R203 + 100mg G-Palmitat	1ml Methanol + 6,5ml Chloroform

Tabelle 2.1: Beschichtungslösungen mit R203

2.2.2 Freisetzungsversuche

Um das Freisetzungsverhalten des Gentamicins aus den Beschichtungen beurteilen zu können wurden Gläser, PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze mit unterschiedlichen Beschichtungen sowie die zwei Elutionsmedien PBS und Plasma verwendet. Alle Elutionen erfolgten bei einer Temperatur von 37°C. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Bestimmung der Gentamicinkonzentration durch das Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum r. d. Isar (TDx-Assay, Fa. Abbott) bei -20°C eingefroren.

Beschichtete Reagenzgläser

Der Versuch wurde mit den wie oben beschrieben beschichteten Reagenzgläsern durchgeführt und mit 3ml PBS eluiert.

Beschichtete PTFE-Gefäßprothesen

Die Elution erfolgte in den so genannten 12er Nunc Wells mit je zwei Prothesenstücken von 2cm Länge. Das Elutionsmedium PBS wurde nach jeder Probennahme von 1ml zu den Zeitpunkten 15min, 30min, 1h, 4h, 8h, 24h vollständig ausgetauscht.

Zum Vergleich einer Plasma- und PBS-Elution wurden je zwei mit Gentamicin-Palmitat beschichtete, 2cm lange PTFE-Prothesen in 7ml PBS oder 7ml Citratplasma eluiert. Zusätzlich zu den oben genannten Entnahmezeitpunkten wurde nach zwei Stunden eine weitere Probe entnommen. Das Probenvolumen betrug bei diesem Versuch 500µl, ein Austausch des Elutionsmediums wurde nicht durchgeführt.

Beschichtete PGA-Filze

Entsprechend der PBS-Elution der PTFE-Prothesen wurden PGA-Filze (1cm x 1cm) eluiert. Hierzu wurden zwei selbst hergestellte, mit Gentamicin-Palmitat beschichtete PGA-Filze sowie zwei bereits fertig zur Verfügung gestellte, mit Gentamicin-SDS beschichtete PGA-Filze verwendet. Das durchschnittliche Beschichtungsgewicht der Gentamicin-Palmitat-Filze betrug 1,6mg bei einem mittleren Gesamtgewicht der Filze von 26,4mg. Das Beschichtungsgewicht der Gentamicin-SDS-Filze ist aufgrund

fehlender Herstellerangaben unbekannt, das mittlere Einzelgewicht der Elutionsproben wurde mit 29,6mg ermittelt.

Beschichtungskombinationen des Gentamicin-Palmitats und des Resomers R203

Die Gentamicinkonzentrationen wurde nach Elution in PBS der beiden 2cm langen Gefäßprothesen durchgeführt. Es wurden folgende Varianten untersucht: Gentamicin-Palmitat-Beschichtung, Gentamicin-Palmitat-Beschichtung mit Resomer R203-Überzug sowie eine kombinierte Gentamicin-Palmitat-R203-Beschichtung (s.o.).

Die Elution jeder Gefäßprothese wurde in 20ml PBS durchgeführt. Zu den gleichen Zeitpunkten wie in den Gefäßprothesenelutionen beschrieben, wurden 500µl Proben genommen und die Elution noch bis zum vierten Tag mit einer weiteren Probennahme fortgeführt. Auch bei diesem Versuch wurde das entnommene PBS nicht ersetzt.

2.2.3 Untersuchungen zur Hämokompatibilität

Um eine Beeinflussung der Gerinnungsvorgänge durch die verwendeten Materialien und die Beschichtungen zu charakterisieren, wurden mit Proben gesunder Spender Globaluntersuchungen mit dem Thrombelastogramm durchgeführt sowie die Marker der aktivierten Gerinnung mittels Enzymimmunoassay bestimmt.

Rotationsthrombelastographie

Die Durchführung der Thrombelastogramme in den beschichteten, bzw. den als Kontrolle dienenden unbeschichteten ROTEM[®]-Küvetten, erfolgte mit 300µl frisch abgenommenem und durch Citrat antikoaguliertem Blut zweier gesunder Probanden. Durch das Zugabe von 10µl INTEG sowie 10µl STARTEG wurde die Gerinnung aktiviert und die Aufzeichnungen unmittelbar nach dem Befüllen der Küvetten gestartet. Nach frühestens 35 Minuten wurde der Versuch beendet.

Aus mindestens 14 Proben pro Beschichtung wurden die Gerinnungszeit (*Clotting Time*, CT) und Gerinnselfestigkeit (*Maximum Clot Firmness*, MCF) bestimmt. Die *Clotting time* beschreibt die Zeit bis zum Erreichen eines durch die Gerinnselfestigkeit hervorgerufenen definierten Widerstandes, der die Stempelrotation innerhalb des ROTEM®-Gerätes behindert. Die *Maximum Clot Firmness* wird zwischen 0mm bei keinem und 100mm bei einem maximalen Widerstand gemessen.

Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems

Der aktivierte Faktor XII, das Prothrombinfragment F₁₊₂ und die Thrombin-Antithrombin III-Komplexe dienen als serologische Marker des Gerinnungssystems. Da Blutkontakt mit bestimmten Oberflächen eine Komplementaktivierung nach sich ziehen kann, wurde außerdem das aus dem sehr kurzlebigen C3a entstehende C3a-desArg im inkubierten Serum bestimmt.

Die nach der Inkubationszeit nötige Gerinnungshemmung erfolgte durch das Zusetzen von 10% Citrat für die Gerinnungsfaktoren oder durch EDTA für den Komplementfaktor.

Die Assays wurden innerhalb von zwei Stunden nach Abschluss der Inkubation durchgeführt.

Beschichtete Reagenzgläser

Blut gesunder Spender wurde sofort nach dessen Entnahme bis zur wie oben beschrieben eingezeichneten Markierung am Glas eingefüllt, nach 7-minütiger oder 11-minütiger Inkubationszeit wieder abgesaugt und sofort durch 10% Citrat oder EDTA antikoaguliert.

Dieser Versuch wurde an drei Gläsern je Beschichtung für die Inkubationszeit von 7 Minuten sowie an je zwei Gläsern zur Gegenüberstellung einer 7- und 11-minütigen Inkubationszeit durchgeführt.

Nach dem Absaugen der Proben konnten die nicht fest an den Glaswänden haftenden Blutreste durch ein zweimaliges Waschen der Gläser mit PBS entfernt und die Unterschiede in der Gerinnselfestigkeit zwischen den verschiedenen Beschichtungen somit fotografisch dokumentiert werden.

Beschichtete Gefäßprothesen

Für diesen Versuch wurden insgesamt fünf verschieden behandelte Gefäßprothesen verwendet. Unbeschichtete PTFE-Gefäßprothesen dienten als Kontrollen, mit Gentamicinsalzen beschichtete PTFE-Prothesen, mit Silber beschichtete Dacron-Gefäßprothesen sowie durch Gelatine beschichtete PTFE-Gefäßprothesen als behandelte Vergleichsprothesen. Die mit Gelatine beschichtete PTFE-Gefäßprothese wurde unbehandelt oder behandelt (durch ein 5minütiges Tauchen in Rifampicinlösung, wie in der ihr mitgelieferten Gebrauchsanweisung beschrieben) verwendet.

Die Gefäßprothesen wurden auf eine Länge von 8,1cm zugeschnitten und um eventuelle Veränderungen während der Inkubation zu verhindern, in hierfür zugeschnittenen Falcon-Tubes eingespannt. Außerdem wurde das untere Ende durch speziell zugeschnittene Combifix-Adapter verschlossen (zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 2.2).



Abb. 2.1: Zur Untersuchung der Hämokompatibilität eingespannte PTFE-Gefäßprothesen

Bei dieser Länge war eine Befüllung mit mindestens 2ml Blut möglich, welches vorsichtig über eine ausreichend lange Nadel blasenfrei in die Prothese gefüllt wurde. Die Inkubation endete nach 7 Minuten durch vorsichtiges Absaugen in zuvor mit Citratlösung, bzw. EDTA vorbereitete Spritzen.

Eine der Inkubation folgende makroskopischen Beurteilung sowie Fotodokumentation der Gefäßprotheseninnenwände konnte nach einem vorsichtigem Aufschneiden und Fixieren der Prothesen durchgeführt werden.

Beschichtete PGA-Filze

Die verwendeten 7,5cm x 2cm großen PGA-Filze wurden, wie auf den Fotos der Abbildungen 2.2 zu sehen, ringförmig an die Wand von 50ml fassenden Falcon-Tubes eingelegt. Beschichtete sowie unbeschichtete Filze blieben auch während der Inkubation stabil in dieser Position stehen. Ähnlich der Versuchsdurchführung an den beschichteten Gläsern wurde den Falcon-Tubes frisch entnommenes Blut bis zur 15ml Einfüllmarke zugegeben, so dass die PGA-Filze vollständig mit Blut bedeckt waren. Nach 7-minütiger Inkubation wurde der Versuch durch das Absaugen und Antikoagulieren des Blutes beendet.

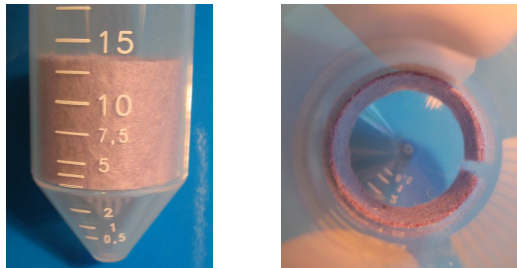


Abb. 2.2: Zur Untersuchung der Hämokompatibilität vorbereitete PGA-Filze

2.2.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität

Die Versuche zur Zytotoxizität der verschiedenen Beschichtungen und Biomaterialien nach Kontakt mit Mausfibroblasten wurden mit Hilfe des Farbstoffassays WST-1 der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Die Bestimmungen erfolgten mit Hilfe von 7000 Mausfibroblasten (NIH 3T3) pro Well, welche in 150µl Nährmedium für 24h mit den jeweiligen Proben, bzw. in den beschichteten Wells bei 37°C inkubiert wurden. Nach dem Entfernen der Gefäßprothesen- oder PGA-Filzproben aus den Wells, um die Absorptionsmessung nicht zu stören, wurde der Assay durch die Zugabe von 10µl WST-1 Indikator gestartet. Die photometrischen Messungen erfolgten achtmal

im Abstand von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450nm bzw. im Referenzbereich von 610nm.

Zytotoxizität der Gentamicinsalze sowie beschichteter PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze

Zur Prüfung der Gentamicinsalze wurden hier die wie oben beschrieben beschichteten 96-Well-Platten mit jeweils 8 beschichteten Wells pro Gentamicinsalz verwendet. Außerdem wurden ca. 1mm x 1mm große Stücke aus sterilen PTFE-Gefäßprothesen geschnitten und parallel zum direkten Vergleich inkubiert. Als Kontrollen dienten unbeschichtete Wells und unbeschichtete PTFE-Gefäßprothesenstücke. Stücke aus einer mit Gentamicin-Palmitat beschichteten PTFE-Gefäßprothese wurden zum Vergleich der Zytotoxizität der Gentamicin-Palmitat-Beschichtung auf dem Well zur PTFE-Gefäßprothese verwendet.

Die zur Inkubation beschichteter PTFE-Gefäßprothesen verwendeten 1mm x 1mm großen Proben wurden aus zuvor steril beschichteten PTFE-Gefäßprothesen geschnitten. Der Testablauf mit den 16 Proben pro Gentamicinsalz verlief weiter wie oben beschrieben. Nach dem Entfernen der Prothesenstücke nach der Inkubationszeit konnten Fotos der auf dem Wellboden anhaftenden Mausfibroblasten angefertigt werden, die bereits mikroskopisch Unterschiede zwischen der Zellmorphologie je nach Inkubation erkennen ließen (siehe Abb. 3.21).

Zytotoxizität kommerzieller Gefäßprothesen

Die zum Vergleich der hämokompatiblen Eigenschaften verwendeten Prothesentypen, die mit Silber beschichtete Dacron-Gefäßprothesen sowie die ohne Rifampicin vorbehandelte Gelatine-beschichtete PTFE-Gefäßprothesen wurden mit den selbst beschichteten PTFE-Gefäßprothesen anhand der Inkubation von 1mm x 1mm großen Stücken verglichen.

Zytotoxizität verschiedener Gentamicin-SDS-Träger

Durch die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchung der mit Gentamicin-SDS beschichteten PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze wurde in diesem Versuch zusätzlich zu diesen beiden Trägern das Kalziumsulfat (Palasept[®]), welches auch mit

bereits eingearbeitetem Gentamicin-SDS zur Verfügung gestellt wurde, als Trägerstoff den unbeschichteten und mit Gentamicin-Palmitat beschichteten PTFE-Gefäßprothesen gegenübergestellt. Während PTFE-Gefäßprothese und PGA-Filz wieder auf 1mm x 1mm große Stücke zugeschnitten wurden, konnte die Kalziumsulfat-Tablette nicht in entsprechend kleine Stücke zerteilt werden. Aus diesem Grund wurden 0,5mg-1mg des zerriebenen Kalziumsulfats in die Wells gefüllt und die abschließenden photometrischen Messungen noch mit dem im Well verbleibenden Pulver durchgeführt. Der dadurch entstehende Fehler konnte durch die Verrechnung mit den gemessenen Absorptionswerten der Referenzwellenlänge von 610nm minimiert werden.

Zytotoxizität beschichteter PGA-Filze

Entsprechend den Versuchen mit beschichteten PTFE-Gefäßprothesen wurden aus beschichteten und unbeschichteten PGA-Filzen 1mm x 1mm große Stücke geschnitten und der Nährlösung mit Testzellen für 24h beigefügt.

2.2.5 Mikrobiologische Versuche

Der Biofilm bildende Keim Staphylokokkus epidermidis (RP62a / ATCC 35984) wurde als Testkeim für die mikrobiologischen Versuche verwendet. Dieser wurde 24h vor jedem Versuch auf Mueller-Hinton II Agarplatten neu angezüchtet.

Für die mikrobiologischen Versuche wurden 1cm lange, selbst beschichtete PTFE-Prothesenstücke oder entsprechend 1cm lange Stücke der Silber- bzw. Gelatine-Prothesen eingesetzt.

Die Besiedlungsresistenz der beschichteten Gefäßprothesenstücke wurde in Abhängigkeit von der Restbeschichtung untersucht. Hierzu wurde die beschichtete Gefäßprothese steril in 10ml PBS für zwei Stunden eluiert. Das gewonnene Eluat wurde anschließend mit 10000 CFU Staphylokokkus epidermidis beimpft und nach mindestens 2 Stunden Bebrütungszeit die Konzentration der noch lebenden Staphylokokken in den verschiedenen Gentamicineluaten durch das Ausplattieren von 100µl Elutionslösung bestimmt.

Weiter wurden die eluierten und die nicht eluierten Prothesenstücke mit *S. epidermidis* wie folgt inkubiert:

Über die densitometrische Einstellung der Staphylokokkenkonzentrationen in PBS-Lösungen auf einen Wert von McFarland 0,5 (= 5×10^7 CFU/ml) konnten durch Verdünnungen Bakterienlösungen mit den Konzentrationen 1000 CFU/ml, 5000 CFU/ml und 10 000 CFU/ml in einer Nährlösung aus 9/10 PBS und 1/10 TSB (Tryptone Soya Broth) hergestellt werden. Die Inkubation der eluierten sowie uneluierten Proben erfolgte für 17h bei 37°C in 2ml der Bakterienlösungen.

Nach dieser Zeit wurden je 50µl der Inkubationslösung ausgesät, die Prothesenstücke entnommen, dreimal in PBS gewaschen, um nicht adhärente Keime zu entfernen und danach 10min lang in 1ml PBS mit Ultraschall behandelt. Von dieser Lösung mit ggf. abgelösten Keimen wurden 100µl zum Nachweis dieser Keime ausgesät.

Die Auswertung aller ausgesäten Proben erfolgte nach 24stündiger Bebrütung über die Bestimmung der Koloniezahlen.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen der 1cm x 1cm großen PGA-Filze - mit bzw. ohne Beschichtung - war das Vorgehen entsprechend.

3. Ergebnisse

3.1 Beschichtungstechnik

Die Beschichtungsversuche umfassten Untersuchungen zur Löslichkeit der Gentamicinsalze, die Herstellung einer Beschichtungslösung, die Beschichtung von PTFE-Gefäßprothesen, PGA-Filzen, ROTEM[®]-Materialien und Reagenzgläsern. Beschichtungskombinationen aus dem Arzneistoffträger Poly-D,L-Laktid (R203) und den Gentamicinsalzen wurden zum Vergleich der mechanischen Stabilität durchgeführt.

Die Lösungsversuche der Gentamicin-Laurat, -Palmitat sowie -SDS-Salze in den Lösungsmitteln Methanol, Chloroform und Ethylacetat zeigten, dass diese Gentamicinsalze in Ethylacetat praktisch unlöslich sind und auch die Lösung in Chloroform nur sehr schlecht möglich ist. Im Gegensatz hierzu ist die Löslichkeit in Methanol sehr hoch (siehe Tabelle 3.1), hochkonzentrierte Lösungen sind hierdurch herstellbar.

Gentamicinsalz	Methanolvolumen				
	50µl	100µl	150µl	200µl	350µl
10mg					
Gentamicin-Palmitat	-	-	-	-	gelöst
Gentamicin-SDS	-	-	-	gelöst	
Gentamicin-Laurat	-	gelöst			

Tabelle 3.1: Löslichkeit der Gentamicinsalze in Methanol

Von den eingesetzten Lösungsmitteln ist Methanol die am langsamsten abdampfende Verbindung. Zur Herstellung einer möglichst gleichmäßigen Beschichtung ist jedoch ein schnelles Abdampfen notwendig. Es wurde daher eine Beschichtungslösung aus einem Chloroform/Methanol-Gemisch entwickelt, welche einen möglichst niedrigen Methanolanteil enthält (siehe Tabelle 3.2).

Gentamicinsalz	Methanolzusatz zu 500µl Chloroform	
	50µl	100µl
Gentamicin-Palmitat	-	gelöst
Gentamicin-SDS	gelöst	
Gentamicin-Laurat	gelöst	

Tabelle 3.2: Löslichkeit der Gentamicinsalze im Chloroform/Methanol-Gemisch

Die Ergebnisse der Lösungsversuche zeigten, dass Gentamicin-Palmitat schwerer als Gentamicin-SDS und Gentamicin-Laurat in Lösung zu bringen ist.

Aus diesen Bestimmungen ergaben sich für eine Lösung von 250mg Gentamicinsalz in einem Chloroform/Methanol-Gemisch folgende Zusammensetzungen:

Gentamicinsalz	Lösungsmittelmenge		
	Chloroform	Methanol	Gesamt
250mg			
Gentamicin-Palmitat	12,5ml	2,5ml	15ml
Gentamicin-SDS	13,75ml	1,25ml	15ml
Gentamicin-Laurat	13,75ml	1,25ml	15ml

Tabelle 3.3: Lösungsmittelzusammensetzung zur Lösung der Gentamicinsalze

Diese empirisch ermittelten Mischungen wurden für die Beschichtungslösungen eingesetzt. Die zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendete Lösung in Methanol bezieht sich auf 250mg der Gentamicinsalze in 15ml Methanol.

Durch den Tauchvorgang wurden ca. 1mg bis 2mg der Gentamicinsalze pro Zentimeter Prothesenlänge auf die PTFE-Gefäßprothesen aufgebracht. Die Menge der anhaftenden Beschichtung variierte dabei weniger zwischen den Einzelbeschichtungen innerhalb eines Beschichtungsganges (Intrachargenvarianz), als zwischen verschiedenen Beschichtungsgängen (Interchargenvarianz). So zeigten die Beschichtungen pro Zentimeter PTFE-Gefäßprothesenlänge geringe Standardabweichungen. Zwischen den Herstellungsversuchen variierte das Beschichtungsgewicht allerdings zwischen $1^{mg/cm}$ - $2^{mg/cm}$ der Gefäßprothesen (siehe Tabelle 3.4).

Gentamicinsalz	Charge		
	1	2	3
Gentamicin-Palmitat	1,59mg ($\pm 0,04$)	2,27mg ($\pm 0,18$)	1,16mg ($\pm 0,11$)
Gentamicin-SDS	1,32mg ($\pm 0,04$)	1,98mg ($\pm 0,28$)	1,08mg ($\pm 0,16$)
Gentamicin-Laurat	1,48mg ($\pm 0,06$)	2,03mg ($\pm 0,22$)	1,07mg ($\pm 0,12$)

Tabelle 3.4: Beschichtungsgewichte pro Zentimeter PTFE-Gefäßprothese

Da die Gefäßprothesen während des Trocknens zusammengezogen werden und so an Länge, nicht jedoch an Durchmesser verlieren, ist immer eine Fixation der Enden nötig.

Die sehr weichen PTFE-Gefäßprothesen verloren durch die Beschichtung etwas an Flexibilität, blieben jedoch immer noch deutlich leichter formbar als die mit Silber oder Gelatine beschichteten Gefäßprothesen. Noch deutlicher wurde die Versteifung nach Beschichtung mit dem Arzneistoffträger Poly-D,L-Laktid (s.u.).

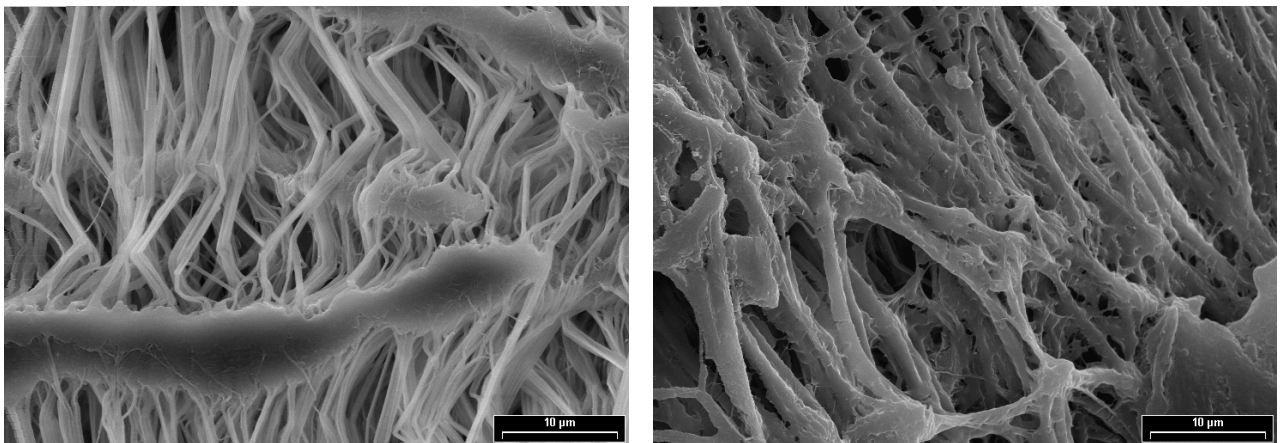


Abb. 3.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer PTFE-Gefäßprothese (links: unbeschichtet, rechts: Gentamicin-Palmitat-beschichtet; Bilder: Dr. Vogt)

PGA-Filze enthielten bis zu 2,1mg Beschichtung pro Quadratzentimeter Filz, es waren auch hier deutliche Schwankungen der Beschichtungsmenge unabhängig vom verwendeten Gentamicinsalz zu beobachten ($1,4 - 2,1 \text{ mg/cm}^2$). Der Filz wurde durch die Beschichtung in der Handhabung ebenfalls etwas fester.

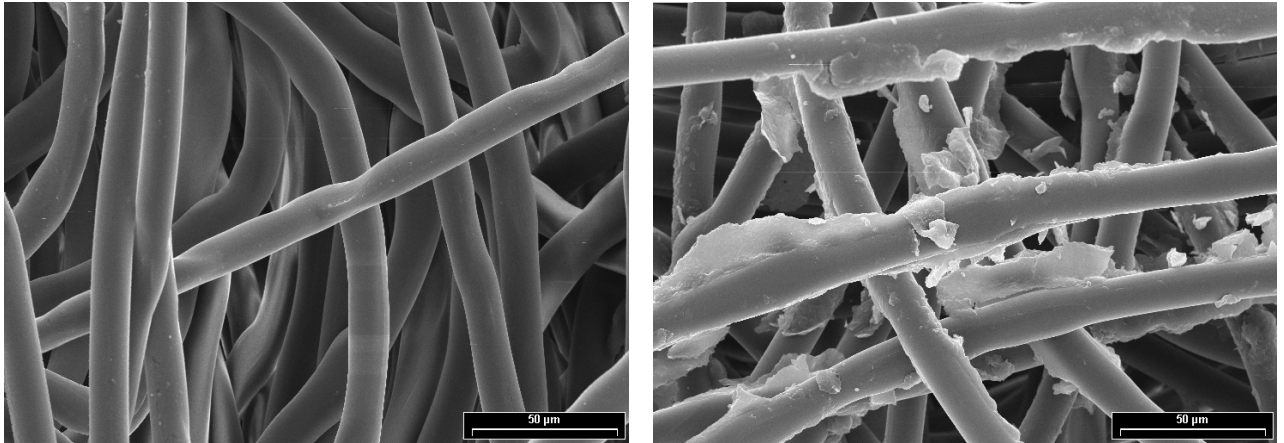


Abb. 3.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines PGA-Filzes (links: unbeschichtet, rechts: mit Gentamicin-Palmitat-Beschichtung; Bilder: Dr. Vogt)

Die Beschichtung von Reagenzgläsern entstand durch das Drehen der Gläser während des Verdunstungsprozesses, hierdurch wurde eine die gesamte Glasinnenwand auskleidende Beschichtung erreicht.

Gentamicinsalz	Beschichtungsgewicht
Gentamicin-Palmitat	15,5mg (\pm 0,69)
Gentamicin-SDS	15,2mg (\pm 0,76)
Gentamicin-Laurat	15mg (\pm 0,82)

Tabelle 3.5: Beschichtungsgewichte der Gläser zur Bestimmung der Hämokompatibilität

Die Beschichtung der Gläser fiel aufgrund der immer konzentrierter werdenden Lösung bereits makroskopisch als unregelmäßig ausgebildet auf. Mikroskopische Aufnahmen bestätigten diese Beobachtung (siehe Abb. 3.3). Wie durch die Elutions- und Hämokompatibilitätsversuche weiter belegt wurde, ist Glas keine geeignete Oberfläche, um eine Gentamicinsalz-Beschichtung in dieser Technik gleichmäßig und stabil aufzutragen.

Untersuchungen mit beschichteten Metalloberflächen zeigten ebenfalls eine geringe Haftfestigkeit im trockenen Zustand (Nagelprobe), die Beschichtungen der PTFE-Gefäßprothesen sowie PGA-Filze erwiesen sich als deutlich stabiler, was deren poröser Struktur zugeschrieben wird.

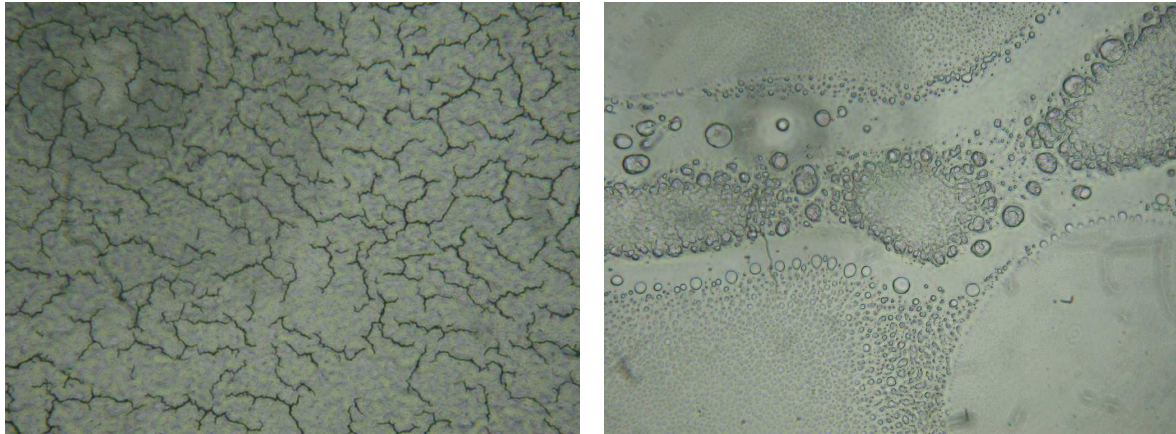


Abb. 3.3: Mikroskopische Aufnahme der unregelmäßigen Beschichtungen auf Glas (links: Gentamicin-Palmitat, rechts: Gentamicin-SDS)

Beschichtungen mit dem Resomer R203

Aufgrund der geringen mechanischen Stabilität auf glatten Oberflächen sollten Versuche mit dem Arzneistoffträger Poly-D,L-Laktid (R203) neue Wege für eine stabilere Haftung aufzeigen sowie eine weitere Retardierung des Gentamicins innerhalb der Beschichtungen ermöglichen.

Die auf einer Metallplatte aufgetragene Kombination aus Gentamicin-Palmitat und dem Arzneistoffträger R203 ergab eine mechanisch deutlich stabilere Beschichtung, was anhand der so genannten Nagelprobe bestätigt wurde.

3.2 Elutionen

Den Berechnung der Gentamicinbase in den Eluaten wurden folgende Daten zugrunde gelegt (Heraeus / Dr. Vogt):

Gentamicinsalz	Gentamicinbase
	(Massenanteil)
Gentamicin-Palmitat	26%
Gentamicin-SDS	25%
Gentamicin-Laurat	31%

Tabelle 3.6: Gehalt der Gentamicinbase in den verschiedenen Gentamicinsalzen

Beschichtete Reagenzgläser

In diesem Versuch erwies sich jede auf das Glas aufgetragene Gentamicinsalz-Beschichtung als sehr leicht ablösbar, da sich trotz vorsichtigem Wechsel des Elutionsmediums die Beschichtung nach dem zweiten Wechsel als Häutchen in der Elutionsflüssigkeit wieder fand. Aus diesem Grund wurde der Versuch bereits nach 30 Minuten abgebrochen. Diese Beobachtung wiederholte sich bei mehreren Elutionsversuchen und bestätigte die relativ geringe Haftstabilität an Glasoberflächen.

Beschichtete PTFE-Gefäßprothesen

Die Daten belegen eine rasche Freisetzung der eingearbeiteten Gentamicinverbindungen.

Die Konzentration der aus den Beschichtungen gelösten Gentamicinbase zeigte nach acht Stunden keinen weiteren signifikanten Anstieg. Bezogen auf die nach 24 Stunden erreichte Gesamtkonzentration wurde innerhalb der ersten acht Stunden ca. 90% der aufgetragenen Gentamicinbase freigesetzt. Im Einzelnen ergaben sich folgend Werte: Gentamicin-SDS: 89%, Gentamicin-Palmitat: 93%, Gentamicin-Laurat: 95% (Siehe Abbildung 3.4).

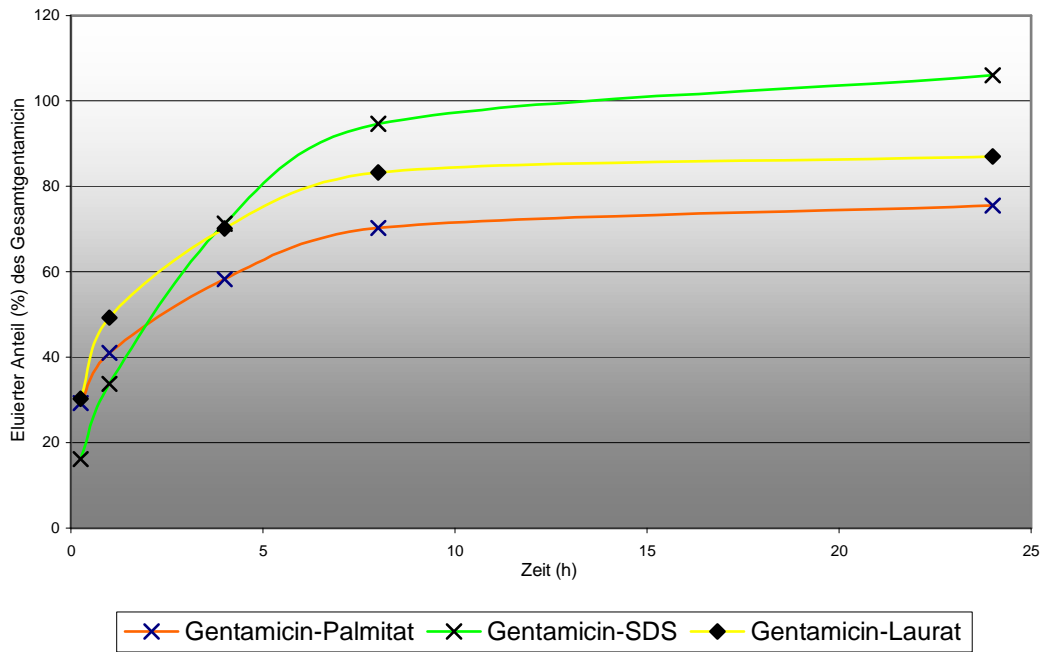


Abb. 3.4: Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PTFE-Gefäßprothesen

Die mittels TDx-Essay bestimmte Menge an Gentamicinbase entsprach in keiner Weise der zu erwartenden Konzentration. TDx-Bestimmungen des Gentamicin-SDS ergaben eine höhere Konzentration, bei Gentamicin-Palmitat sowie Gentamicin-Laurat wurde die Sollmenge nicht erreicht.

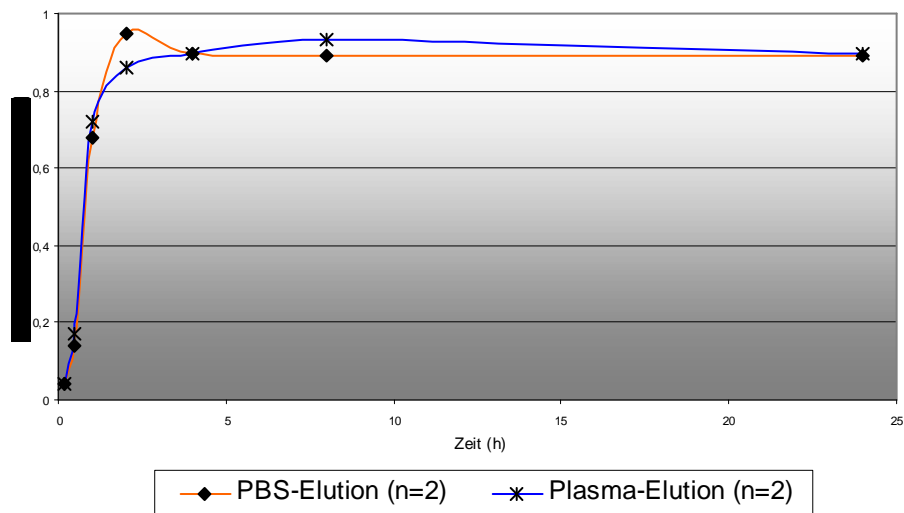


Abb. 3.5: Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PTFE-Gefäßprothesen in Abhängigkeit von der Elutionsflüssigkeit

Die Elutionen in den Medien PBS und Plasma ergaben keinen Anhalt hinsichtlich eines veränderten Freisetzungsverhaltens der Gentamicinbase aus den mit Gentamicin-Palmitat beschichteten PTFE-Gefäßprothesen (siehe Abbildung 3.5). Somit sind die Elutionsergebnisse mit PBS auch auf die Verhältnisse im Blut übertragbar.

Die vorhandene Gentamicinbase ging innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden Elutionszeit praktisch vollständig in Lösung.

Beschichtete PGA-Filze

Die Elutionen der Gentamicinbase aus den beschichteten PGA-Filzen weisen ein im Prinzip vergleichbares Freisetzungsverhalten wie die der PTFE-Gefäßprothesen auf. Auch in diesen Versuchen wurde die Gentamicinbase zum größten Teil innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden freigesetzt.

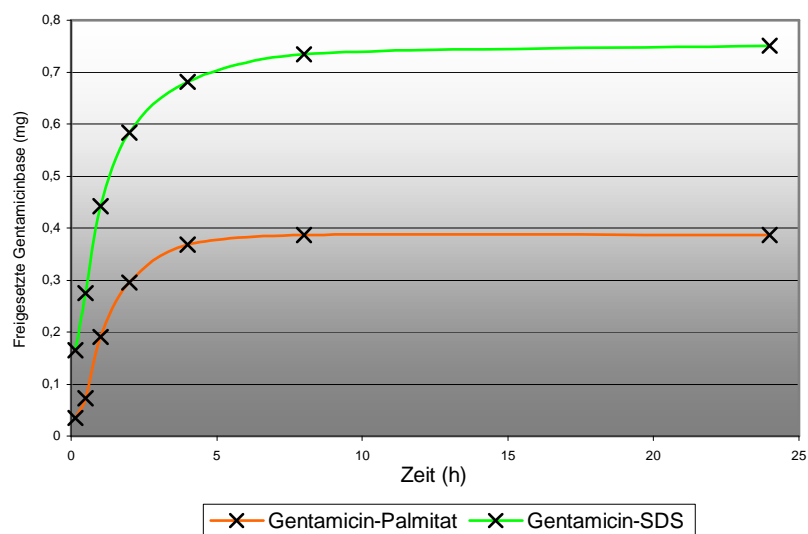


Abb. 3.6: Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PGA-Filzen

Elution aus PTFE-Gefäßprothesen nach Kombination von Gentamicin-Palmitat mit dem Arzneistoffträger Resomer R203

Durch die Kombination mit einer Gentamicin-Palmitat-Beschichtung sollte die schon bekannte retardierende Wirkung des Poly-D,L-Laktids R203 auf die Gentamicinfreisetzung geprüft werden. Die Ziele waren eine höhere Abriebstabilität sowie ein zusätzlicher retardierender Effekt.

Durch beide Versuchsansätze zur Kombination des Poly-D,L-Laktids und Gentamicin-Palmitats konnten Beschichtungen mit einem höheren durchschnittlichen Beschichtungsgewicht als das des reinen Gentamicin-Palmitats erreicht werden.

Beschichtung	Beschichtungsgewicht	
	Erster Beschichtungsgang	Nach R203-Überzug
Gentamicin-Palmitat-Beschichtung	5,27mg	14,83mg
Gentamicin-Palmitat mit R203 Überzug	5,09mg	
Gentamicin-Palmitat-R203 Beschichtung	31,69mg	

Tabelle 3.7: Beschichtungsgewichte der mit Gentamicin-Palmitat und R203 hergestellten Beschichtungsvarianten (2cm lange Prothesenstücke)

Weder ein Einarbeiten des Gentamicin-Palmitats in eine R203-Beschichtung, noch ein Überzug der bestehenden Gentamicin-Palmitat-Beschichtung mit R203 konnte eine verzögerte Freisetzung des Gentamicins bewirken. Bereits nach wenigen Minuten kam es zur Freisetzung von Gentamicin und es bestanden keine Unterschiede hinsichtlich der Freisetzung zwischen den drei verschiedenen Beschichtungsmodifikationen (siehe Abbildung 3.7).

Somit blieb die größere mechanische Belastbarkeit im Sinne einer erhöhten Abriebsfestigkeit der einzige Effekt von R203.

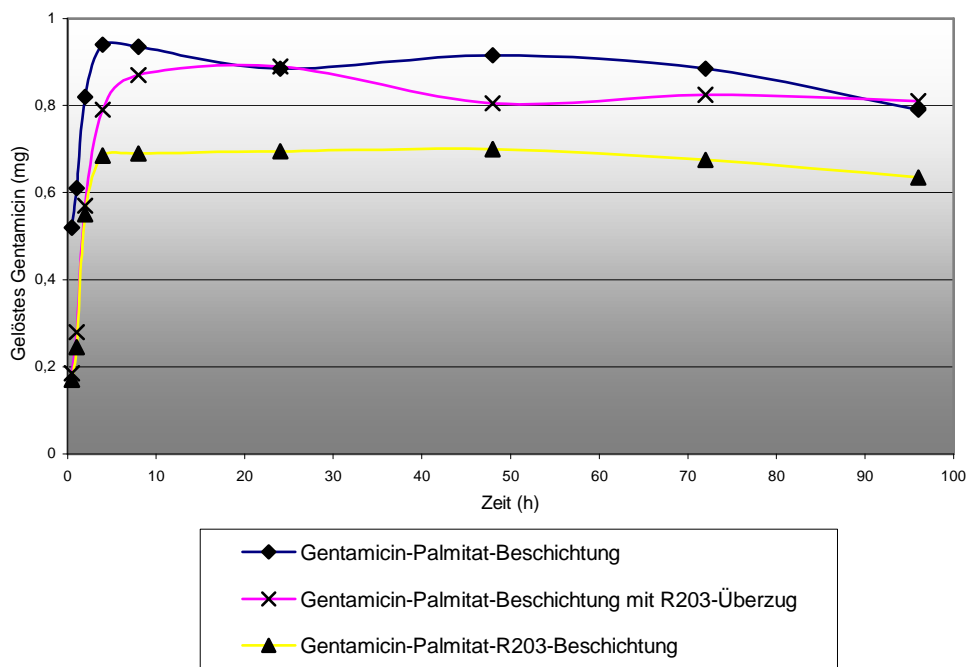


Abb. 3.7: Elution der Gentamicinbase aus PTFE-Gefäßprothesen mit verschiedenen G-Palmitat- und R203-Beschichtungen

3.3 Untersuchungen zur Hämokompatibilität

Rotationsthrombelastographie

Die Beeinflussung von Gerinnungsvorgängen durch verschieden beschichtete Oberflächen kann mit behandelten ROTEM[®]-Küvetten und Stempeln im Vergleich zu unbehandelten Proben bestimmt werden.

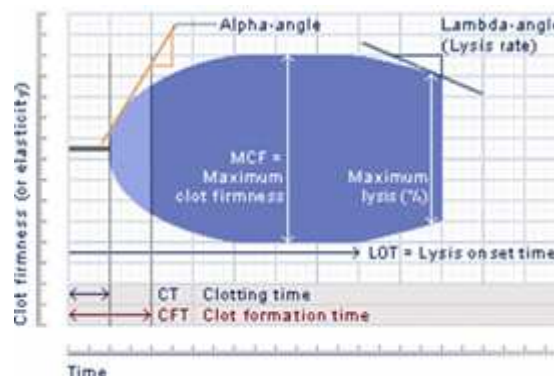


Abb. 3.8: Schema der ROTEM[®]-Messparameter

Die Gerinnungszeit (CT) sowie die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) wurden zur Charakterisierung der lokalen Gerinnungsvorgänge herangezogen (siehe Abbildung 3.8).

Während der Herstellung von beschichteten ROTEM[®]-Küvetten wurde durch das Eintrocknen der Beschichtungslösungen eine die gesamte Küvette auskleidende Beschichtung erzeugt. Es entstand in Folge der Konzentrationserhöhung der Gentamicinsalze beim Abdampfen der Lösungsmittel eine zum Küvettenboden hin stärker werdende Beschichtung.

Die Stempel wurden mit dem oben beschriebenen Tauchverfahren beschichtet.

Hinsichtlich der Gerinnungszeit waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Beschichtungen messbar. Die Ergebnisse zeigten, dass in der Reihenfolge Gentamicin-Palmitat, Gentamicin-Laurat, Gentamicin-SDS eine Verlängerung der Gerinnungszeit eintritt. Die untersuchten Gentamicinsalze wiesen alle eine leichte Verzögerung der Blutgerinnung auf.

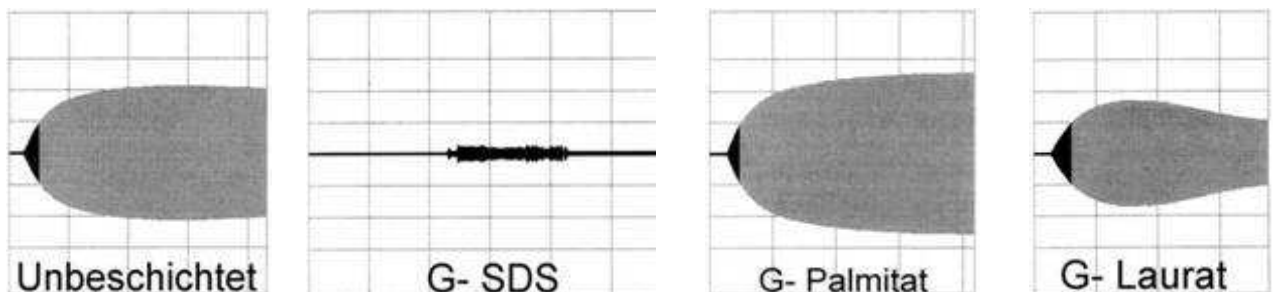


Abb. 3.9: Grafiken der Gerinnungsparameter bei ROTEM[®]-Untersuchungen

In der Abbildung 3.9 sind die ROTEM[®]-Diagramme der verschiedenen Beschichtungen dargestellt und illustrieren die oben beschriebenen Ergebnisse. Die Thrombelastogramme des Gentamicin-Laurat lassen aufgrund der deutlich abnehmenden Gerinnselfestigkeit über die Zeit eine Fibrinolyse vermuten, der zur Quantifizierung nötige Lambda-Winkel wurde bei den Messungen in diesem Versuchsaufbau allerdings nicht berücksichtigt.

Gerinnungsparameter	Beschichtungen			
	Unbeschichtet (n=25)	G-SDS (n=14)	G-Palmitat (n=17)	G-Laurat (n=18)
Gerinnungszeit (sec)	152,8 (±51,6)	Nicht messbar	165,8 (±48,4)	254,3 (±147,5)
Gerinnselfestigkeit (mm)	50,3 (±10,5)	max. 12	56 (±5,2)	32,9 (±10,4)

Tabelle 3.8: Gerinnungszeiten und Gerinnselfestigkeit der ROTEM®-Untersuchungen

Durch die Gentamicin-Palmitat-Beschichtung trat eine geringe Verlängerung der Gerinnungszeit auf. Deutlicher kam die antikoagulierende Eigenschaft in der Gentamicin-Laurat-Gruppe hervor, in welcher sich die Gerinnselfestigkeit im Mittel deutlich auf 254 Sekunden verlängerte, während die Gerinnselfestigkeit stark vermindert bei 32mm lag. Eine messbare Gerinnung der durch Gentamicin-SDS beschichteten Proben trat nach Blutkontakt bei 9 von 14 Proben überhaupt nicht ein. Entsprechend konnten hier weder CT noch MCF ermittelt werden. Bei den Messungen lagen die Zeiten bis zur Gerinnselfestigkeit sehr variabel zwischen 230 Sekunden und 1700 Sekunden bei einer minimalen Gerinnselfestigkeit von durchschnittlich 5mm.

Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems

Nach Blutkontakt beschichteter und unbeschichteter Reagenzgläser, sowie der Gefäßprothesen und PGA-Filze wurden die Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems bestimmt.

Beschichtete Reagenzgläser

Gentamicin-Palmitat und Gentamicin-SDS beschichteten Gläser zeigte keine eindeutige Tendenz einer veränderten Aktivierung. Eine Erhöhung des Komplementfaktors C3a konnte für die Gentamicin-SDS-Beschichtung bestätigt werden.

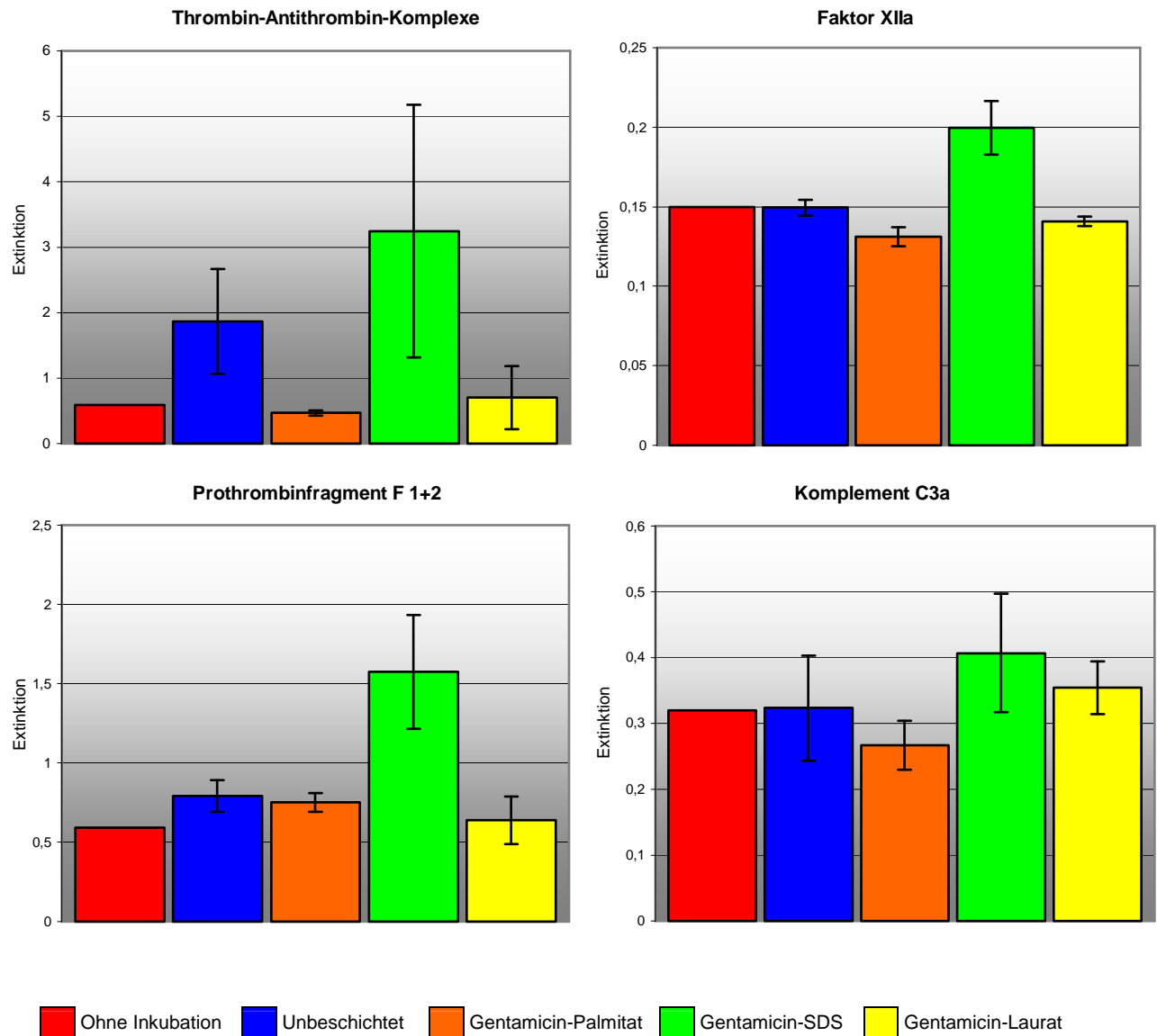


Abb. 3.10: Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7-minütiger Inkubation beschichteter Gläser

Beim Vergleich einer 7-minütigen und 11-minütigen Inkubation wurden unbeschichtete Gläser sowie mit Gentamicin-SDS und Gentamicin-Palmitat beschichtete Gläser untersucht.

Eine deutliche Erhöhung des Prothrombinfragments F_{1+2} trat nach der 7-minütigen sowie 11-minütigen Inkubation auf. Die Konzentration des Faktors XIIa der mit Gentamicin-Palmitat und Gentamicin-SDS beschichteten Gläser zeigte keine eindeutige Tendenz einer veränderten Aktivierung. Eine Erhöhung des

Komplementfaktors C3a konnte für die Gentamicin-SDS-Beschichtung bestätigt werden.

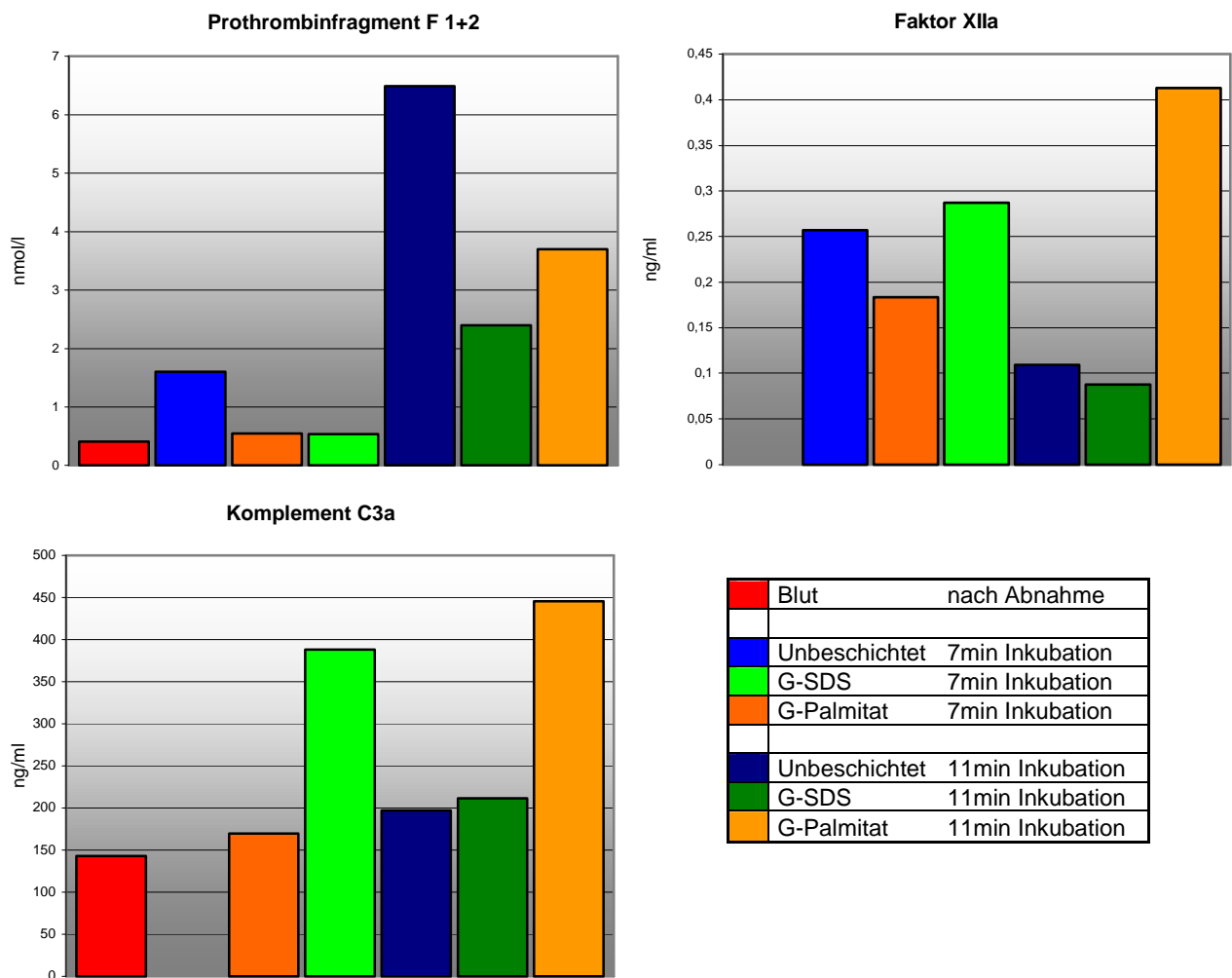


Abb. 3.11: Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7- und 11-minütiger Inkubation beschichteter Gläser

Durch die Inspektion der nach 7-minütiger Inkubation vom nicht geronnenen Blut befreiten Gläser wurde das unterschiedliche Ausmaß der Thrombenbildung an den Glaswänden als Bestätigung der ROTEM[®]-Untersuchungen deutlich (siehe Abbildungen 3.12). Die bei allen beschichteten Gläsern aus diesen Versuchsreihen aufgetretenen scharf abgegrenzten Bereiche mit deutlicher Thrombenanlagerung ließen eine nicht gleichmäßig auf dem Glas haftende Beschichtung vermuten. Weder beim Absaugen der Blutproben noch dem Waschen der Gläser bestand ein Hinweis auf die Ablösung der Beschichtung von den Gläsern.

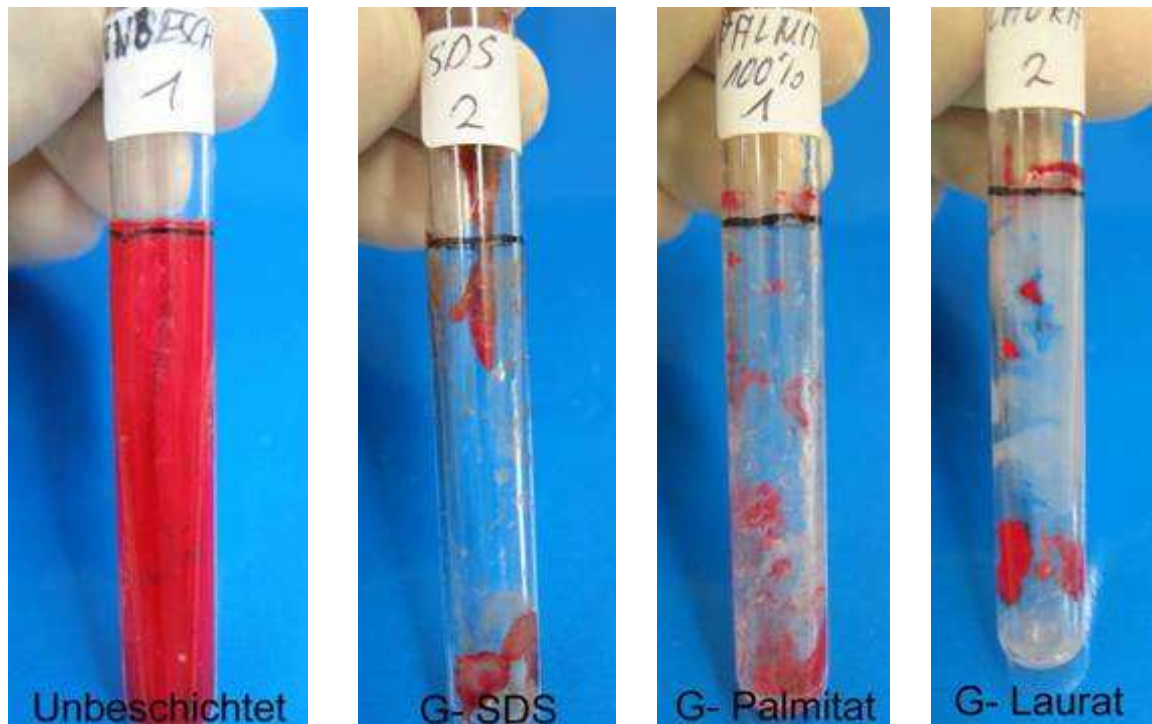


Abb. 3.12: Blutgerinnsel an ausgewaschenen Gläsern nach 7-minütiger Inkubation

Bei der Gewinnung der Plasmaproben aus dem abgesaugten Blut fiel eine aufgetretene Hämolyse in den mit Gentamicin-SDS beschichteten Gläsern auf. Im Gegensatz dazu war auch nach 11-minütigem Kontakt mit der Gentamicin-Palmitat-Beschichtung keine Hämolyse zu erkennen.

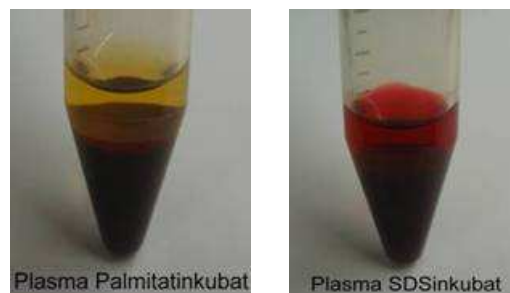


Abb. 3.13: Hämolyse nach Inkubation Gentamicin-SDS-beschichteter Gläser

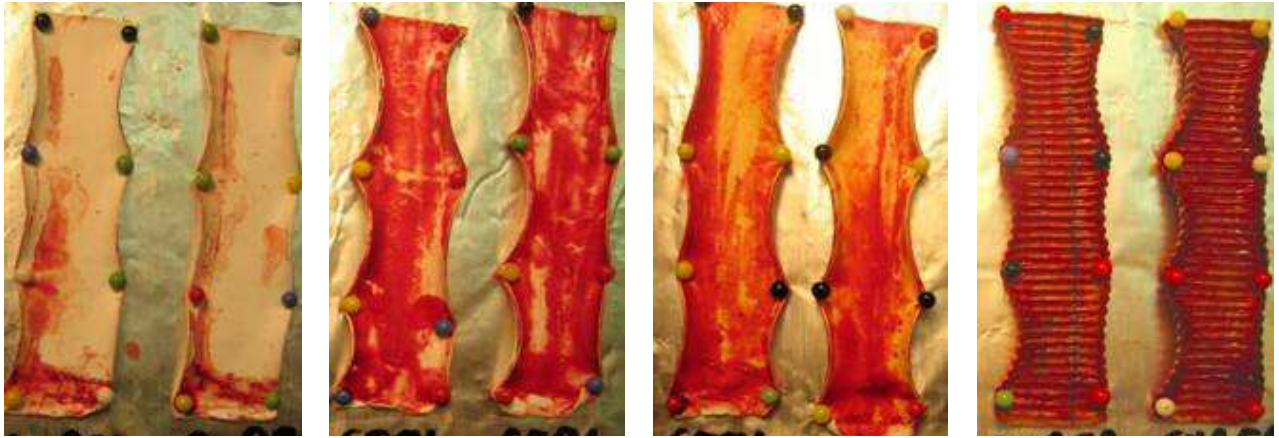
Beschichtete Gefäßprothesen nach Blutkontakt

Für diese Untersuchungen wurden unbeschichtete PTFE-Gefäßprothesen und Handelsprodukte, wie die mit Gelatine beschichtete PTFE-Prothese sowie mit Silber beschichtete Dacron-Prothese, zur Kontrolle herangezogen. Die selbst hergestellten Beschichtungen sowie die von Heraeus mit Gentamicin-Palmitat beschichteten und sterilisierten PTFE-Gefäßprothesen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe hierzu Abbildung 2.1) getestet und die Marker der aktivierten Gerinnung sowie des Komplementsystems analysiert. Die Beschichtungsgewichte der für die Hämokompatibilitätsuntersuchungen eingesetzten PTFE-Gefäßprothesen lagen bei ca. 1 mg/cm Prothesenlänge.

Nach Blutkontakt wurden die PTFE-Gefäßprothesen gewaschen und aufgeschnitten. Wie in den Abbildungen 3.14a und 3.14b zu sehen ist, kam es zu keiner Ablagerung von Thromben in den unbeschichteten, als auch in den mit Gentamicin-Palmitat beschichteten Prothesen.



Abb. 3.14a: Innenseite verschiedener PTFE-Gefäßprothesen nach 7-minütigem Blutkontakt



1
 2
 3
 4
 Beschichtungen: 1 Gentamicin-Palmitat 2 Gelatine mit Rifampicin
 3 Gelatine ohne Rifampicin 4 Silberacetat

Abb. 3.14b: Innenseite verschiedener Gefäßprothesen nach 7-minütigem Blutkontakt

Der direkte Vergleich von silber- sowie gelatinebeschichteten Gefäßprothesen mit beschichteten PTFE-Gefäßprothesen zeigte vermehrte Blutablagerungen, welche auch auf die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zurückzuführen waren. Das Waschen der in Abbildung 3.14b gezeigten Gefäßprothesen unterblieb und bei diesen Proben ist somit das Blut in Folge des Antrocknens in den Prothesen zu erkennen. Trotzdem zeigt die mit Gentamicin-Palmitat versehene PTFE-Gefäßprothese eine geringere Menge des anhaftenden Blutes.

Bei den beschichteten Proben aus eigener Herstellung lag die Konzentration des Prothrombinfragments F_{1+2} nur bei der Gentamicin-SDS-Beschichtung über der der unbeschichteten Proben, Gentamicin-Palmitat sowie Gentamicin-Laurat zeigten eine deutlich niedrigere Konzentration. Diese Daten belegen eine reduzierte Aktivierung der Gerinnung und somit antithrombogene Eigenschaften.

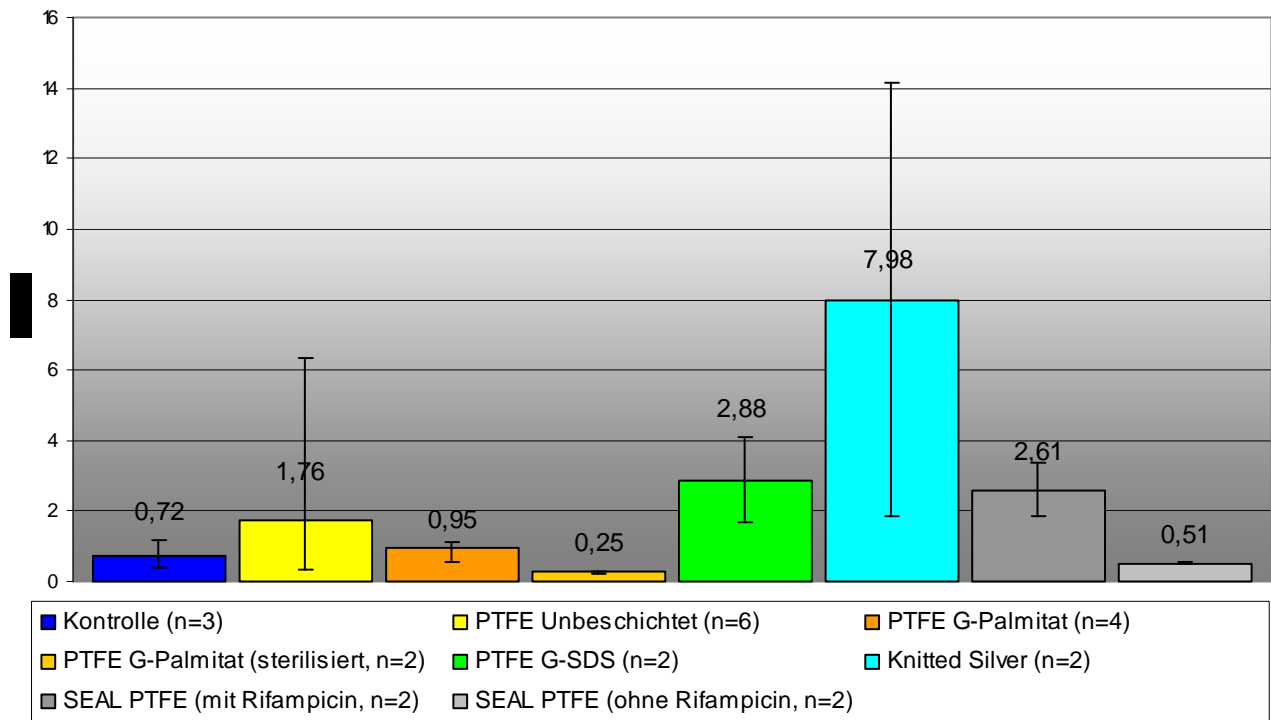


Abb. 3.15: Prothrombinfragment F_{1+2} nach 7-minütiger Inkubation verschiedener Gefäßprothesen

Die zwei Messwerte der mit Silber beschichteten Dacron-Gefäßprothesen sind sehr uneinheitlich. Es entstanden durch Inkubation der SEALPTFE-Gefäßprothese ohne die zusätzliche Behandlung mit Rifampicin sehr niedrige F_{1+2} -Konzentrationen, nach dem Tauchen in Rifampicin erhöhte sich der Wert auf das Niveau der Gentamicin-SDS-Beschichtung.

Die nach Blutkontakt erreichten Konzentrationen des F_{1+2} bei den mit Gentamicin-Palmitat sowie Gelatine beschichteten Gefäßprothesen lagen innerhalb des Referenzbereiches von $0,4 - 1,1 \text{ nmol/l}$.

Die Bestimmung von aktiviertem Faktor XII in den Konzentrationsmessungen der verschiedenen Gefäßprothesen ergab keinen Hinweis für eine Aktivierung dieses Faktors (siehe Abbildung 3.16).

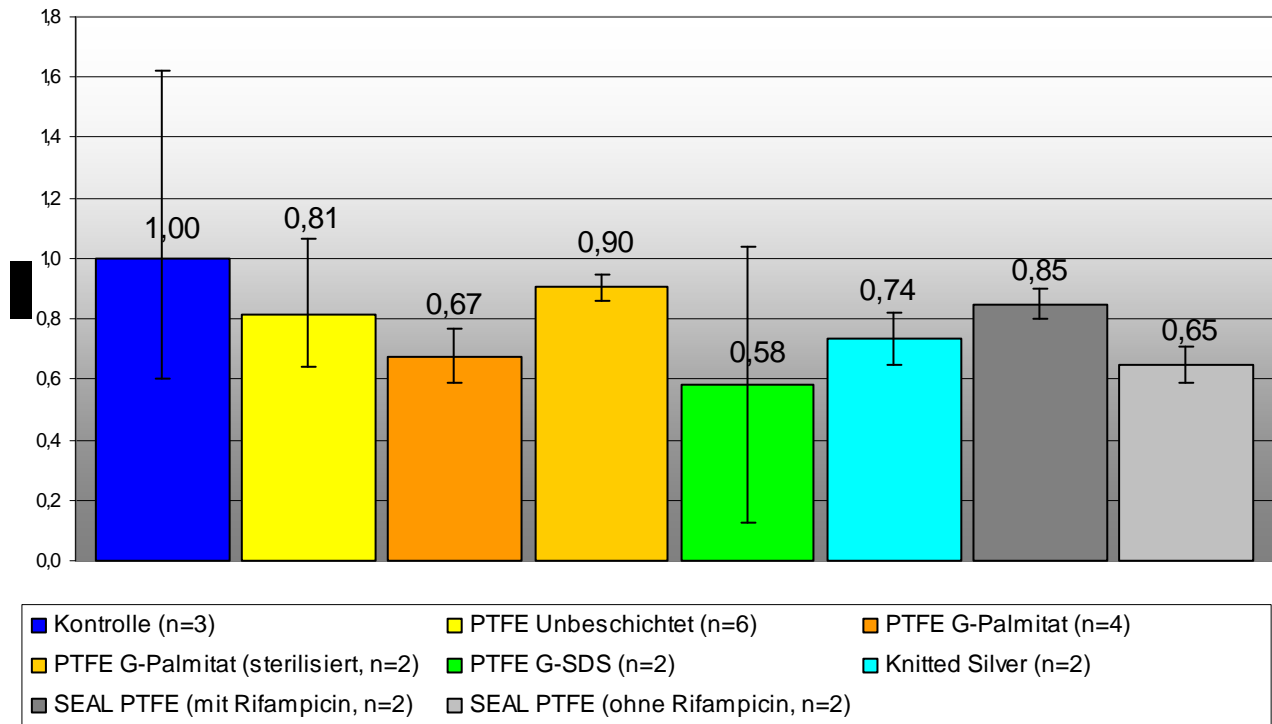


Abb. 3.16: Faktor XIIa nach 7-minütiger Inkubation verschiedener Gefäßprothesen

Die Ergebnisse der zwei mit Gentamicin-SDS beschichteten PTFE-Gefäßprothesen waren allerdings sehr uneinheitlich, wie an den im Diagramm markierten Fehlerindikatoren der Minimal- und Maximalwerte deutlich wird. Der für diesen Faktor definierte Grenzwert von einer Konzentration von $3^{ng/ml}$ dient als Hinweis auf eine erhöhte Gerinnungsaktivität. Er wurde in keiner der untersuchten Gefäßprothesen erreicht.

Nach Blutkontakt der silberbeschichteten Dacron-Gefäßprothesen entstanden sehr hohe Konzentrationen der Thrombin-Antithrombin III-Komplexe. Nach Kontakt der mit Rifampicin behandelten Gefäßprothese waren die TAT-Werte höher als in der unbeschichteten PTFE-Gefäßprothese. Sowohl in den mit Gentamicin-Palmitat, als auch den nur mit Gelatine beschichteten Gefäßprothesen lag die Konzentration der Komplexe unter dem Kontrollwert der unbeschichteten Kontrollgefäßprothesen (siehe Abb. 3.17).

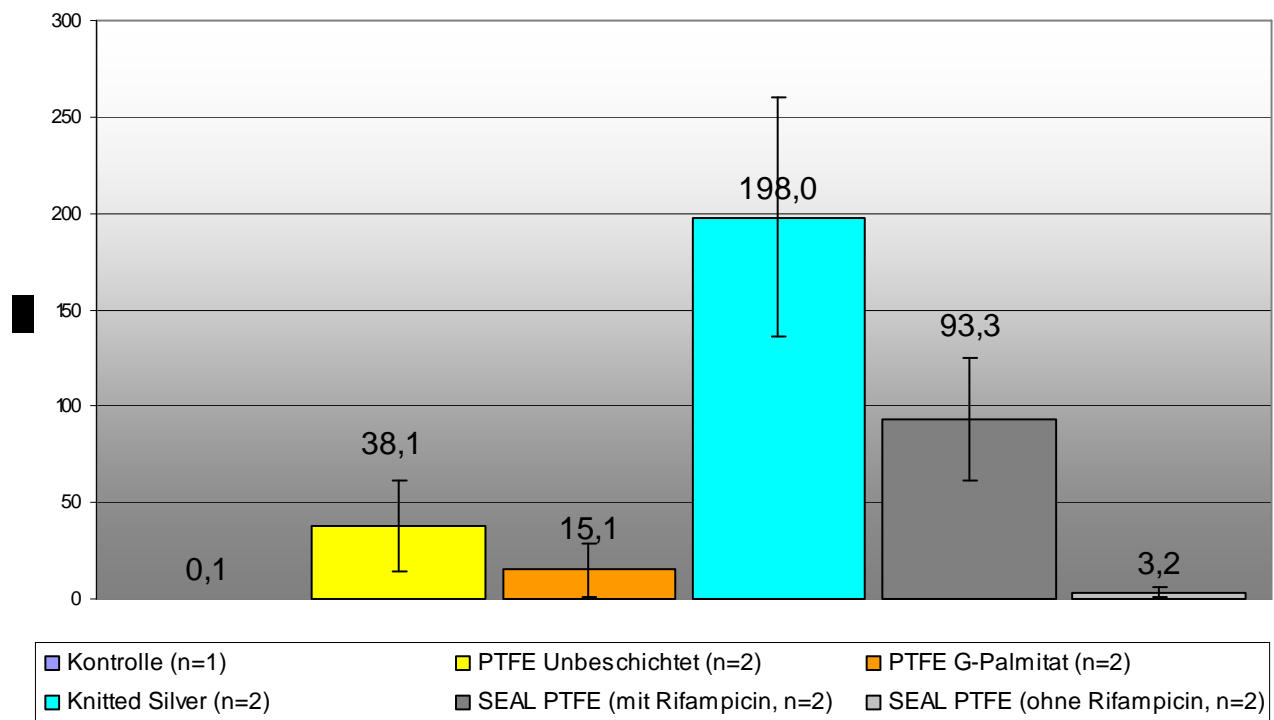


Abb. 3.17: Thrombin-Antithrombin III-Komplexe nach 7-minütiger Inkubation verschiedener Gefäßprothesen

Der Referenzbereich dieses Markers für gesunde Probanden liegt zwischen $1,0^{\mu\text{g}}/\text{l}$ – $4,1^{\mu\text{g}}/\text{l}$. Wie in Abbildung 3.17 aufgeführt wird, lagen nur die Messwerte der gelatinebeschichteten PTFE-Gefäßprothese innerhalb dieser Grenzen.

Für den Marker C3a des aktivierten Komplementsystems blieben die mit Gentamicin-Palmitat beschichteten sowie die gelatinebeschichteten PTFE-Gefäßprothesen im Referenzbereich von maximal $200^{\text{ng}}/\text{ml}$. Deutlich wurde dieser Grenzwert des C3a von den silberbeschichteten Dacron-Gefäßprothesen, den sterilisierten Gentamicin-Palmitat- sowie den unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen überschritten (siehe Abb. 3.18).

Diese Daten zeigten für die Gentamicin-Palmitat beschichteten PTFE-Gefäßprothesen sowie den unbehandelten mit Gelatine beschichteten PTFE-Gefäßprothesen vertretbare Aktivierungen des Komplementsystems.

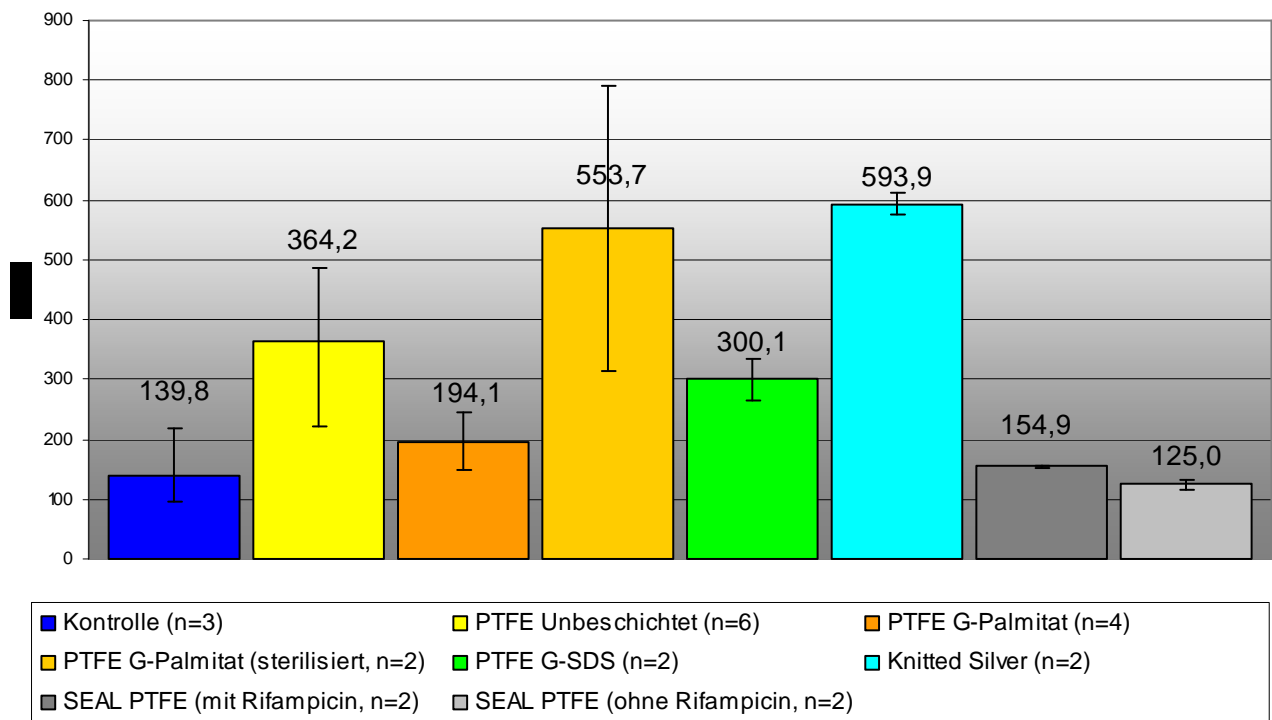
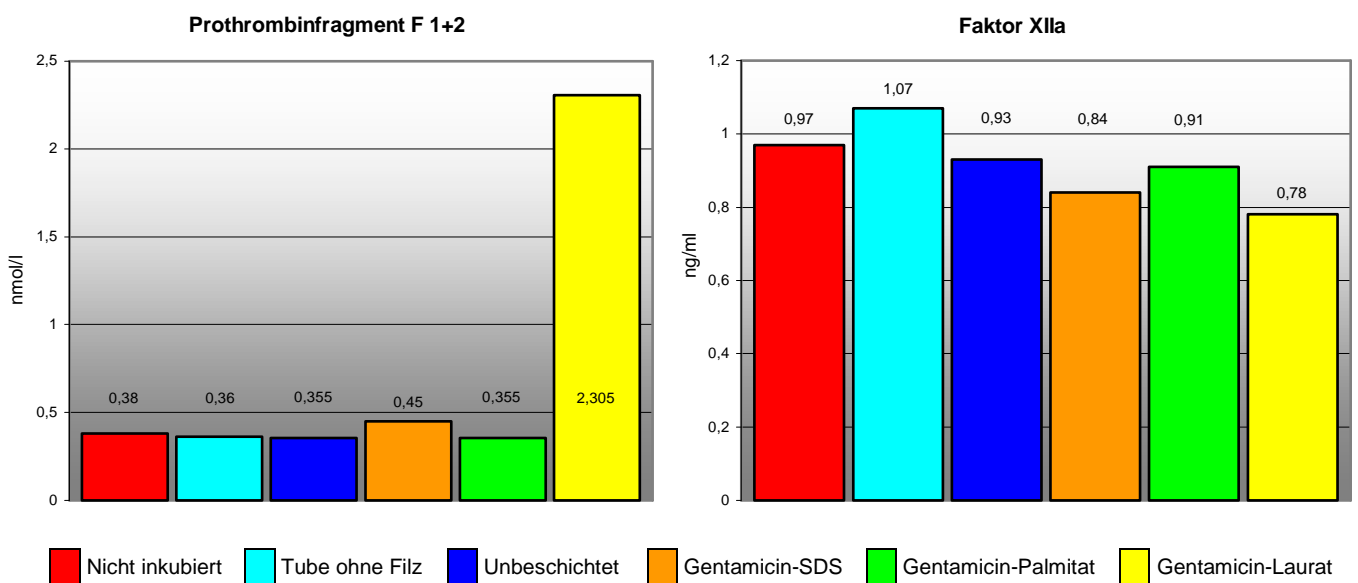


Abb. 3.18: Komplementfaktor C3a nach 7-minütiger Inkubation verschiedener Gefäßprothesen

Beschichtete PGA-Filze



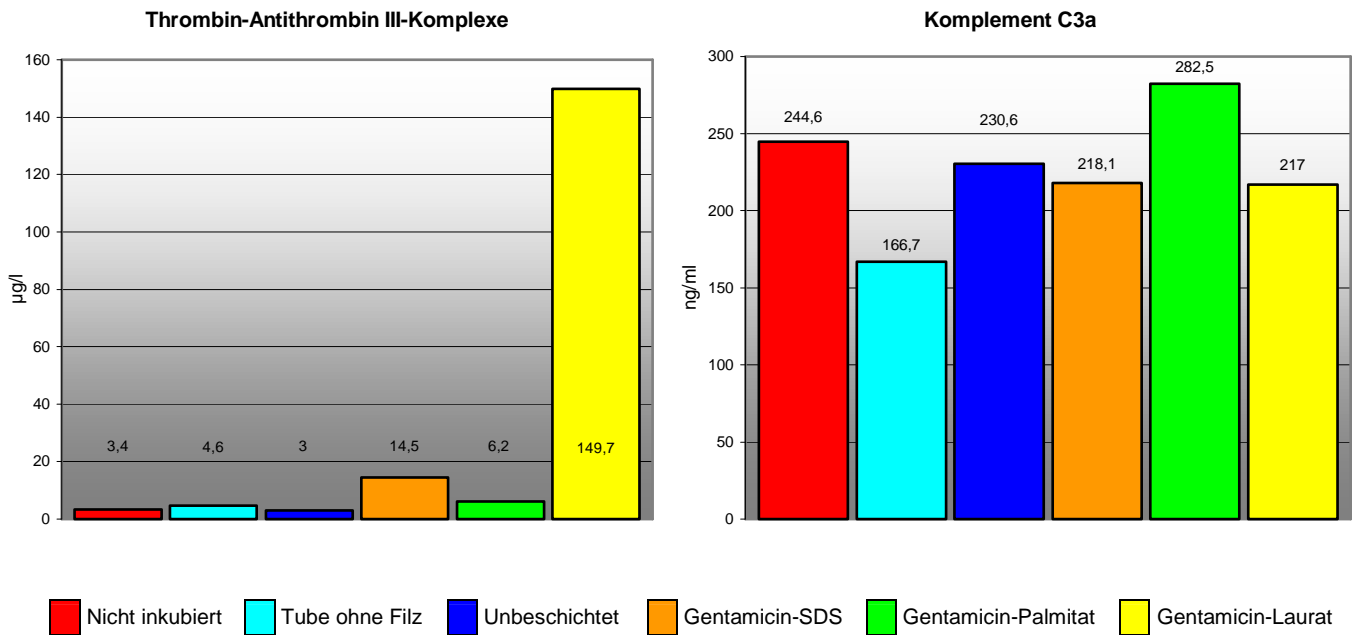


Abb. 3.19: Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7-minütiger Inkubation beschichteter PGA-Filze

Die Untersuchungen der Aktivierungsmarker wurden nach 7-minütigem Blutkontakt der PGA-Filze durchgeführt. Die Ergebnisse der Gerinnungsmarker fielen bei den beschichteten Filzen einheitlicher aus. Hier zeigte nur das Gentamicin-Laurat eine massive Erhöhung des Prothrombinfragment F_{1+2} - sowie der Thrombin-Antithrombin III-Komplexe. Die Konzentrationen des Faktors XIIa lagen für die beschichteten PGA-Filze unter denen der Kontrolluntersuchungen. Nach Untersuchung des C3a-Markers wurden nur bei der Gentamicin-SDS-Beschichtung leicht erhöhte Werte nachgewiesen.

3.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität

Zum Nachweis der zytotoxischen Eigenschaften wurden mit den verschiedenen Gentamicinverbindungen beschichtete Wells, beschichtete PTFE-Gefäßprothesenstücke und Kontrollen, wie im Methodenteil beschrieben, inkubiert und die Ergebnisse graphisch gegenübergestellt.

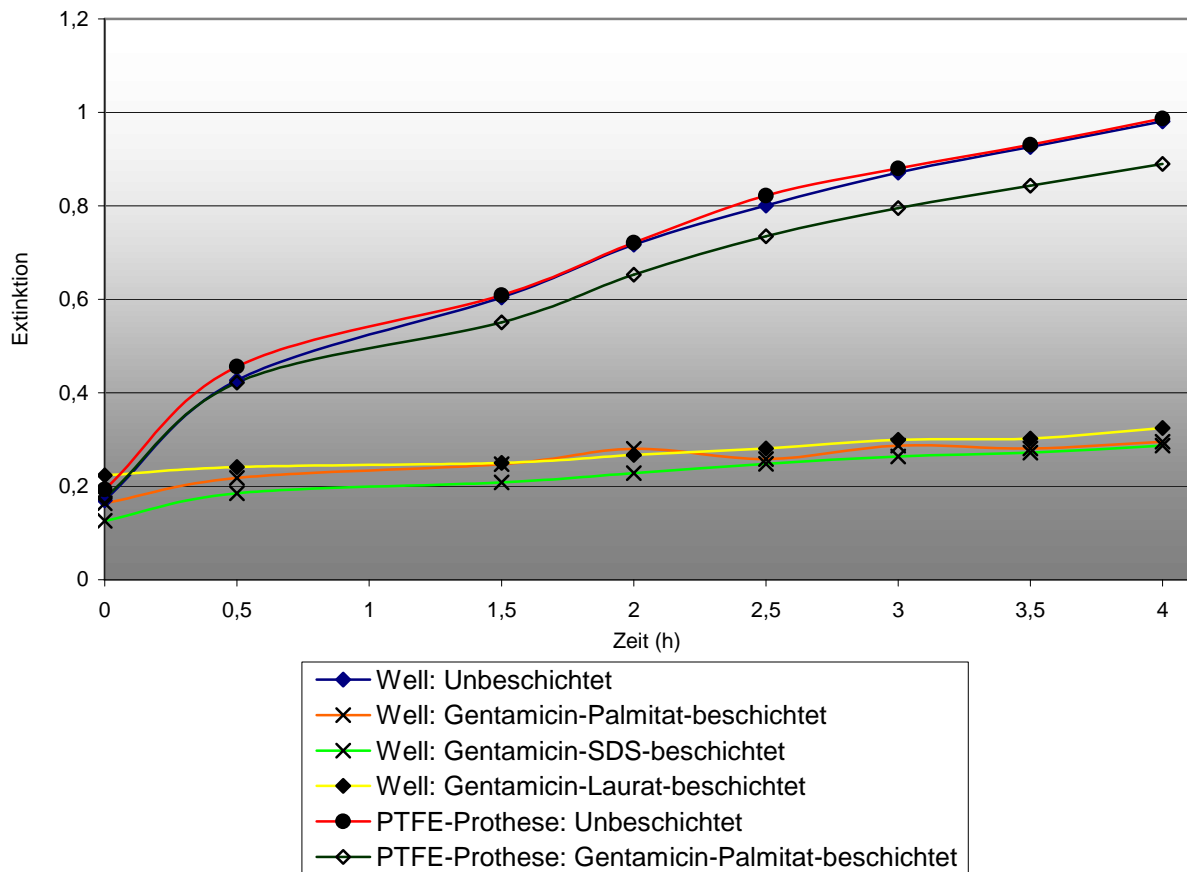


Abb. 3.20: Zytotoxizität der verschiedenen Gentamicinsalze durch Beschichtung von Wells und PTFE-Gefäßprothesen

Die durch Eintrocknen der verschiedenen Gentamicinlösungen erreichte Beschichtung in den Wells bedeckte nur den Wellboden. Dies war für die Versuche absolut ausreichend, da lediglich eine Freisetzung der einzelnen Komponenten der Beschichtungen und ein Kontakt der am Wellboden abgesiedelten Mausfibroblasten mit der Beschichtung erforderlich war.

Der Umsatz des Farbstoffes WST-1 diente als Indikator für unveränderte, stoffwechselaktive Zellen. Es kam in allen beschichteten Wells im Vergleich zu den

unbeschichteten Wells zu einem deutlich vermindertem Farbstoffumsatz. Ein Vergleich der unbeschichteten Wells mit den Gentamicin-Palmitat beschichteten und den mit unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen inkubierten Wells wies Unterschiede in der Farbstoffentwicklung auf. Die Zytotoxizität war in den durch 0,8mg Beschichtungssalz direkt beschichteten Wells deutlich ausgeprägter als in den durch die von den PTFE-Gefäßprothesenstücken abgelöste Beschichtung (rechnerisch mit 0,053mg ermittelt) belasteten Wells. Die von den PTFE-Gefäßprothesen abgelöste Menge ergibt eine weit geringere Konzentration der gelösten Gentamicinverbindung in der Nährlösung. Die Zytotoxizität der untersuchten Gentamicinsalze ist somit auch konzentrationsabhängig.



Abb. 3.21: Mikroskopische Betrachtung von Mausfibroblasten nach 24-stündiger Inkubation in den zur Messung der Zytotoxizität verwendeten Wells

Die Abbildung 3.21 verdeutlicht die Auswirkungen auf Zellkulturen zwischen den inkubierten Beschichtungen: Während in den nicht inkubierten Kontrollen sowie den Gentamicin-Palmitat und Gentamicin-Laurat inkubierten Proben die Zellmorphologie

länglicher, vitaler Mausfibroblasten überwiegt, sind in den mit Gentamicin-SDS inkubierten Kulturen abgerundete, zu Grunde gegangenen Zellen sichtbar.

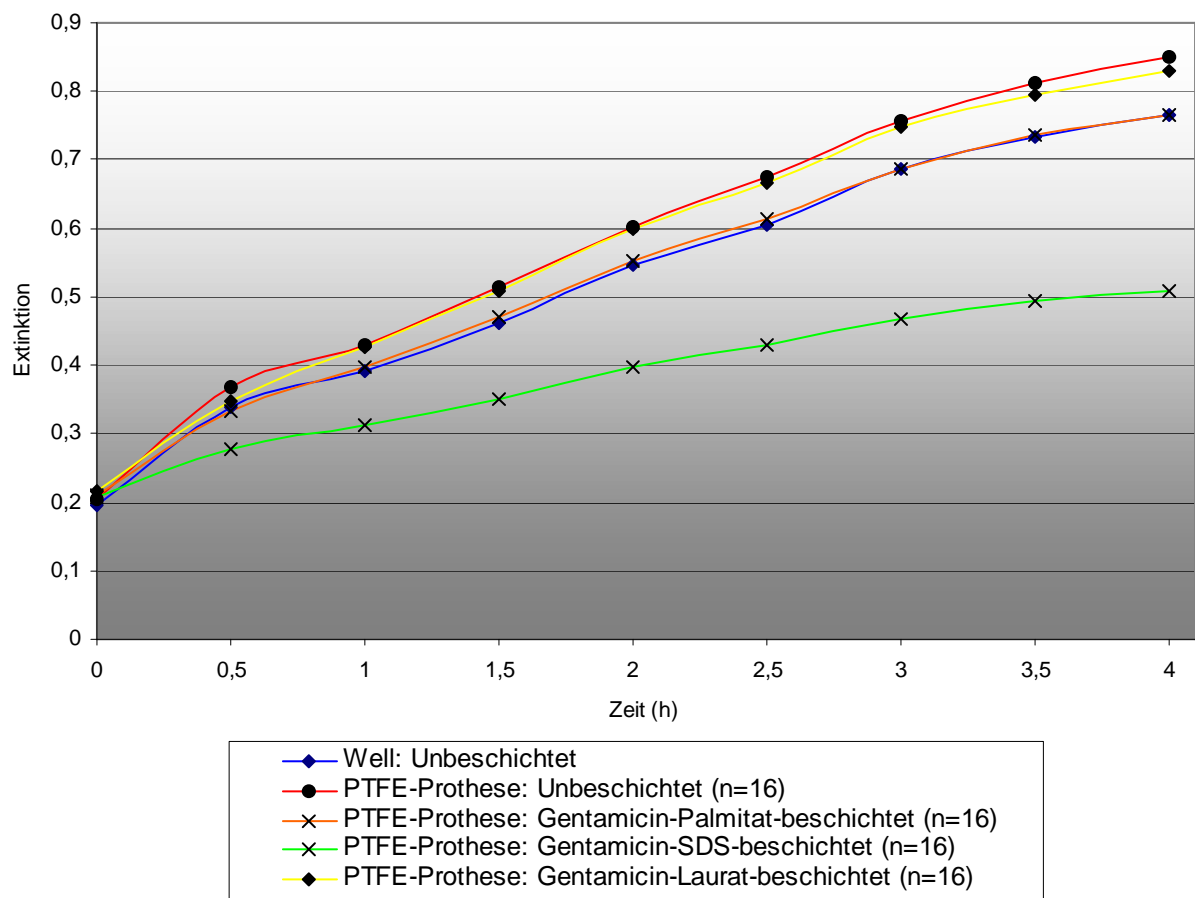


Abb. 3.22: Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PTFE-Gefäßprothesen

Von den beschichteten PTFE-Gefäßprothesen zeigten Gentamicin-Palmitat sowie Gentamicin-Laurat nur geringe Abweichungen im Vergleich zu den unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen. Eine deutlich verringerte Stoffwechselaktivität wurde nach Kontakt der Fibroblasten mit den Gentamicin-SDS beschichteten PTFE-Gefäßprothesen gemessen (siehe Abbildung 3.22). Gelatine- sowie silberbeschichtete Gefäßprothesen zeigten sehr gute zytotoxische Eigenschaften. Auch in diesem Versuchsansatz wiesen die Gentamicin-Palmitat-, die Gentamicin-Laurat-Beschichtung sowie die unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen gute und die Gentamicin-SDS-Beschichtung sehr schlechte zytotoxische Eigenschaften auf (siehe Abbildung 3.23).

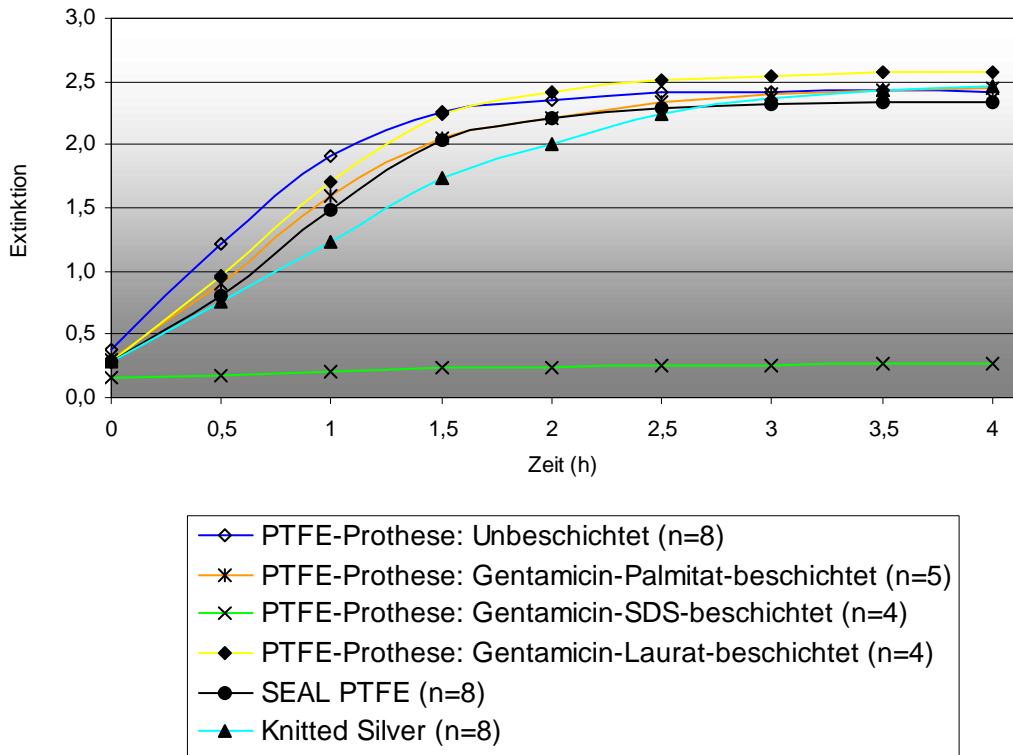


Abb. 3.23: Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PTFE-Gefäßprothesen im Vergleich mit kommerziellen Gefäßprothesen

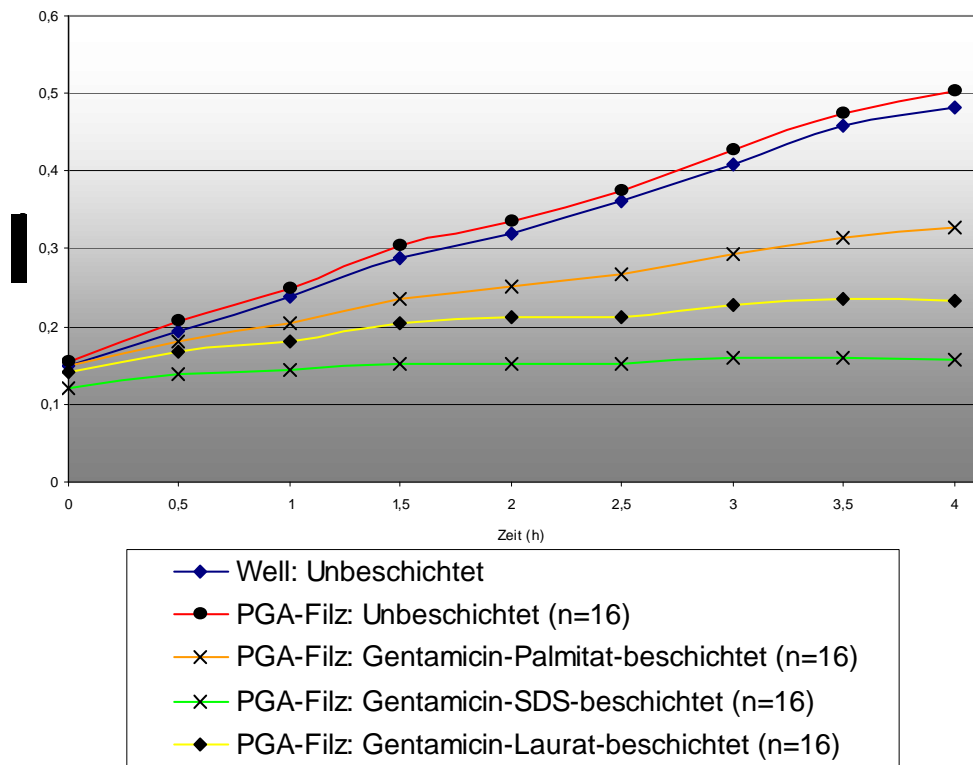


Abb. 3.24: Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PGA-Filze

Die unbeschichteten PGA-Filze hatten sehr gute zytotoxische Eigenschaften. Nach Beschichtung nahmen in der Reihenfolge Gentamicin-Palmitat, Gentamicin-Laurat und Gentamicin-SDS die zytotoxischen Eigenschaften zu (siehe Abbildung 3.24).

Zur weiteren Einschätzung der Zytotoxizität der Gentamicin-SDS-Verbindung wurden weitere Biomaterialien getestet, die diesen Wirkstoff enthielten. Sowohl die mit Gentamicin-SDS beschichteten PGA-Filze, als auch Kalziumsulfat-Tabletten (Palasept®) mit dieser Wirkstoffkonzentration zeigten nach Zellkontakt eine sehr deutliche Zytotoxizität. Unbeschichtete Proben dieser Materialien sowie unbeschichtete und mit Gentamicin-Palmitat beschichtete PTFE-Gefäßprothesen waren frei von zytotoxischen Eigenschaften.

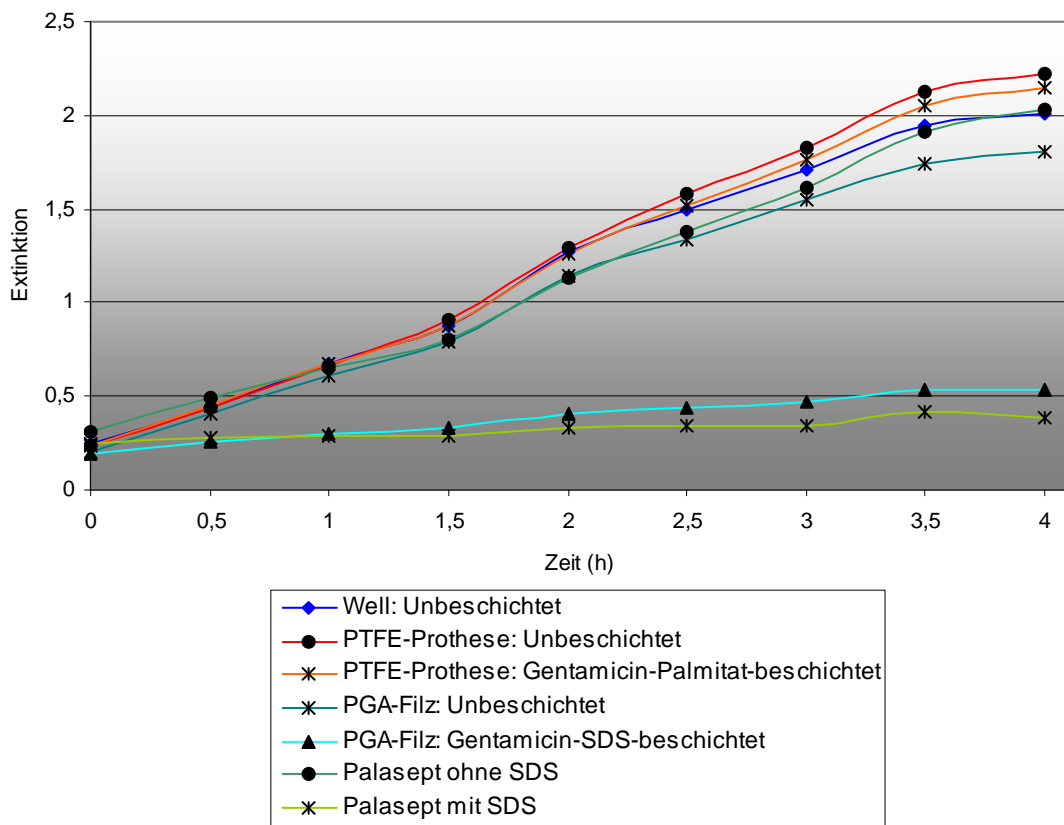


Abb. 3.25: Zytotoxizität von Gentamicin-SDS nach Beschichtung von PGA-Filzen, PTFE-Gefäßprothesen und Beladung von Kalziumsulfat (Palasept®), im Vergleich mit entsprechenden Gentamicin-Palmitat-Beschichtungen

3.5 Mikrobiologische Versuche

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnten Staphylokokken die Gefäßprothesen sehr gut besiedeln. Dies wurde belegt durch die hohen Bakterienkonzentrationen, welche nach Inkubation der unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen nachweisbar waren - keines dieser Implantate blieb keimfrei. Der Nachweis der an Gefäßprothesen anhaftenden Keime wurde mittels Ultraschallablösung und erneutem Anzuchten der gewonnenen Staphylokokken geführt. Die ausreichend lange Ultraschallbehandlung der besiedelten Implantate war notwendig, um die vollständige Ablösung der anhaftenden Keime zu gewährleisten. In den tabellarisch aufgeführten Ergebnissen (siehe Tabelle 3.9) wird die Anzahl der die Gefäßprothesen besiedelnden Staphylokokken zur besseren Übersicht in Gruppen entsprechend der Anzahl der entstandenen Bakterienkolonien und in Abhängigkeit von der Arzneistoff-Formulierung eingeteilt und dargestellt. Die Abbildung 3.26 fasst diese Ergebnisse zusammen. Sie stellt alle unbesiedelten und besiedelten Proben der Versuche in Abhängigkeit der verschiedenen Beschichtungen gegenüber.

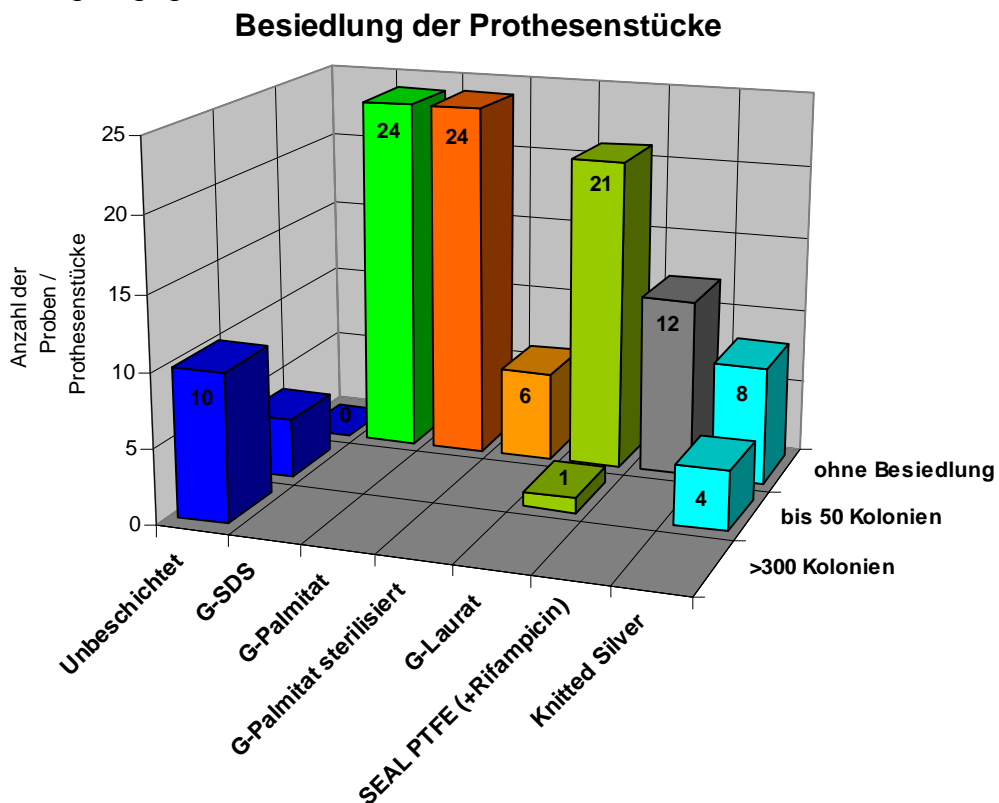


Abb. 3.26: Bakterielle Besiedelung unbeschichteter und beschichteter Gefäßprothesen in Abhängigkeit von der Arzneistoff-Formulierung

Beschichtung	Voreluert (2h)	Inkubation mit (CFU/ml)	Anhaftend gefundene Keime (in 100ml Ultraschalleluat)							
			keine	bis 10	bis 50	bis 100	bis 300	> 300	> 500	
			Anzahl Prothesen							
PTFE-Prothese: Unbeschichtet	nein	1000		1	1					
		5000			2					4
		10 000						1		5
PTFE-Prothese: Gentamicin-SDS-beschichtet	ja	1000	4							
		5000	4							
		10 000	4							
	nein	1000	4							
		5000	4							
		10 000	4							
PTFE-Prothese: Gentamicin-Palmitat-beschichtet	ja	1000	4							
		5000	4							
		10 000	4							
	nein	1000	4							
		5000	4							
		10 000	4							
PTFE-Prothese: Gentamicin-Palmitat-beschichtet sterilisiert	ja	1000	1							
		5000	1							
		10 000	1							
	nein	1000	1							
		5000	1							
		10 000	1							
PTFE-Prothese: Gentamicin-Laurat-beschichtet	ja	1000	2							
		5000	4							
		10 000	3	1						
	nein	1000	4							
		5000	4							
		10 000	4							
PTFE-Prothese: Vascutek SEALPTFE mit Rifampicin	ja	1000	2							
		5000	2							
		10 000	2							
	nein	1000	2							
		5000	2							
		10 000	2							
Dacron-Prothese: Intergard knitted silver	ja	1000	1	1						
		5000	1	1						
		10 000	2							
	nein	1000	2							
		5000	2							
		10 000		1	1					

Tabelle 3.9: Besiedlung der Gefäßprothesen in Abhängigkeit von der Keimkonzentration, der Inkubationslösung sowie der Beschichtung

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche der mit den Gentamicinsalz-Beschichtungen versehenen PTFE-Gefäßprothesen belegen eindeutig den entstehenden Schutz gegenüber einer Besiedlung mit Staphylokokkus epidermidis. Auch nach zweistündiger Elution konnten nach Keimkontakt aus keiner der mit Gentamicin-Palmitat oder Gentamicin-SDS beschichteten Prothesenstücke Bakterien gewonnen werden. Lediglich auf einer mit Gentamicin-Laurat beschichteten PTFE-Gefäßprothese wurde nach Elution eine geringe bakterielle Besiedlung nachgewiesen. Nach Ultraschallbehandlung konnten weniger als 10 Keime in 100µl der entsprechenden Eluate gezählt werden. Auch die mit Rifampicin vorbehandelten gelatinebeschichteten PTFE-Gefäßprothesen zeigten sehr gute antimikrobielle Eigenschaften, es konnte bei den 12 untersuchten Proben keine bakterielle Besiedlung nachgewiesen werden. Die mit einer Silberbeschichtung ausgerüsteten Dacron-Gefäßprothesen zeigten einen Schutz gegenüber der Besiedlung mit niedrigen Keimzahlen. Bei Inkubation mit hohen Keimzahlen waren jedoch Staphylokokken an diesen Prothesen adhärent – sie waren somit besiedelt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die antiinfektiv ausgerüsteten Gefäßprothesen einer zweistündigen Elution unterzogen und im gewonnenen Eluat nach einer Belastung mit 10^4 Keimen die Keimabtötung untersucht.

Beschichtung	Bakterienkonzentration in CFU / 100µl Elutionslösung
Gentamicin-SDS (n=7)	24
Gentamicin-Palmitat (n=7)	20
Gentamicin-Laurat (n=7)	44
Vascutec SEALPTFE-Rifampicin (n=6)	0
Intergard knitted silver (n=6)	26

Tabelle 3.10: Keimnachweis nach Inkubation von 10^4 Keimen mit der Elutionslösung antiinfektiv ausgerüsteter Gefäßprothesen

Gentamicin-SDS, Gentamicin-Palmitat sowie die freigesetzten Bestandteile der Silberbeschichtung unterschieden sich hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung nur geringfügig voneinander. In der rifampicinhaltigen Elutionsflüssigkeit wurden alle Staphylokokken abgetötet. Gentamicin-Laurat zeigte eine geringere Keimabtötung als alle anderen Arzneistoff-Formulierungen. Ein verzögertes Freisetzungsverhalten

der eingearbeiteten Antibiotika kann durch diese Elutionsversuche allerdings nur teilweise abgeschätzt werden.

Beschichtung	Voreluert für 2h	Inkubationslg. mit CFU/ml	Staphylokokken / 100µl Inkubationslösung						
			keine	< 10	<50	< 100	< 300	> 300	> 500
Anzahl der Prothesen									
PTFE-Prothese: Unbeschichtet	nein	1000				1		1	
		5000			1	1			4
		10 000						1	5
PTFE-Prothese: Gentamicin-SDS	ja	1000	4						
		5000	4						
		10 000	4						
	nein	1000	3						1
		5000	4						
		10 000	2	1	1				
PTFE-Prothese: Gentamicin-Palmitat	ja	1000	4						
		5000	2		1		1		
		10 000	2		2				
	nein	1000	3				1		
		5000	1	3					
		10 000		1				2	
PTFE-Prothese: Gentamicin-Palmitat sterilisiert	ja	1000		1					
		5000			1				
		10 000						1	
	nein	1000		1					
		5000	1						
		10 000		1					
PTFE-Prothese: Gentamicin-Laurat	ja	1000	2	1					1
		5000	2						2
		10 000	1				1		2
	nein	1000	2	1			1		
		5000	2	1			1		
		10 000	2						2
PTFE-Prothese: Vascutek SEALPTFE mit Rifampicin	ja	1000	2						
		5000	2						
		10 000	2						
	nein	1000	2						
		5000	2						
		10 000	2						
Dacron-Prothese: Intergard knitted silver	ja	1000	2						
		5000	2						
		10 000	2						
	nein	1000	2						
		5000	2						
		10 000	2						

Tabelle 3.11: Aus der Inkubationslösung nach 17-stündiger Inkubation anzüchtbare Keime

Die Ergebnisse der getesteten Filze fielen uneinheitlich aus. So konnten auf den mit Gentamicin-SDS beschichteten PGA-Filzen besonders viele Keime nachgewiesen werden und nach Kontakt der mit Gentamicin-Palmitat versehenen PGA-Filze waren

ebenfalls noch Keime vorhanden. In dem daraufhin wiederholten Versuch waren deren antiinfektiven Eigenschaften wieder eindeutig. Es konnten an mit Gentamicin-SDS sowie mit Gentamicin-Laurat beschichteten PGA-Filzen keine Anhaftung der Keime festgestellt werden. Bei den mit Gentamicin-Palmitat beschichteten PGA-Filzen waren vereinzelt Keime nachzuweisen (siehe hierzu Tabelle 3.12).

			Versuch 1		Versuch 2	
Beschichtung	Vorelution (2h)	Inkubiert mit (CFU/ml)	Beschichtungsgewicht	Anhaftende Keime (100ml Ultraschalleluat)	Beschichtungsgewicht	Anhaftende Keime (100ml Ultraschalleluat)
Unbeschichtet 1	nein	1000		>500		>200
Unbeschichtet 2	nein	1000		>500		>500
Unbeschichtet 3	nein	5000		>500		>500
Unbeschichtet 4	nein	5000		>500		>200
Unbeschichtet 5	nein	10 000		>500		>500
Unbeschichtet 6	nein	10 000		>500		>500
<hr/>						
Gentamicin-SDS 1	ja	1000	1,6mg	>500	2,11mg	0
Gentamicin-SDS 2	ja	1000	1,6mg	>500	1,66mg	0
Gentamicin-SDS 3	ja	5000	1,95mg	>500	1,9mg	0
Gentamicin-SDS 4	ja	5000	1,88mg	>500	2,05mg	0
Gentamicin-SDS 5	ja	10 000	2,29mg	>500	1,97mg	0
Gentamicin-SDS 6	ja	10 000	2,21mg	>500	1,94mg	0
Gentamicin-SDS 7	nein	1000	1,77mg	>500	2,05mg	0
Gentamicin-SDS 8	nein	1000	1,65mg	>500	1,92mg	0
Gentamicin-SDS 9	nein	5000	1,8mg	>500	1,61mg	0
Gentamicin-SDS 10	nein	5000	1,82mg	>500	2,4mg	0
Gentamicin-SDS 11	nein	10 000	1,69mg	>500	1,4mg	0
Gentamicin-SDS 12	nein	10 000	1,97mg	>500	2,07mg	0
<hr/>						
Gentamicin-Palmitat 1	ja	1000	1,82mg	45	1,53mg	0
Gentamicin-Palmitat 2	ja	1000	1,96mg	51	1,84mg	0
Gentamicin-Palmitat 3	ja	5000	1,76mg	23	1,66mg	0
Gentamicin-Palmitat 4	ja	5000	1,92mg	42	1,74mg	0
Gentamicin-Palmitat 5	ja	10 000	1,62mg	22	1,88mg	0
Gentamicin-Palmitat 6	ja	10 000	1,96mg	37	1,83mg	3
Gentamicin-Palmitat 7	nein	1000	2,17mg	32	1,73mg	2
Gentamicin-Palmitat 8	nein	1000	1,94mg	21	1,86mg	3
Gentamicin-Palmitat 9	nein	5000	2,12mg	18	1,81mg	12
Gentamicin-Palmitat 10	nein	5000	2,07mg	26	1,84mg	9
Gentamicin-Palmitat 11	nein	10 000	1,98mg	39	1,75mg	7
Gentamicin-Palmitat 12	nein	10 000	2,02mg	29	1,98mg	3
<hr/>						
Gentamicin-Laurat 1	ja	1000	1,94mg	9	2,16mg	0
Gentamicin-Laurat 2	ja	1000	1,98mg	1	1,87mg	0
Gentamicin-Laurat 3	ja	5000	2,04mg	2	2,18mg	0
Gentamicin-Laurat 4	ja	5000	2,1mg	0	1,96mg	0
Gentamicin-Laurat 5	ja	10 000	1,9mg	0	2,03mg	0
Gentamicin-Laurat 6	ja	10 000	2,11mg	0	1,98mg	0
Gentamicin-Laurat 7	nein	1000	1,69mg	1	2,05mg	0
Gentamicin-Laurat 8	nein	1000	2,01mg	1	2,02mg	0
Gentamicin-Laurat 9	nein	5000	1,77mg	0	2,55mg	0
Gentamicin-Laurat 10	nein	5000	1,95mg	2	2,22mg	0
Gentamicin-Laurat 11	nein	10 000	1,75mg	0	2,51mg	0
Gentamicin-Laurat 12	nein	10 000	2mg	0	2,01mg	0

Tabelle 3.12: Besiedlung der PGA-Filze in Abhängigkeit von der Keimkonzentration, der Inkubationslösung sowie der Beschichtung

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit war es Aufgabe, den antiinfektiven Schutz einer Beschichtung von PTFE-Gefäßprothesen sowie PGA-Filzen durch schwer lösliche Gentamicinsalze zu erreichen. Es wurden Versuche zur Herstellung einer Beschichtung und deren Stabilität, des Freisetzungsverhaltens der eingearbeiteten Gentamicinverbindungen sowie des daraus entstehenden antibiotischen Schutzes durchgeführt. Zudem wurden die hämokompatiblen Eigenschaften durch gerinnungsanalytische Versuche, serologische Marker der Gerinnung und Komplementaktivierung abgeklärt. Versuche zur Zytotoxizität ergänzten diese Untersuchungen, um die Gewebeverträglichkeit zu evaluieren.

Infekte von Gefäßprothesen sind gefürchtete Komplikationen mit schicksalhafter Bedeutung für die betroffenen Patienten. Die Behandlung infizierter Implantate sowie der umgebenden Weichteile und des Knochens benötigt lokal einen antiinfektiven Schutz der Biomaterialien, um eine Sanierung des Infektgebietes zu erleichtern.

Die derzeit verfügbaren Möglichkeiten der Herstellung und Beschichtung von Implantaten sind vielfältig. Die Verbesserung der Implantateigenschaften wird durch die Weiterentwicklung der eingesetzten Werkstoffe, den vielfältigen Möglichkeiten der Einarbeitung und Beschichtung mit Medikamenten inklusive Wachstumsfaktoren ständig weiter vorangetrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit realisierte Beschichtung besteht durch die Kombination von klinisch etablierten Biomaterialien mit einem bewährten Antibiotikum in neuer galenischer Form und einer einfachen Beschichtungstechnik.

4.1 Die Beschichtungstechnik

Methanol ist für die retardierenden Gentamicinsalze das beste Lösungsmittel. Die sehr lange Abdampfzeit aufgrund des hohen Siedepunktes stellt jedoch einen deutlichen Nachteil im Beschichtungsprozess dar. Dieses Problem wurde durch die entwickelte Kombination der Lösungsmittel Chloroform und Methanol gelöst und ermöglicht die sehr gute Löslichkeit der retardierenden Gentamicinsalze, verbunden mit einer kurzen Abdampfzeit. Wie die Elutions- und mikrobiologischen Versuche zeigten, sind hohe Wirkstoffkonzentrationen durch ein einfaches Tauchverfahren auf die PTFE-Implantate und PGA-Filze in stabiler Form aufzutragen.

Aufgrund unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheiten der zu beschichtenden Materialien wurden die Beschichtungsverfahren entsprechend angepasst: Eine Tauchbehandlung für PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze oder das wiederholte Benetzen mit der Beschichtungslösung für Gläser und Metallküvetten.

Die Tauchbehandlung führt bei PTFE-Gefäßprothesen zu einer mechanisch stabilen Einarbeitung der Wirkstoffe in deren porösen Struktur. Durch die Beschichtung wird nur die poröse Struktur überzogen und somit nicht vollständig ausgekleidet (siehe Abbildungen 3.1 und 3.2). Die notwendige Dampfdurchlässigkeit und ultrafeine Struktur für das Einwachsen des Implantates im Gewebe bleibt somit erhalten. Diese Befunde gelten analog für die porösen Filze.

Auf glatten Oberflächen, wie den Gläsern oder den Metallküvetten der Aluminiumlegierung, ist die Haftung der retardierenden Gentamicinsalze eingeschränkt. Trotz des aufwendigen Verfahrens eines wiederholten Benetzens kann keine gleichmäßige Beschichtung auf glatten Materialien gewährleistet werden, es entstehen immer Areale mit geringer Beschichtungsdicke. Auf glatten Oberflächen entstehen lediglich wachsartige Überzüge mit geringer Haftstabilität, wie die einfache Nagelprobe oder das leichte Ablösen bei Elutionsversuchen gezeigt haben.

Für die Herstellung „steriler“ Gefäßprothesen kamen zwei Verfahren zur Anwendung: Erstens konnte mittels Sterilfiltration der Beschichtungslösung und Beschichtung unter „lamina-air-flow“ Bedingungen eine notwendige aseptische Herstellungsmethode im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden. Als zweites Verfahren wurde eine Sterilisation der Proben bei der Firma Heraeus mit Ethylenoxid

durchgeführt. Keine dieser Methoden zeigte einen Einfluss auf die Hämokompatibilität, Zytotoxizität und antimikrobielle Wirksamkeit der Beschichtungskomponente.

Zur weiteren Verbesserung des Beschichtungsvorganges wurden die Trockentemperaturen von 37°C auf 50°C erhöht. Es war kein negativer Einfluss auf Stabilität und Wirksamkeit der Beschichtung nachweisbar. Ob durch höhere Temperaturen Veränderungen hinsichtlich der Stabilität der Wirkstoffe eintreten, bleibt offen. Es werden allerdings die unterschiedlichen Siedepunkte von Methanol (65°C) und Chloroform (61,2°C) zu berücksichtigen sein.

Das Tauchverfahren ist der Herstellung durch „Benetzung“ hinsichtlich Zeitaufwand und Handling deutlich überlegen. Es entstand eine gleichmäßige Beschichtung der PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze, belegt durch die geringe Intrachargenvarianz. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die sehr gute Haftstabilität. Deutliche Differenzen der aufgetragenen Beschichtungsmenge unter den verschiedenen hergestellten Chargen (Interchargenvarianz) können zahlreiche Ursachen haben. Probleme und entsprechende Lösungen betreffen die Entfettung der Implantate vor der Beschichtung, Restfeuchtigkeit der retardierenden Gentamicinsalze oder Chargenprobleme der verwendeten PTFE-Gefäßprothesen bzw. PGA-Filze. Diese Faktoren hatten jedoch keinen Einfluss auf die gute Hämokompatibilität und die sehr guten antiinfektiven Eigenschaften der durchgeführten Beschichtung.

Die Beeinflussung der Materialeigenschaften der PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filze durch die Beschichtung ist hinsichtlich der Flexibilität im Vergleich zu den kommerziellen Silber- oder Gelatinebeschichtungen nicht gegeben. Ebenso ist eine Veränderung der verwendeten Gefäßprothesen durch den Kontakt mit den eingesetzten Lösungsmitteln nicht zu erwarten, da PTFE als ein sehr reaktionsträges Material bekannt ist, dessen Eigenschaften weder durch Lösungsmittel wie Alkohole, Ester, Ketone, noch aggressiven Säuren wie rauchende Schwefel- oder Salpetersäure, Flußsäure o.a. verändert werden.

Zur Beschichtung der Rifampicin-Gelatine-Gefäßprothese ist ein Bad in Rifampicinlösung unmittelbar vor der Implantation erforderlich. Im Gegensatz hierzu ist bei den Gentamicinsalz-Beschichtungen keine Behandlung im Operationssaal zum Aufbringen des Antibiotikums notwendig, was den klinischen Einsatz deutlich sicherer und komfortabler gestalten sollte.

4.2 Das Elutionsverhalten

Die Elutionsversuche zeigten in der PBS-Lösung oder Serum eine Freisetzung des Gentamicins innerhalb der ersten vier Stunden bei 37°C. Freyrie et al. konnten auf mit Rifampicin vorbehandelten mit Gelatine beschichteten PTFE-Prothesen in vitro noch Rückstände des Antibiotikums nach fünf Tagen finden, im Tierversuch bestand ein 72 Stunden anhaltender Schutz durch Rifampicin. Eine lokale antibiotische Abdeckung über diesen Zeitraum kann durch die Gentamicinsalze wahrscheinlich nicht realisiert werden. Für die Klinik bedeuten die gewonnenen Ergebnisse der Freisetzungsversuche jedoch eine hohe Gentamicinkonzentration in den das Implantat umgebenden Weichteilen während der perioperativen Phase. Dies ist insbesondere aufgrund der eingangs beschriebenen Gefahren intraoperativer Implantatskontaminationen sowie der lokal geschwächten Infektabwehr aufgrund der gestörten Blutversorgung und des Gewebstraumas zur Erzielung bakterizider Konzentrationen klinisch relevant.

Auffallend waren die deutlichen Differenzen zwischen der zu erwartenden und der tatsächlich mittels TDx-Assay gefundenen Gentamicinkonzentration. Die während der Elutionsversuche freigesetzte Gentamicinbase zeigte Abweichungen von bis zu 20% von der theoretischen Gesamtkonzentration (siehe Abbildung 3.4).

Hierfür können die der Rechnung zugrunde gelegten Massenanteile der Gentamicinbase im Lyophilisat oder eine Veränderung der Anteile durch den Beschichtungsvorgang als Ursache verantwortlich sein. Nach intensiver Rücksprache mit dem Hersteller der retardierenden Gentamicinverbindungen wurden folgende Ursachen diskutiert:

Methanol p.A. wurde von der Firma Merck bezogen. Dieser Alkohol enthält trotz des analysenreinen Zertifikates primäre Amine als Stabilisatoren. Aufgrund der höheren Stabilität der Amin-Fettsäure/SDS-Verbindung im Vergleich zur Gentamicin-Fettsäure/SDS-Verbindung kommt es in einer Konkurrenzreaktion dieser Amine mit den Gentamicin-Fettsäure/SDS-Verbindungen zu Veränderungen der Gentamicinkonzentration. So kann, abhängig von der Inkubationszeit des Methanols mit Gentamicin-Palmitat, die Gentamicinmenge vermindert werden, welche dann nicht mehr für die retardierende Beschichtung zur Verfügung steht. Die Differenzen

zwischen der theoretischen und der tatsächlich vorgefundenen Gentamicinmenge können so erklärt werden.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen mit langen Inkubationszeiten lassen einen antimikrobiellen Schutz auch nach Ablauf der ersten Stunden vermuten. Ein nach der initial rasch freigesetzten Gentamicinmenge auf der PTFE-Gefäßprothese verbleibender Beschichtungs- bzw. Gentamicinrest kann aufgrund der beschriebenen Unsicherheiten bezüglich der Gesamtgentamicinkonzentrationen allerdings nicht errechnet werden.

Der Versuch, durch eine Kombination oder zusätzliche Beschichtung mit dem Resomer R203 eine weitere Verzögerung der Gentamicinfreisetzung aus der Palmitat-Verbindung zu erreichen, zeigte sich für die verwendeten Resomerkonzentrationen als nicht erfolgreich.

4.3 Beeinflussung von Hämostase und Komplementsystem **- Hämokompatibilität**

Gefäßprothesen und deren Beschichtung müssen im Körper eine sehr gute Hämokompatibilität aufweisen. Eine prothrombotische Wirkung ist aufgrund der möglichen Provokation eines frühzeitigen Prothesenverschlusses nicht wünschenswert; Eine ausgeprägte Hemmung der Blutgerinnung birgt Gefahren durch Blutungen innerhalb des umgebenden traumatisierten Gewebes.

Die globale Bestimmung der Blutgerinnung mittels der Thrombelastographie belegt eine schwach antithrombogene Wirkung der Gentamicinsalz-Beschichtungen. Diese Beeinflussung ist bei der Gentamicin-Palmitat- und Gentamicin-Laurat-Verbindung nur leicht ausgeprägt, hingegen in der Gentamicin-SDS-Verbindung deutlich zu erkennen. Die vorliegenden Ergebnisse können auf einer verminderten Gerinnselformung oder einer ausbleibenden Vernetzung der Gerinnselformung mit der Beschichtungsoberfläche beruhen, eine Differenzierung zwischen diesen beiden Ursachen kann durch den gewählten Versuchsaufbau aber nicht getroffen werden.

Durch den Nachweis von Faktor XIIa, dem Prothrombinspaltprodukt F_{1+2} und Thrombin-Antithrombin III-Komplexen kann eine Aktivierung des Gerinnungssystems

nachgewiesen werden. Die Versuche mit beschichteten Gläsern konnten über die bekannt stark thrombogene Oberfläche von Glas die antithrombogenen Eigenschaften der Gentamicinsalz-Beschichtungen belegen. So sollten Unterschiede in den mittels Enzymimmunoassays bestimmten Markern der aktivierten Gerinnung zwischen den unbeschichteten Implantaten sowie den verschiedenen Beschichtungen den antithrombogenen Effekt besser charakterisiert werden. Die Aussagekraft dieser Versuche an Gläsern wird jedoch begrenzt, da die Beschichtungen auf glatten Oberflächen wenig haftstabil und nicht gleichmäßig verteilt sind.

Gentamicin-Palmitat- sowie Gentamicin-Laurat-Beschichtungen zeigten im Vergleich zu den unbeschichteten Proben nach Blutkontakt eine reduzierte Bildung des Prothrombinfragmentes F_{1+2} , Thrombin-Antithrombin III-Komplexen sowie des Faktors XIIa. Dies ist Beleg für die minimale Gerinnungshemmung. Diese Befunde konnten bei den beschichteten Gläsern als auch beschichteten PTFE-Gefäßprothesen beobachtet werden. Bei einer Anwendung in vivo ist eine unerwünschte Aktivierung der Hämostase somit nicht zu erwarten.

Gentamicin-SDS zeigte eindeutige Ergebnisse bezüglich einer Gerinnungsinaktivierung. Sowohl die Daten der globalen Gerinnungsanalyse, als auch die deutlichen Veränderungen der Gerinnungsmarker belegen bei Gentamicin-SDS eine ausgeprägte Wirkung auf die Hämostase.

Unbeschichtete PTFE-Gefäßprothesen der Firma Alpha-Research wiesen sehr gute hämokompatible Eigenschaften auf und es ist zu erwarten, dass durch eine Gentamicin-Palmitat-Beschichtung in vivo eine Verbesserung der bereits guten Eigenschaften der PTFE-Prothesen hinsichtlich der Hämokompatibilität erreicht werden kann.

Der Einsatz von beschichteten PGA-Filzen zur Blutungsstillung ist aufgrund der leichten Gerinnungshemmung zu überdenken. Im Weichteilgewebe können die Filze jedoch aufgrund der hohen Beschichtungsmenge als sehr effektiver Träger zur Applikation von Gentamicin diskutiert werden.

Bei der Komplementaktivierung sowohl auf dem so genannten klassischen, als auch auf dem alternativen Weg entsteht das Anaphylatoxin C3a. Durch die Konzentrationsmessung des äquivalent entstehenden C3a-desArg kann der Umfang

der Komplementaktivierung bestimmt werden. Bei Gentamicin-Palmitat-Proben wurden keine C3a-Erhöhungen beobachtet, hingegen zeigte Gentamicin-SDS regelmäßig eine deutliche Konzentrationserhöhung. Dieser Befund kann für die Anwendung *in vivo* bedeuten, dass durch diese implantatassoziierte Komplementaktivierung schwerwiegende Komplikationen zu erwarten sind. Diese Bedenken werden durch die sehr schlechten Ergebnisse der Zytotoxizität und die nachgewiesene Hämolyse noch verstärkt.

4.4 Gewebeverträglichkeit - Zytotoxizität

Wie von Aminoglykosiden bekannt, ist Gentamicin potentiell nephrotoxisch, zusätzlich kann es zu einer Ototoxizität kommen. Die Therapieempfehlung bei schweren Infektionen liegt bei der Tagesdosis von 3 mg/kg Körpergewicht über drei gleiche Dosen in achtstündigen Abständen verteilt. Bei der Überwachung der Serumspitzenkonzentrationen des Gentamicins sollten länger dauernde Spitzenspiegel über 10-12 µg/ml vermieden werden. Aufgrund der maximal aus einer Gefäßprothese eluierten Gentamicinmenge ist bei einer Prothese mit einem Beschichtungsgewicht von 1mg/cm somit nicht mit dem Erreichen des toxischen Schwellenwertes im systemischen Kreislauf zu rechnen.

Die Fettsäuren Palmitinsäure und Laurinsäure kommen in den verschiedensten Lebensmitteln vor und stellen einen großen Teil der physiologisch im Blut vorkommenden Fettsäuren dar (Wissenschaftliche Tabellen Geigy). Sie sind somit unbedenklich.

Problematisch ist die Anwendung des anionischen Tensids Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), das in der Biotechnologie als Denaturierungsmittel für Proteine zum Einsatz kommt. Aufgrund von allergieauslösenden, hautreizenden und gesundheitsschädlichen Eigenschaften ist SDS mit dem Gefahrensymbol Xn, also als „Gesundheitsschädlich“, eingestuft. Seine Verwendung in Zahnpasten und Kosmetika ist höchst umstritten. Der Befund einer auftretenden Hämolyse nach Blutkontakt mit der Gentamicin-SDS-Verbindung bei Versuchen zur Hämokompatibilität, belegt die Zytotoxizität der Gentamicin-SDS-Verbindung und macht deren Einsatz für Beschichtungen höchst fragwürdig. Das toxische Potential

der in den Beschichtungssalzen vorkommenden Fettsäuren und Gentamicinbestandteile ist somit - mit Ausnahme des SDS – als gering zu bewerten.

Der zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften etablierte Assay beruht auf der Spaltung des in dem Reagenz enthaltenen Tetrazoliums Salzes durch mitochondriale Enzyme, welche nur in lebenden Zellen funktionieren. Das entstehende Formazan ruft eine Absorptionsänderung im Wellenbereich zwischen 420nm-480nm hervor. So entsteht eine direkte Korrelation zwischen Absorptionsänderung und in der Kultur lebenden Zellen. Da die eingesetzten Mausfibroblasten über keine außergewöhnlichen Resistenzen gegenüber Umwelteinflüssen verfügen, kann über diese Zellen eine gute Aussage hinsichtlich des zu erwartenden Einfluss auf Gewebe getroffen werden.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Zytotoxizität der retardierenden Gentamicin-Verbindungen wiesen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen auf. Die bereits beschriebene Hämolyse (siehe Abbildung 3.12) nach Inkubation mit Gentamicin-SDS konnte mit diesem Test bestätigt werden. Die zytotoxischen Eigenschaften der SDS- und der Palmitat-Verbindung unterschieden sich erheblich. Die SDS-Verbindung zeigte im Vergleich zur Palmitat-Verbindung ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften. Eine Beschichtung der PTFE-Gefäßprothesen mit der Gentamicin-Palmitat-Verbindung wies in allen Versuchen sehr gute biokompatible Eigenschaften auf und ist am besten geeignet für antiinfektive Beschichtungen.

Sehr hohe Konzentrationen der Gentamicinsalze Gentamicin-Palmitat und Gentamicin-Laurat in der Nährlösung, wie sie in den Versuchen zur Zytotoxizität der PGA-Filze vorlagen, können ebenfalls zu einer verminderten Umsetzung des Tetrazoliums Salzes durch die eingesetzten Mausfibroblasten führen. Gentamicin-Palmitat zeigte hier die geringste Beeinflussung. Die Ursache kann in den gelösten Fettsäuren, dem Antibiotikum, oder beiden Komponenten liegen. Trotz der oben beschriebenen Eigenschaften der Stoffe sollte beim Einsatz dieser Verbindungen in der Herstellung von Beschichtungen deren Maximalkonzentration berücksichtigt werden.

Im Vergleich der selbst hergestellten Gentamicinsalz-Beschichtungen mit den kommerziellen Gelatine- und Silberacetat-Beschichteten Gefäßprothesen kann

keiner Prothese der Vorzug gegeben werden, da alle Ergebnisse auf vergleichbar hohem Niveau liegen. Aufgrund der in der aktuellen Literatur fehlenden Untersuchungsergebnisse bezüglich zytotoxischer Wirkungen klinisch etablierter Gefäßprothesen in Tierversuchen und in der Zellkultur kann keine Empfehlung für einen Prothesentyp ausgesprochen werden.

Lösungsmitteldämpfe von Methanol sowie Chloroform sind toxikologisch problematisch, sollten nicht in die Atemluft gelangen und es gibt eindeutige Regelungen zur Konzentration am Arbeitsplatz. So betragen die MAK-Werte für Chloroform 10ppm, für Methanol 200ml/m³. Die Beschichtungen wurden unter bei „laminar-air-flow“ Bedingungen durchgeführt. In weiteren Versuchen müssen die Rückstände dieser Lösungsmittel in den Beschichtungen ermittelt werden.

4.5 Antiinfektive Eigenschaften

Gentamicin ist ein bewährtes Antibiotikum mit bekanntem Einsatzgebiet. Es bewirkt bei sensiblen Bakterienstämmen das Wachstum durch Hemmung der Proteinsynthese. Die Wirkung gegen pathogene gramnegative und grampositive Bakterien ist bakterizid und beruht auf der Bindung des Antibiotikums an die 30-S-Untereinheiten der bakteriellen Ribosome.

Das Bakterium Staphylokokkus epidermidis RP62a hat verschiedene fakultativ pathogene Eigenschaften, besonders hervorzuheben ist hinsichtlich der in dieser Arbeit bearbeiteten Problematik die Bildung eines Biofilms. Infizierte Implantate können durch diese Filme überzogen werden und es resultiert ein sehr effektiver Schutz der Bakterien gegenüber den Mechanismen der Immunabwehr. Ein weiteres Problem der Biofilme ist die erforderliche deutliche Erhöhung der lokalen Antibiotikumskonzentration zur Erzielung eines bakteriziden Effektes.

Im verwendeten Versuchsaufbau fanden sich nach Inkubation hohe Bakterienkonzentrationen auf den unbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen, keine dieser Prothesen blieb keimfrei. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen können Staphylokokken die Gefäßprothesen somit sehr gut kolonisieren. Der Versuchsaufbau zur Ablösung und Anzüchtung der Staphylokokken zeigt sich als

sehr gute Methode zur Quantifizierung einer Implantatsbesiedlung. Der durch die Beschichtung mit retardierenden Gentamicinsalzen entstehende Schutz gegenüber einer Keimbesiedlung konnte mit den Versuchen in vitro belegt werden. Laurinsäure sowie Sodiumdodecylsulfat verfügen in ausreichender Konzentration über antimikrobielle Eigenschaften (Kabara 1977, S. 756). Inwieweit diese Phänomene die bekannte Gentamicinwirkung durch die Detergenzwirkung ergänzen, kann aus dem verwendeten Versuchsaufbau nicht belegt werden.

Die zur Kontrolle der Besiedlungskapazität ausgesäten Keime in den Inkubationslösungen zeigten für alle getesteten beschichteten Gefäßprothesen eine stark verminderte Keimzahl im Vergleich zu den unbeschichteten Prothesen. Dies lässt sich auf das während der Inkubationszeit eluierte Gentamicin zurückführen. Die Elutionsversuche ergaben eine maximale Gentamicinfreisetzung in den ersten vier Stunden nach Elutionsbeginn. Trotz vorangegangener Elution führte auch eine hohe Keimbelastung über die Dauer von 17 Stunden zu keiner Besiedlung des Implantates. Dies ist ein Hinweis auf die notwendige lang anhaltende Schutzwirkung.

Im klinischen Einsatz finden sich derzeit antiinfektiv ausgerüsteter Gefäßprothesen: Die mit Rifampicin beschichtete SEALPTFE®- und die mit Silber versehene Dacronprothese. Insbesondere die Besiedlungsresistenz Rifampicin-beschichteter Gefäßprothesen wurde in der Literatur mehrfach belegt, dies gilt auch für die Silberacetat-Beschichtung. Im direkten Vergleich der Prothesen mit hohen Keimbelastungen zeigte sich die Rifampicinbeschichtung allerdings deutlich überlegen (Ricco 2006, S. 342; Goeau-Brissonniere 2002, S. 1262).

Gentamicin wurde bereits erfolgreich für Beschichtungen von Gefäßprothesen verwendet. Der Einsatz dieses Antibiotikums mit gelatinebeschichteten Gefäßprothesen erzeugte einen sehr wirksamen kurzfristigen Schutz (Ginalska 2005, S. 421). Ebenfalls bewies Gentamicin bereits seine Effektivität in der Keimreduktion bzw. -entfernung bereits besiedelter Gefäßprothesen (Edmiston 2006, S. 347).

Die gewonnenen Ergebnisse aller getesteten Gentamicinsalz-Beschichtungen zeigen in vitro mindestens so gute Resultate wie die bereits kommerziell erhältlichen und klinisch eingesetzten Rifampicin-Gelatine- bzw. Silberacetat-beschichteten

Gefäßprothesen. Diese Resultate belegen eindeutig die Effektivität der Gentamicinsalz-Beschichtungen.

Unter den drei geprüften Gentamicinsalzen ist die Palmitat-Verbindung aufgrund der geringen Beeinflussung der Hämostase sowie des Komplementsystems, fehlender zytotoxische Eigenschaften und ausgezeichnetem antibiotischem Schutz die Beschichtungskomponente mit dem besten Gesamtergebnis.

5. Zusammenfassung

Die Gefahr der mikrobiellen Implantatbesiedelung ist eine gefürchtete Komplikation. Eine aktuelle Analyse aller septischen Komplikationen beim gefäßchirurgischen Einsatz von Gefäßinterponaten belegt sehr deutlich die Komplikationsrate von bis zu 11%. Neben den oberflächlichen Wundinfektionen betreffen mehr als der Hälfte dieser Komplikationen das Implantat selbst. Diese prothetischen und periprothetischen Infektionen sind eine unmittelbare Bedrohung für das Leben des Patienten.

Die Biomaterialien Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyglykolsäure (PGA) sind als Werkstoffe für Gefäßprothesen (ePTFE) und resorbierbare Filze (PGA) in der Chirurgie bekannt und werden aufgrund der sehr guten Materialeigenschaften breit eingesetzt. Die Ausrüstung dieser Materialien mit einer resorbierbaren und antibiotisch wirksamen Beschichtung bietet die Chance der weiteren Verbesserung dieser Implantate mit einer Erweiterung des Einsatzspektrums und Reduzierung schwerwiegender Komplikationen.

Grundlage der vorliegenden Arbeit war es, die schwer löslichen Gentamicinsalze der Palmitinsäure, Laurinsäure und Natriumdodecylsulfat zur Entwicklung einer antiinfektiven Beschichtung von PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen zu nutzen. Hierfür waren initial Versuche zur Entwicklung von Beschichtungslösungen und Beschichtungstechniken notwendig. Die hierdurch neu entwickelten Gentamicinsalz-Beschichtungen wurden dann in vitro hinsichtlich ihrer retardierenden Wirkung und insbesondere ihrer antiinfektiven Eigenschaften untersucht. Unerwünschte Nebeneffekte auf die Hämostase und das Komplementsystem wurden geprüft sowie die zytotoxischen Eigenschaften beurteilt. In Kontaminationsversuchen mussten die Beschichtungen ihre Wirksamkeit zur Verhinderung einer Besiedlung mit *Staphylokokkus epidermidis* RP62a unter Beweis stellen.

Die bislang veröffentlichten Daten bezüglich systematischer Untersuchungen in vitro von kommerziell erhältlichen Gefäßprothesen mit antiinfektiven Eigenschaften sind äußerst gering. Insbesondere die Einflüsse auf Hämostase und Zytotoxizität wurden

bislang vernachlässigt. Von den bereits zahlreich veröffentlichten Studien bezieht sich die überwiegende Anzahl auf Erkenntnisse aus dem klinischen Einsatz. Somit musste die in dieser Arbeit angewendete Methodik neu entwickelt, oder aus vergleichbaren Versuchen anderer medizinischer Bereiche entliehen und entsprechend angepasst werden.

Die Ergebnisse der Beschichtungsversuche belegen die sehr gute Löslichkeit der retardierenden Gentamicinsalze in Methanol. Da jedoch eine weitere Verbesserung hinsichtlich der Beschichtungstechnik durch die Lösung der Salze in einem Methanol/Chloroform-Gemisch erzielt werden konnte, kam dieses Gemisch zur Herstellung der Beschichtungen zum Einsatz. Die Beschichtung der verwendeten Biomaterialien wurde mittels eines Tauchverfahrens durchgeführt. Durch diese Methode konnten Beschichtungsmengen von ca. 1mg Gentamicinsalz pro Zentimeter PTFE-Gefäßprothese und 2mg Gentamicinsalz pro Quadratcentimeter der PGA-Filze erreicht werden. Höhere Beschichtungsmengen sind durchaus durch eine Variation der Beschichtungslösung mit höheren gelösten Gentamicinsalzanteilen zu realisieren, diese wurden allerdings aufgrund der bereits vorliegenden hohen Wirkstoffkonzentration der Beschichtungen nicht weiter verfolgt.

Wie die Versuche zur Freisetzung und Stabilität der Beschichtungen ergaben, sind textile Materialien mit ihrer porösen Struktur gute Träger der Salze mit ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften. Beschichtungen glatter Oberflächen wie Gläser oder Metalle zeigten eine geringe Haftstabilität.

Die Beeinflussungen der Mechanismen der Hämostase durch die Beschichtungen wurden eingehend untersucht. Initial dienten rotationsthrombelastographische Untersuchungen zur globalen Charakterisierung der Veränderungen von Gerinnungsparametern. In diesen Versuchen fielen insbesondere bei der Gentamicin-SDS-Beschichtung deutliche Verlängerungen der Gerinnungszeit, bei einer Verringerung der Gerinnselfestigkeit auf. Dieser Effekt war in abgeschwächter Form ebenfalls bei Gentamicin-Laurat zu beobachten, während Gentamicin-Palmitat diese Parameter kaum beeinflusste.

Zur genaueren Charakterisierung der durch die Beschichtungen ausgelösten Gerinnungsveränderungen wurden das Prothrombinfragment F_{1+2} , der aktivierte

Faktor XII sowie Thrombin-Antithrombin III-Komplexe als Marker herangezogen und mittels ELISAs bestimmt. Deren Konzentrationsänderungen konnten in beschichteten Gläsern, inkubierten PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen gemessen werden. Die Gentamicin-Palmitat- und die Gentamicin-Laurat-Beschichtungen von Gläsern verminderten den zu erwartenden Anstieg der Parameter deutlich. Beschichtete Gefäßprothesen lagen auf dem Niveau von unbehandelten PTFE-Gefäßprothesen. Die Gentamicin-SDS-Beschichtung rief eine deutliche Erhöhung dieser Marker hervor, zudem war das Auftreten einer Hämolyse zu verzeichnen. Die klinisch eingesetzten SEALPTFE®- und Knitted Silver Dacron-Gefäßprothesen zeigten wie die Palmitat-Verbindung gute hämokompatible Eigenschaften. Während sich die Palmitat- als auch die Laurat-Verbindung hinsichtlich des Komplementsystems neutral verhielten, erfolgte eine deutliche Aktivierung durch Gentamicin-SDS, wie ein deutlicher Konzentrationsanstieg des Komplementfaktors C3a bewies. Diese Ergebnisse wurden durch die Versuche mit den PGA-Filzen bestätigt.

Wie anhand der Komplementaktivierung bereits zu vermuten war, wirkt Gentamicin-SDS deutlich zytotoxisch. Dies wurde in umfangreichen Inkubationsversuchen mit Mausfibroblasten belegt. Die Palmitat- und Laurat-Verbindungen verhalten sich neutral. Allerdings war bei Versuchen mit hohen, die Menge einer Beschichtung deutlich übersteigenden Konzentrationen ebenfalls eine Wachstumshemmung der eingesetzten Zellen zu verzeichnen.

Wie durch die Freisetzungsversuche belegt wurde, sind in der unmittelbaren Umgebung der Beschichtung hohe lokale Konzentrationen des Antibiotikums nachzuweisen und es besteht ein effektiver Schutz gegen hohe Keimkonzentrationen. Trotz der Inkubation in Lösungen mit hohen Keimkonzentrationen bis 10^4 CFU/ml und vorausgegangener Elution der Beschichtung, war bei insgesamt 76 inkubierten Gefäßprothesen nur die Kontamination **einer** Gentamicin-Laurat-Probe zu verzeichnen. Die Ergebnisse waren gleichwertig mit den durch Rifampicin geschützten SEALPTFE®-Prothesen und besser als die der mit Silber ausgestatteten, von InterGard® vertriebenen Dacron-Prothesen, welche als bereits klinisch eingesetzte Gefäßprothesen im gleichen Versuchsaufbau geprüft wurden.

Die gewonnenen Resultate der kommerziellen Gefäßprothesen belegen eindeutig die Effektivität der Gentamicinsalz-Beschichtungen, welche der der klinisch bereits eingesetzten Modelle in nichts nachsteht.

Unter den drei geprüften Gentamicinsalzen ist die Palmitat-Verbindung aufgrund der geringen Beeinflussung der Hämostase, des Komplementsystems sowie der geringen zytotoxischen Eigenschaften und umfassendem antibiotischem Schutz die beste Komponente für eine antibiotische Beschichtung.

6. Literaturverzeichnis

1. Antonios VS, Noel AA, Steckelberg JM, Wilson WR, Mandrekar JN, Harmsen WS, Baddour LM. Prosthetic vascular graft infection: A risk factor analysis using a case-control study. *J Infect* 53: 49-55, 2005.
2. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Montanaro L. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials* 25: 4825-9, 2004.
3. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials* 23: 1495-502, 2002.
4. Baguneid MS, Seifalian AM, Salacinski HJ, Murray D, Hamilton G, Walker MG. Tissue engineering of blood vessels. *Br J Surg* 93: 282-90, 2006.
5. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res* 18: 327-55, 1984.
6. Bandyk DF, Bergamini TM, Kinney EV, Seabrook GR, Towne JB. In situ replacement of vascular prostheses infected by bacterial biofilms. *J Vasc Surg* 13: 575-83, 1991.
7. Bandyk DF, Berni GA, Thiele BL, Towne JB. Aortofemoral graft infection due to *Staphylococcus epidermidis*. *Arch Surg* 119: 102-8, 1984.
8. Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC. Expanded application of in situ replacement for prosthetic graft infection. *J Vasc Surg* 34: 411-9, 2001.

9. Benvenisty AI, Tannenbaum G, Ahlborn TN, Fox CL, Modak S, Sampath L, Reemtsma K, Nowygrod R. Control of prosthetic bacterial infection: evaluation of an easily incorporated, tightly bound, silver antibiotic PTFE graft. *J Surg Res* 44: 1-7, 1988.
10. Berglund J, Bjorck M, Elfstrom J. Long-term results of above knee femoro-popliteal bypass depend on indication for surgery and graft-material. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29: 412-8, 2005.
11. Bunt TJ. Vascular graft infections: an update. *Cardiovasc Surg* 9: 225-33, 2001.
12. Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol* 156: 506-14, 2005.
13. Cheung AI, Projan SJ, Edelstein RE, Fischetti VA. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infect Immun* 63: 1914-20, 1995.
14. Chiesa R, Astore D, Frigerio S, Garriboli L, Piccolo G, Castellano R, Scalamogna M, Odero A, Pirrelli S, Biasi G, Mingazzini P, Biglioli P, Polvani G, Guarino A, Agrifoglio G, Tori A, Spina G. Vascular prosthetic graft infection: epidemiology, bacteriology, pathogenesis and treatment. *Acta Chir Belg* 102: 238-47, 2002.
15. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-45, 1995.
16. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-67, 2000.
17. Deacon JM, Pagliaro AJ, Zelicof SB, Horowitz HW. Prophylactic use of antibiotics for procedures after total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am* 78: 1755-70, 1996.

18. Delmi M, Vaudaux P, Lew DP, Vasey H. Role of fibronectin in staphylococcal adhesion to metallic surfaces used as models of orthopaedic devices. *J Orthop Res* 12: 432-8, 1994.
19. Devine C, McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg* 40: 924-31, 2004.
20. Dickinson GM, Bisno AL. Infections associated with indwelling devices: concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 597-601, 1989.
21. Edmiston CE, Jr., Goheen MP, Seabrook GR, Johnson CP, Lewis BD, Brown KR, Towne JB. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *Am J Surg* 192: 344-54, 2006.
22. Farooq M, Freischlag J, Kelly H, Seabrook G, Cambria R, Towne J. Gelatin-sealed polyester resists *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *J Surg Res* 87: 57-61, 1999.
23. FitzGerald SF, Kelly C, Humphreys H. Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *J Antimicrob Chemother* 56: 996-9, 2005.
24. Freyrie,A.; Curti,T.; Rodio,M.; Masetti,L.; Bignozzi,L.; Sanguinetti,V.; Joechler,M.; D'Addato,M. Interaction between vascular prostheses and rifampicin in the prevention of the grafts infection. An experimental study *Int.Angiol.* 11: 113-116, 1992
25. Galdbart JO, Branger C, Andreassian B, Lambert-Zechovsky N, Kitzis M. Elution of six antibiotics bonded to polyethylene vascular grafts sealed with three proteins. *J Surg Res* 66: 174-8, 1996.
26. Geipel U, Herrmann M. Das infizierte Implantat: Bakteriologie. 108[11], 961-978. 2007. Springer Berlin / Heidelberg.

27. Ginalska G, Osinska M, Uryniak A, Urbanik-Sypniewska T, Belcarz A, Rzeski W, Wolski A. Antibacterial activity of gentamicin-bonded gelatin-sealed polyethylene terephthalate vascular prostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29: 419-24, 2005.
28. Goeau-Brissonniere O, Mercier F, Nicolas MH, Bacourt F, Coggia M, Lebrault C, Pechere JC. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with a rifampin-bonded gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg* 19: 739-41, 1994.
29. Goeau-Brissonniere O, Fabre D, Leflon-Guibout V, Di CI, Nicolas-Chanoine M, Coggia M. Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-sealed and silver/collagen-coated polyester prostheses. *J Vasc Surg* 35: 1260-3, 2002.
30. Gottenbos B, van dMH, Busscher H. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res* 50: 208-14, 2000.
31. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* 17: 1143-52, 1995.
32. Harris L, O'brien-Irr M, Ricotta JJ. Long-term assessment of cryopreserved vein bypass grafting success. *J Vasc Surg* 33: 528-32, 2001.
33. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96: 2149-56, 2000.
34. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 24: 1013-24, 1997.

35. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083-91, 1996.
36. Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peters G. Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 176: 984-91, 1997.
37. Hogt AH, Dankert J, Hulstaert CE, Feijen J. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun* 51: 294-301, 1986.
38. Hogt A, Dankert J, de VJ, Feijen J. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J Gen Microbiol* 129: 2959-68, 1983.
39. Hussain M, Herrmann M, von EC, Perdreau-Remington F, Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 65: 519-24, 1997.
40. Jones L, Braithwaite BD, Davies B, Heather BP, Earnshaw JJ. Mechanism of late prosthetic vascular graft infection. *Cardiovasc Surg* 5: 486-9, 1997.
41. Kabara J.J., Vrable R. Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* 12: 753-759, 1977.
42. Kaebnick H, Bandyk D, Bergamini T, Towne J. The microbiology of explanted vascular prostheses. *Surgery* 102: 756-62, 1987.
43. Kieffer E, Bahnini A, Koskas F, Ruotolo C, Le BD, Plissonnier D. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J Vasc Surg* 17: 349-55, 1993.
44. Klinkert P, Schepers A, Burger DH, van Bockel JH, Breslau PJ. Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg* 37: 149-55, 2003.

45. Kolakowski S Jr, Dougherty MJ, Calligaro KD. Does the timing of reoperation influence the risk of graft infection? *J Vasc Surg* 45: 60-4, 2007.
46. Kuusela P, Vartio T, Vuento M, Myhre E. Attachment of staphylococci and streptococci on fibronectin, fibronectin fragments, and fibrinogen bound to a solid phase. *Infect Immun* 50: 77-81, 1985.
47. Kwak D, Wu Y, Horbett TA. Fibrinogen and von Willebrand's factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma. *J Biomed Mater Res A* 74: 69-83, 2005.
48. Lachapelle K, Graham AM, Symes JF. Antibacterial activity, antibiotic retention, and infection resistance of a rifampin-impregnated gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg* 19: 675-82, 1994.
49. Lehnhardt FJ, Torsello G, Claeys LG, Pfeiffer M, Wachol-Drewiek Z, Grundmann RT, Sandmann W. Systemic and local antibiotic prophylaxis in the prevention of prosthetic vascular graft infection: an experimental study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23: 127-33, 2002.
50. Levy MF, Schmitt DD, Edmiston CE, Bandyk DF, Krepel CJ, Seabrook GR, Towne JB. Sequential analysis of staphylococcal colonization of body surfaces of patients undergoing vascular surgery. *J Clin Microbiol* 28: 664-9, 1990.
51. Malangoni M, Livingston D, Peyton J. The effect of protein binding on the adherence of staphylococci to prosthetic vascular grafts. *J Surg Res* 54: 168-72, 1993.
52. Malassiney P, Goeau-Brissonniere O, Coggia M, Pechere JC. Rifampicin loading of vascular grafts. *J Antimicrob Chemother* 37: 1121-9, 1996.
53. Mirelli M, Buzzi M, Pasquinelli G, Tazzari PL, Testi G, Ricchi E, Conte R, Stella A. Fresh and cryopreserved arterial homografts: immunological and clinical results. *Transplant Proc* 37: 2688-91, 2005.

54. Muller E, Hubner J, Gutierrez N, Takeda S, Goldmann DA, Pier GB. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun* 61: 551-8, 1993.
55. Muller E, Takeda S, Goldmann D, Pier G. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect Immun* 59: 3323-6, 1991.
56. Muller E, Takeda S, Shiro H, Goldmann D, Pier GB. Occurrence of capsular polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 168: 1211-8, 1993.
57. Orton DF, LeVeen RF, Saigh JA, Culp WC, Fidler JL, Lynch TJ, Goertzen TC, McCowan TC. Aortic prosthetic graft infections: radiologic manifestations and implications for management. *Radiographics* 20: 977-93, 2000.
58. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 146: 479-82, 1982.
59. Polo JR, Ligeró JM, az-Cartelle J, Garcia-Pajares R, Cervera T, Reparaz L. Randomized comparison of 6-mm straight grafts versus 6- to 8-mm tapered grafts for brachial-axillary dialysis access. *J Vasc Surg* 40: 319-24, 2004.
60. Post S, Kraus T, Muller-Reinartz U, Weiss C, Kortmann H, Quentmeier A, Winkler M, Husfeldt KJ, Allenberg JR. Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 226-31, 2001.
61. Post S, Kraus T, Muller-Reinartz U, Weiss C, Kortmann H, Quentmeier A, Winkler M, Husfeldt KJ, Allenberg JR. Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 226-31, 2001.

62. Post S, Kraus T, Muller-Reinartz U, Weiss C, Kortmann H, Quentmeier A, Winkler M, Husfeldt KJ, Allenberg JR. Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 226-31, 2001.
63. Pounds LL, Montes-Walters M, Mayhall CG, Falk PS, Sanderson E, Hunter GC, Killewich LA. A changing pattern of infection after major vascular reconstructions. *Vasc Endovascular Surg* 39: 511-7, 2005.
64. Prager MR, Hoblaj T, Nanobashvili J, Sporn E, Polterauer P, Wagner O, Bohmig HJ, Teufelsbauer H, Ploner M, Huk I. Collagen- versus gelatine-coated Dacron versus stretch PTFE bifurcation grafts for aortoiliac occlusive disease: long-term results of a prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* 134: 80-5, 2003.
65. Ricco J.B. InterGard silver bifurcated graft: features and results of a multicenter clinical study. *J.Vasc.Surg.* 44:339-346, 2006.
66. Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Gotz F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* 183: 1038-42, 2001.
67. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 67: 2627-32, 1999.
68. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* 73: 3007-17, 2005.
69. Santini C, Baiocchi P, Serra P. Perioperative antibiotic prophylaxis in vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 14 Suppl A: 13-4, 1997.

70. Santini C, Baiocchi P, Venditti M, Brandimarte C, Tarasi A, Rizzo L, Speziale F, Fiorani P, Serra P. Aorto-femoral graft infections: a clinical and microbiological analysis. *J Infect* 27: 17-26, 1993.
71. Sardelic F, Ao PY, Taylor DA, Fletcher JP. Prophylaxis against *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection with rifampicin-soaked, gelatin-sealed Dacron. *Cardiovasc Surg* 4: 389-92, 1996.
72. Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 895-8, 1998.
73. Seabrook GR, Schmitt DD, Bandyk DF, Edmiston CE, Krepel CJ, Towne JB. Anastomotic femoral pseudoaneurysm: an investigation of occult infection as an etiologic factor. *J Vasc Surg* 11: 629-34, 1990.
74. Seeger J, Borgeson M, Lawson G. Pseudointimal thrombogenicity changes in small arterial grafts. *Surgery* 107: 620-6, 1990.
75. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses M, Stamp A, Taylor G, Moran A, Landis W, Langer R, Vacanti J, Mayer J. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg* 68: 2298-304, 1999.
76. Simpson KH, Bowden MG, Hook M, Anvari B. Measurement of adhesive forces between *S. epidermidis* and fibronectin-coated surfaces using optical tweezers. *Lasers Surg Med* 31: 45-52, 2002.
77. Siverhus D, Schmitt D, Edmiston C, Bandyk D, Seabrook G, Goheen M, Towne J. Adherence of mucin and non-mucin-producing staphylococci to preclotted and albumin-coated velour knitted vascular grafts. *Surgery* 107: 613-9, 1990.
78. Soetevent C, Klemm PL, Stalenhoef AF, Bredie SJ. Vascular graft infection in aortoiliac and aortofemoral bypass surgery: clinical presentation, diagnostic strategies and results of surgical treatment. *Neth J Med* 62: 446-52, 2004.

79. Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9: 222-7, 2001.
80. Szilagyi DE, Smith RF, Elliott JP, Vrandecic MP. Infection in arterial reconstruction with synthetic grafts. *Ann Surg* 176: 321-33, 1972.
81. Taylor LM, Jr., Edwards JM, Porter JM. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. *J Vasc Surg* 11: 193-205, 1990.
82. Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg* 10: 191-7, 2002.
83. Tsai WB, Grunkemeier JM, McFarland CD, Horbett TA. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J Biomed Mater Res* 60: 348-59, 2002.
84. Turgut H, Sacar S, Kaleli I, Sacar M, Goksin I, Toprak S, Asan A, Cevahir N, Tekin K, Baltarli A. Systemic and local antibiotic prophylaxis in the prevention of *Staphylococcus epidermidis* graft infection. *BMC Infect Dis* 5: 91, 2005.
85. Vasutek Internet Information. SEALPTFE Product Descripton. 2007. www.vasutek.com/products/eptfe/sealptfe/images/competitor_graft_bleeding.jpg,
www.vasutek.com/products/eptfe/sealptfe/images/competitor_sweating.jpg
86. Vaudaux P, Suzuki R, Waldvogel FA, Morgenthaler JJ, Nydegger UE. Foreign body infection: role of fibronectin as a ligand for the adherence of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 150: 546-53, 1984.
87. Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, Lew DP, Wabers H, Cooper SL. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in

- promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun* 63: 585-90, 1995.
88. Veenstra GJ, Cremers FF, van DH, Flier A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 178: 537-41, 1996.
 89. Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery* 85: 253-6, 1979.
 90. Vicaretti M, Hawthorne WJ, Ao PY, Fletcher JP. An increased concentration of rifampicin bonded to gelatin-sealed Dacron reduces the incidence of subsequent graft infections following a staphylococcal challenge. *Cardiovasc Surg* 6: 268-73, 1998.
 91. Vogt PR, von Segesser LK, Goffin Y, Niederhauser U, Genoni M, Kunzli A, Lachat M, Turina MI. Eradication of aortic infections with the use of cryopreserved arterial homografts. *Ann Thorac Surg* 62: 640-5, 1996.
 92. von EC, Jansen B, Kohnen W, Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65: 179-214, 2005.
 93. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 188: 706-18, 2003.
 94. Vuong C, Gotz F, Otto M. Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 68: 1048-53, 2000.
 95. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182: 1688-93, 2000.
 96. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus*

epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 6: 269-75, 2004.

97. Wang IW, Anderson JM, Marchant RE. Staphylococcus epidermidis adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J Infect Dis* 167: 329-36, 1993.
98. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in Staphylococcus aureus biofilms. *J Bacteriol* 186: 1838-50, 2004.
99. Zühlke H.V., Harnoss B.M., Lorenz E.P.M. Septische Gefäßchirurgie. 2. ed. Blackwell Wissenschaft, 1994.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Staphylokokkus aureus auf einer Implantatoberfläche.....	3
Abb. 1.2:	Beeinflussende Faktoren der Keimbesiedlung.....	3
Abb. 1.3:	Mikrobielle Adhäsion als dynamischer Prozess	5
Abb. 1.4:	S. aureus in einem entstehenden Biofilm.....	8
Abb. 1.5:	Biofilm produzierende Kolonien.....	9
Abb. 1.6:	Häufigste Ursachen und Lokalisationen von Gefäßimplantaten.....	10
Abb. 1.7:	Risiken für postoperatives Versagen von PTFE-Gefäßprothesen.....	12
Abb. 1.8:	Mikrobiologisches Spektrum explantierter Gefäßprothesen.....	16
Abb. 2.1:	Zur Untersuchung der Hämokompatibilität eingespannte PTFE- Gefäßprothesen	29
Abb. 2.2:	Zur Untersuchung der Hämokompatibilität vorbereitete PGA-Filze.....	30
Abb. 3.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer PTFE-Gefäß- prothese	36
Abb. 3.2:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines PGA-Filzes	37
Abb. 3.3:	Mikroskopische Aufnahmen der Beschichtungen auf Glas	38
Abb. 3.4:	Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PTFE-Gefäßprothesen .	40
Abb. 3.5:	Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PTFE-Gefäßprothesen in Abhängigkeit von der Elutionsflüssigkeit	40
Abb. 3.6:	Elution der Gentamicinbase aus beschichteten PGA-Filzen.....	41
Abb. 3.7:	Elution der Gentamicinbase aus PTFE-Gefäßprothesen mit verschiedenen G-Palmitat- und R203-Beschichtungen.....	43
Abb. 3.8:	Schema der ROTEM [®] -Messparameter	43
Abb. 3.9:	Grafiken der Gerinnungsparameter bei ROTEM [®] -Untersuchungen.....	44
Abb. 3.10:	Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7- minütiger Inkubation beschichteter Gläser	46
Abb. 3.11:	Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7- und 11-minütiger Inkubation beschichteter Gläser.....	47
Abb. 3.12:	Blutgerinnsel an Gläsern nach 7-minütiger Inkubation.....	48
Abb. 3.13:	Hämolyse nach Inkubation Gentamicin-SDS-beschichteter Gläser	48

Abb. 3.14a:	Innenseite verschiedener PTFE-Gefäßprothesen nach 7-minütigem Blutkontakt	51
Abb. 3.14b:	Innenseite verschiedener Gefäßprothesen nach 7-minütigem Blutkontakt	52
Abb. 3.15:	Prothrombinfragment F1+2 nach 7-minütiger Inkubation von Gefäßprothesen	53
Abb. 3.16:	Faktor XIIa nach 7-minütiger Inkubation von Gefäßprothesen.....	54
Abb. 3.17:	Thrombin-Antithrombin III-Komplexe nach Inkubation von Gefäßprothesen	53
Abb. 3.18:	Komplementfaktor C3a nach 7-minütiger Inkubation von Gefäßprothesen	50
Abb. 3.19:	Marker des aktivierten Gerinnungs- und Komplementsystems nach 7-minütiger Inkubation beschichteter PGA-Filze	55
Abb. 3.20:	Zytotoxizität der verschiedenen Gentamicinsalze durch Beschichtung von Wells und PTFE-Gefäßprothesen	56
Abb. 3.21:	Mikroskopische Betrachtung von Mausfibroblasten nach Inkubation.....	57
Abb. 3.22:	Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PTFE-Gefäßprothesen .	58
Abb. 3.23:	Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PTFE-Gefäßprothesen im Vergleich mit kommerziellen Gefäßprothesen.....	59
Abb. 3.24:	Zytotoxizität der Gentamicinsalz-beschichteten PGA-Filze	59
Abb. 3.25:	Zytotoxizität von Gentamicin-SDS nach Beschichtung von PGA-Filzen, PTFE-Gefäßprothesen und Kalziumsulfat (Palasept®), im Vergleich mit Gentamicin-Palmitat.....	60
Abb. 3.26:	Inkubierten Gefäßprothesen und anhaftende Staphylokokken	61

Tabelle 2.1:	Beschichtungslösungen mit R203	25
Tabelle 3.1:	Löslichkeit der Gentamicinsalze in Methanol	34
Tabelle 3.2:	Löslichkeit der Gentamicinsalze im Chloroform/Methanol-Gemisch.....	35
Tabelle 3.3:	Lösungsmittelzusammensetzung zur Lösung der Gentamicinsalze	35
Tabelle 3.4:	Beschichtungsgewichte pro Zentimeter PTFE-Gefäßprothese	36
Tabelle 3.5:	Beschichtungsgewichte der Gläser zur Bestimmung der Hämokompatibilität	37
Tabelle 3.6:	Gehalt der Gentamicinbase in den verschiedenen Gentamicinsalzen .	39
Tabelle 3.7:	Beschichtungsgewichte der mit Gentamicin-Palmitat und R203 hergestellten Beschichtungsvarianten.....	42
Tabelle 3.8:	Gerinnungszeiten und Gerinnselfestigkeit der ROTEM®-Untersuchungen	45
Tabelle 3.9:	Besiedlung der Gefäßprothesen.....	62
Tabelle 3.10:	Keimnachweis nach Inkubation der Elutionslösung.....	63
Tabelle 3.11:	Keimnachweis nach 17-stündiger Inkubation	64
Tabelle 3.12:	Besiedlung der PGA-Filze	65

8. Danksagung

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

Ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger, für die ausgezeichnete und ausgesprochen kompetente Betreuung während der gesamten Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. H. Gollwitzer für die Einführung in die mikrobiologischen Methoden.

Außerdem gilt mein Dank Frau Putz für die freundliche Unterstützung bei der Vorbereitung der Versuche zur Zytotoxizität, sowie den Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstätte des Klinikums rechts der Isar für die Herstellung der ROTEM[®]-Materialien.

Unterstützung fand ich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung.

Für den Beistand und die mir entgegengebrachte Geduld meiner Familie und meiner Freunde bin ich sehr dankbar.

Joachim Schwabe

Beschichtung von PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen mit schwer löslichen Gentamicinsalzen

Mit Versuchen zur Beschichtungstechnik sowie Freisetzung, antimikrobiellen Wirksamkeit, Hämokompatibilität und Zytotoxizität der entwickelten Gentamicinsalz-Beschichtungen.

Die bakterielle Besiedlung ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen beim Einsatz prothetischer Materialien. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die als Lyophilisat vorliegenden Gentamicinsalze der Palmitinsäure, Laurinsäure und Sodiumdodecylsulfat (SDS) zur Entwicklung einer Beschichtungen von PTFE-Gefäßprothesen und PGA-Filzen zu nutzen und hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit, des Elutionsverhaltens, der Hämokompatibilität und Zytotoxizität in vitro zu prüfen. Mit allen Gentamicinsalzen konnten Beschichtungen realisiert werden. Die maximale Gentamicinfreisetzung erfolgte innerhalb der ersten vier Stunden, doch auch danach bestand ein umfassender antimikrobieller Schutz. Während die SDS-Verbindung zytotoxisch, gerinnungsverzögernd und komplementaktivierend wirkte, war Gentamicin-Palmitat unbedenklich und konnte als die beste Beschichtung überzeugen.

Coatings of PTFE-Vascular Prosthesis and PGA-Felts with slowly soluble Gentamicinsalts

Experiments concerning coating techniques, release characteristics, antimicrobial effectiveness, haemocompatibility and cytotoxicity of the developed coatings.

Bacterial colonisation of prosthetic devices is a major clinical complication. The aim of this dissertation was to develop a coating for PTFE-Vascular Prosthesis and PGA-Felts using anhydrous Gentamicinsalts of palmitic acid, lauric acid and sodiumdodecylsulfate (SDS) and characterize the resulting antimicrobial effectiveness, release characteristics, haemocompatibility and cytotoxicity in vitro. It was possible to develop coatings with all Gentamicinsalts. Maximum Gentamicin release was observed within the first four hours and an extensive antimicrobial protection remained afterwards. While the SDS-compound showed cytotoxic characteristics, inhibited coagulation and activated the complement system, Gentamicin-Palmitat yielded no deleterious side effects and convinced as an excellent coating drug.

