

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik
und Muskuloskeletale Regeneration
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über die Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

***In - vivo* Quantifikation der Gentamicinfreisetzung
aus einer Implantatbeschichtung
im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sophie Nast
Tierärztin aus Potsdam

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4070

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über die Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

***In - vivo* Quantifikation der Gentamicinfreisetzung aus einer Implantatbeschichtung
im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Sophie Nast
Tierärztin
aus Potsdam**

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4070

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Peter Böttcher

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats; animal models; tibia; fractures; infections; gentamicin; protective coatings;
implantation; fracture fixation, international (MeSH); poly (lactide) (MeSH);
immunohistochemistry

Tag der Promotion: 25.11.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-045-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Tibiafrakturen und deren Klassifikation.....	2
1.2 Intramedulläre Stabilisierung von Tibiafrakturen.....	4
1.3 Postoperatives Infektionsrisiko	6
1.4 Antibiotikaprophylaxe und -therapie.....	9
1.4.1 Lokale antibiotische Infektionsprophylaxe	11
1.4.2 Poly(D,L-Laktid) - ein bioabbaubarer Polymer-Trägerstoff	12
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Titankirschnerdrähte und Beschichtung.....	16
2.2 <i>In-vitro</i> Analyse.....	17
2.3 <i>In-vivo</i> Analyse	18
2.3.1 Versuchstiere	18
2.3.2 Operativer Eingriff	18
2.3.3 Euthanasie und Probenentnahme	20
2.4 Probenaufbereitung.....	22
2.4.1 Aufarbeitung des Knochengewebes.....	22
2.4.2 Aufarbeitung des Endosts	23
2.4.3 Aufarbeitung des Titankirschnerdrahtes	23
2.4.4 Aufarbeitung des Nierengewebes	24
2.5 Analysemethoden zur Probenauswertung	25
2.5.1 Bestimmung der Gentamicinkonzentration.....	26
2.5.2 Rasterelektronenmikroskopische Auswertung.....	27
2.5.3 Histologische und immunhistologische Färbungen.....	28
2.5.4 Histologische Auswertung.....	31
2.5.5 Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung	31
2.5.6 Radiologische Auswertung.....	32
2.5.7 Elektronische Dokumentation der Ergebnisse	33

3	Ergebnisse	34
3.1	<i>In-vitro</i> Analyse.....	34
3.2	<i>In-vivo</i> Analyse	35
3.2.1	Operationsverlauf und postoperativer Verlauf	35
3.2.2	Radiologische Ergebnisse.....	36
3.3	Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Knochengewebe	37
3.4	Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Endost.....	38
3.5	Bestimmung der Gentamicinkonzentration auf dem Draht nach Explantation	39
3.6	Rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Polymerbeschichtung	40
3.7	Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Nierengewebe.....	42
3.8	Histologische und immunhistologische Ergebnisse	43
3.9	Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Serum	52
3.10	Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung	53
3.11	Quantitative Auswertung der Gesamtgentamicinkonzentration.....	55
4	Diskussion	58
4.1	Diskussion von Material und Methoden	58
4.1.1	Versuchstiermodell	58
4.1.2	Analysemethoden zur Probenauswertung.....	60
4.2	Diskussion von Ergebnissen.....	62
4.2.1	<i>In-vivo</i> Freisetzungskinetik	62
4.2.2	<i>In-vitro</i> Freisetzungskinetik.....	67
4.2.3	Vergleich der <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i> Freisetzung.....	69
4.3	Fazit	70
5	Zusammenfassung	72
6	Summary	74
7	Abbildungsverzeichnis	76
8	Tabellenverzeichnis	79
9	Literaturverzeichnis	80
10	Anhang: Materialien- und Geräteliste	91
11	Publikation	96
12	Danksagung	97
13	Eigenständigkeitserklärung	99

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin- Biotin- Complex Methode
AG	Antigen
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP2	Bone Morphogenetic Protein Deutsch: "knochenmorphogenetischen Proteine"
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
d	Tag(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FK	Freisetzungskinetik
h	Stunde(n)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
KIMS	Kinetic Interaction of Microparticles in a Solution
kum.	kumulativ(e)
kV	Kilovolt
LD ₅₀	letale Dosis 50%
lt.	laut
li.	links
M	Molmasse
MIC	Minimal Inhibitory Concentration Deutsch: „minimale Hemmkonzentration“
min	Minute(n)
MW	Mittelwert
n	Größe der Grundgesamtheit
µg	Mikrogramm
Ø	Durchmesser
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
PAP	perioperative Antibiotikaprophylaxe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactic-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
re.	rechts
REM	Rasterelektronenmikroskop

rpm	revolutions per minute Deutsch: „Umdrehungen pro Minute“
RR	relatives Risiko
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
sER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
u.a.	unter anderem
UZG	Uhrzeigersinn
Vol.	Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
ZOI	Zone of Inhibition Deutsch: „Inhibitionszone“

C_i	Konzentration	[$\mu\text{g/ml}$]
F_{dilution}	Verdünnungsfaktor	[-]
V_{elution}	Volumen	[ml]

1 Einleitung und Zielstellung

Implantatassoziierte Infektionen gehören noch heute zu den häufigsten und gefürchtetsten Komplikationen in der Frakturversorgung. Jedes für die Frakturstabilisierung in den Körper eingebrachte Implantat erhöht das Risiko einer bakteriellen Infektion und die Ausbildung eines Biofilms (Gristina & Costerton, 1985). Der Einsatz systemischer Antibiotika zur Infektionsprophylaxe ist daher Teil der klinischen Routine. Aufgrund der reduzierten Durchblutung des Knochens im Frakturgebiet lassen sich Infektionen auf diese Art jedoch nur eingeschränkt verhindern oder therapieren. Die Kontaktstelle zwischen Gewebe und Implantat wird häufig gar nicht oder nur ungenügend von systemisch verabreichten Antibiotika erreicht (Fuchs et al., 2011). Aus diesem Grund wird die Modifikation von Implantatoberflächen mit Substanzen, die eine bakterielle Besiedlung verhindern, als eine sinnvolle Möglichkeit zur Infektprophylaxe- und therapie erachtet.

Um die beschriebene Problematik anzugehen wurde im Jahre 2005 erstmals ein intramedullärer Tibianagel mit einer Antibiotikabeschichtung für den klinischen Einsatz zugelassen (Expert Tibianagel PROtect, Synthes®). Die Entwicklung dieser Implantatbeschichtung für die lokale Freisetzung von Wirkstoffen erfolgte am Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Polymerbeschichtung Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) gibt den antibiotischen Wirkstoff Gentamicin in die Implantatumgebung ab und bietet einen lokalen Schutz gegenüber einer bakteriellen Oberflächenadhäsion.

Das Verständnis über die Freisetzung des eingearbeiteten Wirkstoffs im Organismus stellt eine notwendige Voraussetzung dar, um eine therapeutische Unterstützung im Sinne einer Infektprophylaxe zu gewährleisten. Wechselwirkungen zwischen der Beschichtung und dem umliegenden Gewebe können nicht vollständig *in-vitro* dargestellt werden. Wie sich die Beschichtung und die Freisetzung von Gentamicin *in-vivo* nach Einbringen in das Gewebe verhalten, ist aufgrund von methodischen Schwierigkeiten bisher unzureichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die *in-vivo* Freisetzung von Gentamicin aus der Implantatbeschichtung zu quantifizieren und dessen Anreicherung und Verteilung im umliegenden Knochengewebe sowie im Organismus zu untersuchen. Die Analyse der Freisetzung des Gentamicins von Titankirschnerdrähten in Ratten erfolgte mittels histologischer, immunhistochemischer und mikrobiologischer Methoden sowie über eine direkte Quantifizierung des Antibiotikums im Knochen-, Endost-, und Nierengewebe.

1.1 Tibiafrakturen und deren Klassifikation

Tibiafrakturen unter Beteiligung der Fibula gehören mit 63% zu den häufigsten Röhrenknochenfrakturen (Court-Brown & McBirnie, 1995; Court-Brown et al., 1998; Hansen et al., 2002; Khatod et al., 2003). Sie werden durch direkte Traumata mit starker Gewalteinwirkung aber auch durch indirekte Traumata verursacht (Gustilo et al., 1984). Aufgrund der Durchtrennung der Knochenstrukturen entsteht ein Funktions- und Stabilitätsverlust, der stets mit einem Weichteilschaden unterschiedlicher Schwere verbunden ist. Darauf bezogen hat die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) 1958 Leitlinien erarbeitet, die eine weltweit übergreifende Zuordnung mit Hilfe eines fünfstelligen Codes ermöglichen und somit eine normierte Behandlung zulassen. Die Einteilung erfolgt anhand der Lokalisation und der Schwere der Fraktur (AO Foundation, 2010). Die korrekte Einstufung des Frakturtyps und des Weichteilschadens ist für die weitere Therapie und Prognose von entscheidender Bedeutung. Tibiafrakturen lassen sich hinsichtlich der Morphologie und der Lokalisation einteilen. Diese sind: Frakturen im Bereich des proximalen Tibiaendes, des Tibiaschafts und des distalen Tibiaendes, im Bereich der Malleolen. Häufig ist bei Frakturen im Bereich der Tibia auch die Fibula mitbeteiligt. Tibiafrakturen entstehen oftmals im Bereich der Diaphyse und lassen sich anhand der AO-Klassifikation (AO 42 A-C) mit zunehmendem Schweregrad in drei Frakturtypen einteilen und zwar die einfache Fraktur (Typ A), die Keilfraktur (Typ B) und die Mehrfragmentfraktur (Typ C) (Abb. 1). Typ A Frakturen werden in spiralförmige sowie schräg- und querverlaufende Frakturen gegliedert. Die Typ B Frakturen werden unterteilt in Torsions-, Biegungs- und fragmentierte Biegungskeile. Zu den Typ C Frakturen zählen die kompensierte spiralförmige Fraktur, die Segment- und Trümmerfraktur.

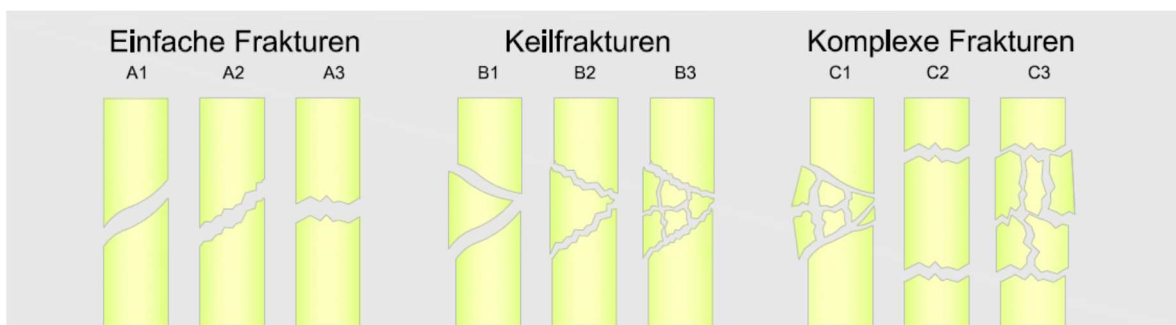


Abb. 1: AO Klassifikation der Tibiaschaftfraktur, Abbildung: eigene Darstellung

Von prognostisch herausragender Bedeutung ist die Klassifikation des begleitenden Weichteilschadens bei Tibiafrakturen. Zur Einteilung von Weichteilschaden offener Frakturen hat sich die Klassifikation nach Anderson und Gustilo durchgesetzt (Gustilo & Anderson, 1976) (Tab. 1). Diese lässt sich in die Grade I-III einteilen, die sich vor allem in

der Größe und in der Art des Weichteilschadens unterscheiden. Abhängig von dessen Ausmaß, der arteriellen Verletzung und der bakteriellen Kontamination werden Grad III Frakturen nochmals in die Typen IIIA-C unterteilt.

Tab. 1: Klassifikation des Weichteilschadens offener Frakturen nach Anderson und Gustilo (Gustilo & Anderson, 1976)

Grad I	Saubere Hautläsion < 1 cm, minimale Muskelkontusion, einfache Frakturform
Grad II	Hautläsion > 1 cm, ausgedehnter Weichteilschaden mit Lappenbildung, geringe bis mäßige Muskelquetschung, einfache Frakturform ohne Trümmerbruch
Grad III	Ausgedehnter Weichteilschaden unter Einbeziehung von Haut, Muskulatur und neurovaskulären Strukturen, Hochgeschwindigkeitstrauma mit erheblicher Quetschung
IIIA	Ausreichende Weichteildeckung des Knochens trotz umfangreicher Weichteilverletzung oder Lappenbildung
IIIB	Umfangreiche Weichteilverletzung mit periostalen Ablösungen und Exposition des Knochens, massive Kontamination
IIIC	Offene Fraktur, die eine Versorgung der arteriellen Verletzung benötigt

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit für den Schweregrad einer Weichteilverletzung in Kombination mit einer Fraktur stellt die Klassifikation nach Tscherné und Oestern dar (Tscherné, 1984). Sie unterscheidet darüber hinaus zwischen geschlossenen und offenen Frakturen (Tab. 2). Hauptsächlich wird deren Klassifikation für die Einschätzung des geschlossenen Weichteilschadens herangezogen. Bei 15% der Tibiafrakturen handelt es sich um offene Frakturen (Weiss et al., 2008). Im Gegensatz zu geschlossenen Frakturen ist deren Versorgung anspruchsvoller, aufgrund der geringen Weichteilabdeckung und des von anteromedial langen, nur von Haut überdeckten Arealen (Papakostidis et al., 2011). Dieses anatomische Merkmal führt dazu, dass insbesondere die distale Region für Pseudarthrosen (Khatod et al., 2003) sowie für posttraumatische Knochen- und Weichteilinfektionen (Märdian et al., 2015) infolge einer kritischen Minderperfusion, prädisponiert ist. Aufgrund dieser besonderen Bedingungen schrieb Mayr über den Therapiegrundsatz bei Tibiafrakturen, dass diese „[...] so konservativ wie möglich und so operativ wie nötig [...]“ behandelt werden sollten (Mayr, 2002). Dennoch können Frakturen in dieser Region nur selten konservativ versorgt werden. Dies ist im Einzelfall sowie bei Frakturen im Kindesalter angezeigt (Hansen et al., 2002; Mayr, 2002). Prinzipiell bestehen das Grundziel einer erfolgreichen Therapie in der Fragmentstabilisierung mit anatomischer Reposition, sodass eine Funktionswiederherstellung ermöglicht wird und die Blutversorgung gesichert ist (Märdian et al., 2015). Weitere Ziele sind die infektfreie Wiederherstellung, eine volle Funktionsausübung von Knie- und Sprunggelenk und die korrekte Rekonstruktion der Beinachsen in einem möglichst kurzen Zeitraum (Mayr, 2002).

Tab. 2: Klassifikation des Weichteilschadens geschlossener und offener Frakturen nach Tscherne und Oestern (Tscherne, 1984)

	Geschlossene Fraktur	Offene Fraktur
Grad 0	Fehlende oder unbedeutende Weichteilverletzung, indirekte Traumaeinwirkung, einfache Frakturform	-
Grad I	oberflächliche Schürfung oder Kontusion durch Fragmentdruck von innen, einfache bis mittelschwere Frakturform	Durchtrennung der Haut mit fehlender oder geringer Weichteilkontusion, einfach Frakturform
Grad II	tiefe kontaminierte Schürfung sowie Haut- oder Muskelkontusion durch direkte Krafteinwirkung, drohendes Kompartmentsyndrom, mittelschwere bis schwere Frakturform	Durchtrennung der Haut, umschrieben Haut- und Weichteilkontusion, mäßige Kontamination, alle Frakturformen
Grad III	ausgedehnte Hautkontusion, -quetschung oder Zerstörung der Muskulatur, subkutanes Décollement, manifestes Kompartmentsyndrom, Verletzung eines Hauptgefäßes, schwere Frakturform	Hautdurchtrennung mit ausgedehnter Weichteildestruktion, Gefäß- und Nervenverletzungen, starke Wundkontamination, jede offene Fraktur mit Ischämie, ausgedehnte Knochenzertrümmerung
Grad IV	-	totale und subtotale Amputation (letzteres geht immer mit einer komplett peripheren Ischämie einher)

1.2 Intramedulläre Stabilisierung von Tibiafrakturen

Tibiaschaftfrakturen können mit verschiedenen Verfahren operativ stabilisiert werden. Dabei stehen diverse Möglichkeiten zur Verfügung, wie die Plattenosteosynthese, der Fixateur externe und die Marknagelfixation (Bhandari et al., 2001; Bhandari et al., 2000). Bei der Auswahl zur chirurgischen Versorgung der Tibiaschaftfraktur wird ausschließlich auf die Marknagelung eingegangen, da diese die Grundlage für die antibiotische Infektprophylaxe durch eine lokale Implantatbeschichtung dieser Arbeit darstellt.

Die Marknagelfixation führt, verglichen mit dem Fixateur externe, zu weniger Komplikationen bezüglich anatomischer Fehlstellungen, der Entwicklung von Pseudarthrosen sowie von Infektionen, wodurch die Risiken für eine Nachoperation geringer sind (Bhandari et al., 2001; Hofmann et al., 2015). Die Schonung des Periosts und der Weichteile stellt einen weiteren Vorzug gegenüber anderen Osteosyntheseverfahren dar. Frakturen mit einem offenen Weichteilschaden von Grad IIIB werden heutzutage primär intramedullär stabilisiert (Mayr, 2002). Das Einbringen des Implantats erfolgt durch einen minimalinvasiven und frakturfernen Eingriff sowie durch eine perkutane Verriegelung, wodurch eine Schonung des Frakturbereichs erzielt werden kann (Märdian et al., 2015). Durch die Entwicklung der

proximalen und distalen Verriegelungstechnik erweist sich diese Art der Stabilisierung auch mit weit distal oder proximal metaphysären Frakturformen als geeignet (Hoenig et al., 2010). Der geringe Blutverlust und die geringgradige Gewebefreilegung intraoperativ sind ebenfalls günstig für den therapeutischen Einsatz. Die biomechanische Stabilität, die Möglichkeit einer frühen Weichteilrekonstruktion, kürzere Heilungszeiten und eine damit verbundene schnellere Rehabilitation stellen weitere Vorteile des Marknagels dar (Hofmann et al., 2015). Das heutige Verfahren der Marknagelosteosynthese basiert auf der Arbeit des Chirurgen Gerhard Küntscher, der 1940 auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in Berlin „seinen“ Marknagel präsentierte (Cross A. T. , 2001). Die Marknagelung dient als intramedulläre Schienung dia- oder metaphysärer Frakturen der langen Röhrenknochen, wie Femur, Humerus und Tibia. Das Verfahren der Marknagelung erfolgt nach folgendem Schema: Nach der Frakturpositionierung, der Bestimmung der Marknagellänge und des -durchmessers wird die Markhöhle eröffnet und der Nagel eingebracht. Anschließend ist eine proximale und distale Verriegelung obligat, um Rotation und Länge bei Mehrfrakturen zu erhalten und eine primäre Belastungsstabilität zu erzeugen. Unter Belastung führt die dynamische Verriegelung zu einer Kompression am Frakturspalt. Das biomechanische Prinzip in der Marknagelung unterscheidet sich hinsichtlich der auf- und unaufgebohrten Operationstechnik. Der aufgebohrte Marknagel gilt als konventionelle Methode. Nach Verschieben des Führungsdrahtes in die Markhöhle wird dieser überbohrt. Durch die Bohrung entsteht ein großflächiger Kontakt zwischen der Tibiakortikalis und dem Nagel. Der Einsatz von Verriegelungsschrauben dient zur Erweiterung der Indikation. Das Standardimplantat bei Unterschenkelfrakturen stellt der unaufgebohrte Verriegelungsnagel dar. Die Kraftübertragung erfolgt über Verriegelungsschrauben, um die fehlende Stabilität im Frakturgebiet zu erzeugen (Fairbank et al., 1995). Das Aufbohren des Markraums ist nicht notwendig. Die Verwendung von unaufgebohrten Marknägeln senkt das Risiko einer Lungenfettembolie bei Polytraumapatienten und das Infektionsrisiko. Weitere Vorteile sind die Reduktion der Wärmeabfuhr sowie, dass keine Störung der endostalen Blutversorgung und eine assoziierte Knochennekrose entsteht. So kann mit der unaufgebohrten Methode eine kortikale Revaskularisierung nach bereits sechs Wochen erreicht werden, hingegen mit der aufgebohrten Marknagelung erst nach zwölf Wochen. Dies ist von entscheidender Bedeutung bei schweren offenen Frakturen mit Beeinträchtigung der Blutversorgung (Schemitsch et al., 1994).

1.3 Postoperatives Infektionsrisiko

Offene Tibiaschaftfrakturen sind häufig in Folge eines schweren Weichteilschadens, einer gestörten Vaskularität (McHugh et al., 2011) und einem hohen Infektionsrisiko mit Komplikationen assoziiert (Gaebler et al., 2001; Gustilo & Anderson, 1976; Gustilo et al., 1984; Gustilo et al., 1990; Patzakis et al., 1983). Postoperativ können diese Komplikationen mit einer langwierigen und kostenintensiven Therapie einhergehen, verbunden mit einem langen Krankenhausaufenthalt und komplexen Revisionsmaßnahmen. Zudem können schwerwiegende Infektionen eine hohe individuelle sowie sozioökonomische Belastung für den Patienten darstellen (Uckay et al., 2013). Weiterhin kann eine Infektion zu einer gestörten Frakturheilung und selten auch zur Amputation der betroffenen Gliedmaße führen, beispielsweise bei Patienten mit der Stoffwechselerkrankung Diabetes Mellitus (Hannigan et al., 2015; Mouzopoulos et al., 2011). Bei besonders schweren Verletzungen, ist die Entwicklung einer Sepsis möglich (Al-Arabi et al., 2007; Singh et al., 2012). Tibiafrakturen zählen mit bis zu 50% zu den Verletzungen mit der höchsten Infektionsrate (Diefenbeck et al., 2006; Gustilo & Anderson, 1976; Gustilo et al., 1990; Lucke et al., 2005; Mader et al., 1992; Schmidmaier et al., 2006; Singh et al., 2012). Das Risiko einer Infektionsentwicklung ist bei offenen Frakturen, im Gegensatz zu geschlossenen Frakturen, höher (Darouiche, 2007). In einer retrospektiven Studie von Khatod et al. (2003) zeigte sich, dass von allen offenen Tibiafrakturtypen von Grad I-III 22,6% der Patienten eine Infektion entwickelten und 5,7% davon sogar eine Osteomyelitis. Zudem ist die Infektionsrate bei offenen Frakturen der Tibia zehnfach bis 20-mal höher als bei anderen offenen Skelettfrakturen (Patzakis et al., 1983).

Zusätzlich spielt der Status des Patienten, abhängig von dessen Alter und Ernährung, der Konsum von Tabakwaren, Begleiterkrankungen, wie Diabetes mellitus, chronische Entzündungsherde (z.B. Harnwegsinfekte, Infekte im Zahn-, Kiefer- und Hautbereich) oder die Einnahme von Immunsuppressiva eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Infektionen (Calhoun et al., 2009; Lazzarini et al., 2004).

Bakterielle Infektionen können sich bereits direkt, infolge einer Verunreinigung der Wunde während des Unfalls entwickeln und zu einer hämatogenen Streuung führen (Kälicke et al., 2006; Trampuz & Zimmerli, 2006). Die Dringlichkeit bezogen auf die zeitliche Realisierung des Debridements ist nicht klar erläutert, aber die meisten Chirurgen befürworten eine Durchführung innerhalb der ersten sechs Stunden (Khatod et al., 2003; Kindsfater & Jonassen, 1995; Spencer et al., 2004). Friedrich (1898) zeigte in einem Tiermodell (Meerschweinchen), dass eine signifikante Reduktion einer bakteriellen Besiedlung dann auftrat, wenn das Debridement innerhalb von sechs Stunden nach Trauma durchgeführt wurde. Robson et al. (1973) bestätigte dies später in Bezug auf menschliche Wunden. Im Zusammenhang mit der Klassifikation nach Gustilo, bei der offene Frakturen als signifikanter prognostischer Indikator für infektiöse Komplikationen gelten, berichteten Kindsfater & Jonassen (1995), dass bei Grad II und III Frakturen ein signifikanter Anstieg der Infektionsrate festgestellt wurde, wenn die Wundspülung und das Debridement mehr als

sechs Stunden betragen. Die Studien legen nahe, dass zeitliche Verzögerungen in der Durchführung des Debridements von Patienten mit offenen Frakturen bis sechs Stunden nach Frakturgeschehen durchaus zu rechtfertigen sind, wenn dadurch eine optimale Versorgung gewährleistet wird.

In vielen Fällen besteht weiterhin ein Risiko, dass die bakterielle Kontamination bereits während der chirurgischen Defektversorgung über die körpereigene Mikrobiota des Patienten, als auch des OP- bzw. Pflegepersonals erfolgt (Ayliffe, 1991; Lindsay et al., 2011). Eine unsachgemäße Hygiene, z.B. im Rahmen der Reinigung des Wundgebietes, der Sterilisation des Instrumentariums oder aber auch im Hinblick auf die räumlichen Bedingungen erhöhen die Gefahr der initialen Keimeinbringung und einer sich daraus entwickelnden postoperativen Infektion (Hansis, 2000; Rupp & Archer, 1994).

In einer retrospektiven Studie von Petrisor et al. (2005) wurden unter anderem die Ursachen einer postoperativen Infektionsentstehung nach aufgebohrter intramedullärer Frakturstabilisierung an Patienten mit geschlossenen und offenen Frakturen untersucht. Als ursächlich für die Entwicklung einer Infektion galten bei 43,8% der Patienten mit geschlossenen Frakturen ein ungeeigneter Faszienverschluss, ein notwendiger Austausch des Marknagels oder das Vorliegen einer thermischen Nekrose. 62,5% der Infektionen, bei Vorliegen einer offenen Fraktur, waren auf Spätfolgen der plastischen Chirurgie, wie eine ungeeignete Hautabdeckung, ein unangemessener Hautverschluss oder eine Myonekrose zurückzuführen.

In der operativen Versorgung zur Frakturstabilisierung, in denen Metall- bzw. Kunststoffimplantate eingesetzt werden, spielt die Fähigkeit einiger Bakterien zur Biofilmbildung und eine sich daraus mögliche resultierende implantatassoziierte Infektion eine bedeutende Rolle. Nach Einbringen des Implantats in einen Organismus wird dieses mit einer extrazellulären Polysaccharid-Matrix, der sogenannten Glykokalix überzogen (Hettfleisch & Schottle, 1993). Diese stellt nicht nur eine Adhäsionsfläche für körpereigene Zellen und der damit verbundenen erfolgreichen Integration des Implantats dar, sondern auch eine Adhäsionsfläche für körperfremde Zellen. (Gristina, 1987b) beschrieben die komplexen Abläufe als „race for the surface“, bei der ein „Wettlauf“ um die Adhäsion auf der Implantatoberfläche zwischen Bakterien und Gewebezellen, wie Fibroblasten und Osteoblasten, entsteht. Das Immunsystem des Patienten ist oft nicht in der Lage, eine Besiedlung zu verhindern, wenn die bakterielle Adhäsion vor der Gewebeintegration des Implantates auftritt (Gristina, 1987a). Innerhalb von sechs Stunden nach der Implantation ist eine Vorbeugung bakterieller Adhäsion entscheidend für den langfristigen Erfolg des Implantats. Denn in dieser kritischen Zeit ist das Implantat potenziell empfänglich für eine bakterielle Oberflächenkolonisation. Die Hemmung dessen ist somit einer der wichtigsten Schritte, um eine implantatassoziierte Infektion zu verhindern (Hetrick & Schoenfisch, 2006; Poelstra et al., 2002). Erfolgt nämlich eine Besiedlung durch Bakterien und deren Aggregation zu mehreren Schichten, beginnen diese mit der bakteriellen Synthetisierung von umhüllenden Matrixsubstanzen. Diese extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) dienen als schützende Matrix für die Bakterienkolonien (Sutherland, 2001). Dies führt zu

einer anschließenden Biofilmbildung und im weiteren Verlauf zu der Ausbildung einer implantatassoziierten Infektion (Abb. 2).

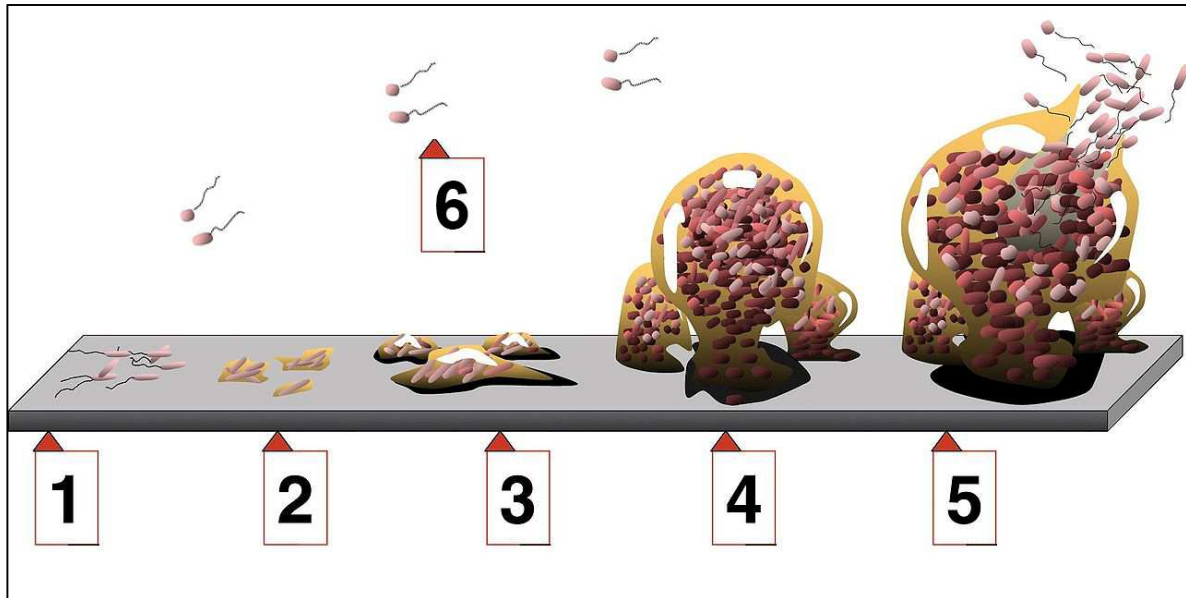


Abb. 2: Schematische Biofilmbildung auf der Oberfläche von chirurgischen Implantaten

(1) Besiedlung der Implantatoberfläche durch einzelne Bakterien (2) Aggregation und Anhaftung der Bakterien (3) Wachstum und Teilung der Bakterien für die Ausbildung eines Biofilms (4) Reifung des Biofilms (5) Freigabe einzelner Bakterien für eine weitere Besiedlung (6) Wiederholung des Zyklus, Abbildung modifiziert nach (Davis, 2007)

Implantatassoziierte Infektionen werden vor allem durch gram-positive Erreger wie *Staphylococcus aureus* (Trampuz & Zimmerli, 2006) und *Staphylococcus epidermidis* (Bernard et al., 2004) verursacht. Ein weiterer beschriebener Keim in diesem Zusammenhang ist *Pseudomonas aeruginosa* (Abdelghany et al., 2012). Die oben genannten Erreger gelten als die häufigsten Infektionsauslöser im Zusammenhang mit metallischen Implantaten, Weichteilinfektionen und der Ausbildung von Osteomyelitiden (Gristina, 1994; Gristina et al., 1988).

Durch die Biofilmbildung ist es verschiedenen Bakterienpopulationen möglich, in einem stabilen Ökosystem synergetisch zu existieren (Gristina, 1987b) und jahrelang hartnäckig bestehen zu können (Marrie & Costerton, 1985). Die umgebende Matrix dient den Keimen als Ernährungsmedium (Costerton et al., 1995) und erleichtert deren Kommunikation untereinander und damit den Austausch von Virulenzfaktoren (Davies et al., 1998; Johnson et al., 1986). Darüber hinaus können sich die Keime innerhalb des Biofilms differenzieren und ihre genetischen Expressionsmuster verändern. (Costerton et al., 1995; Donlan & Costerton, 2002; Flemming et al., 2007; Liu et al., 2015). In einem Biofilm befindliche Keime besitzen häufig eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika im Gegensatz zu den gleichen Bakterien in ungebundener Form (Stewart, 1996; Stewart & Costerton, 2001;

Widmer et al., 1991). Der Biofilm bietet den Bakterien Schutz vor der zellulären und humoralen Immunabwehr des Körpers sowie der bakteriziden Wirkung der Antibiotika (Olson et al., 2002). Durch die Penetrationsbarriere ist es dem antibiotischen Wirkstoff kaum möglich, bis zu den Bakterien vorzudringen. Durch eine Verlängerung der Diffusionsstrecke können sich innerhalb des Biofilms subinhibitorische Wirkstoffkonzentrationen ausbilden (Jansen & Peters, 1993), die eine Elimination der Bakterien erschwert und die Selektion resistenter Bakterienstämme fördert (Brown et al., 1990; Kälicke et al., 2006). Weiterhin wird die antibiotische Wirkung durch die geringere Wachstumsrate von Keimen in Biofilmen beeinträchtigt (Costerton et al., 1995; Donlan & Costerton, 2002; Flemming et al., 2007; Liu et al., 2015; Williams et al., 1997).

Abhängig von der Virulenz und den Resistenzmechanismen des Bakteriums, der Anzahl der örtlichen Kontamination sowie den Abwehrmechanismen des Wirtes, wird der Grad der Ausbreitung einer Infektion bestimmt (Costerton et al., 1995; Hansis & Arens, 1996; Lowy, 1998). Erfolgt eine Ausdehnung in das umliegende Weichteilgewebe, kann die Vaskularisierung des Knochens zusätzlich beeinträchtigt werden (Calhoun et al., 2009; Nelson et al., 1997). Trotz der körpereigenen Immunabwehr, dem chirurgischen Eingriff und einer antimikrobiellen Therapie ist es möglich, dass lebensfähige Bakterien weiter in dem traumatisierten und ischämischen Gewebe beherbergt werden (Lazzarini et al., 2004; Makinen et al., 2005). Die Infektion tritt wieder auf und kann in ein chronisches Stadium übergehen, welches sehr schwer zu therapieren ist (Krasko et al., 2007; Mader et al., 1992; Tuchscher et al., 2015). In der Studie von Khatod et al. (2003) entwickelten bis zu 5,7% der Tibiafrakturen vom Typ III im chronischen Infektionsverlauf als resultierende schwere Komplikation eine Osteomyelitis. Diese stellt sich als eitrige Infektion des Knochens und des Knochenmarks dar, die von Ödemen, Blutstauungen und Gefäßthrombosen begleitet wird. Die Entwicklung solcher Komplikationen können eine normale Frakturheilung verhindern und eine infizierte Pseudarthrose zur Folge haben (Ochsner et al., 1998; Zimmerli et al., 2004).

1.4 Antibiotikaprophylaxe und -therapie

Das oberste Ziel des Managements bei Weichteil- und Knocheninfektionen ist es, die Infektion so schnell wie möglich zu kontrollieren, bevor eine Knochenrekonstruktion erfolgt. Grundlage des operativen Eingreifens ist das Entfernen aller nekrotischen Sequester durch ein radikales und gründliches Debridement des gesamten Knochens (Kinik & Karaduman, 2008), welches jedoch teilweise einen erheblichen Knochendefekt hinterlässt, der Knochenaufbau, Knochentransplantation und andere Rekonstruktionen erforderlich macht. In einem weiteren Schritt erfolgt die Stabilisierung der Fraktur (Makinen et al., 2005) sowie eine adäquate Weichteilrekonstruktion und -abdeckung, um eine schnelle und ungestörte Wundheilung zu ermöglichen (Cierny et al., 2003). Dabei werden größere Gefäße, Nerven, Knochen und Sehnen mit gesundem Weichteilgewebe bedeckt, um sekundäre Schäden

durch Austrocknung der Gewebe und das Risiko einer nosokomialen Infektion zu minimieren (Schuschke et al., 2002). Weiterhin verhindert ein angemessenes Wundmanagement die Entstehung von Totraum, welcher gekennzeichnet ist durch ein vermindert durchblutetes, traumatisch geschädigtes, anergenes Gewebe und lokale Hypoxie. So können Toträume mit Textiltamponaden locker ausgefüllt, Wundtaschen drainiert und das Festhaften des Verbands auf dem Wundgrund durch regelmäßige Befeuchtung, Fettgaze- und Salbenaufgaben verhindert werden (Wirth, 2013). Ebenfalls ist es durch die Anwendung einer Vakuumversiegelung möglich, Totraum zu reduzieren und eine schnelle Ausbildung eines festen Granulationsrasens zu fördern (Schuschke et al., 2002). Die Verabreichung einer kurzfristigen prä- oder perioperativen systemischen antibiotischen Prophylaxe ist ein routinemäßiges Vorgehen und dient als unterstützende Maßnahme neben der chirurgischen Therapie und Sanierung des Infektlagers. Darüber hinaus kann die systemische antimikrobielle Prophylaxe gegen oberflächliche Wundinfektionen schützen (Darouiche, 2003). In einer Metaanalyse von Gosselin et al. (2004) erfolgte die Überprüfung einer therapeutisch präoperativen Gabe von systemischen Antibiotika bei insgesamt 913 Patienten mit offenen Frakturen. Das Ergebnis war eine 60-prozentige Reduktion des relativen Risikos der frühen Wundinfektionen, im Vergleich zu den Frakturen ohne antibiotische Prophylaxe oder der ausschließlichen Gabe von Placebo. In einer weiteren Studie erfolgte die antibiotische Applikation in einem Zeitraum von einer Stunde vor bis zwei Stunden nach Beginn des chirurgischen Eingriffs und zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion des Wundinfektionsrisikos (Norden, 1991), was die Relevanz der Intervention betont.

Ein entscheidender Parameter für eine erfolgreiche Infektionsprophylaxe ist die Auswahl des Antibiotikums. Primär erfolgt eine antibiotische Versorgung, die sich nach dem zu erwartenden Erregerspektrum, abhängig von der Frakturart, Grad des Weichteilschadens, Risikofaktoren des Patienten sowie nach der Keim- und Resistenzstatistik des Krankenhauses richtet (Beck et al., 1999). Wichtig für den Therapieerfolg ist zusätzlich die erreichte Serumkonzentration des eingesetzten Antibiotikums. Allerdings lassen sich Serumspiegel nicht uneingeschränkt als prädiktiver Parameter für den Therapieerfolg heranziehen, da starke Unterschiede zu der im Knochen und in dem umgebenden Gewebe erzielten Konzentration bestehen können (Fraimow, 2009). Das Erreichen einer ausreichenden antibiotischen Konzentration am Ort der Infektion durch eine systemische Wirkstoffverabreichung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen beispielsweise eine kurze Halbwertszeit des Antibiotikums, eine beeinträchtigte Vaskularisierung des infizierten Knochens sowie eine systemische Toxizität, resultierend aus einer erforderlichlich hohen antibiotischen Dosis (Nelson et al., 1997).

Bei der Bekämpfung von Bakterien in Biofilmen ist es notwendig, dass die Konzentration des eingesetzten Antibiotikums mehr als 50- bis 1000-mal höher sein muss als bei der Eradikation freier Keime (Donlan, 2002; Stewart & Costerton, 2001). Normalerweise ist dieses Niveau aufgrund der entstehenden Toxizität für den Patienten kaum zu erreichen. Im Knochen ist dies außerdem verkompliziert durch eine reduzierte Penetration der Antibiotika in infizierten und ischämischen Bereichen. Weiterhin stellt die Bakterien umgebende

Glykokalix eine Penetrationsbarriere für Antibiotika dar, die folglich zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke führt. Aus den genannten Gründen kann dies zu der Entwicklung einer subpotenten Antibiotikakonzentration innerhalb des Biofilms führen (Anwar et al., 1990; Jansen & Peters, 1993). Folglich besteht das Risiko, dass Mikroorganismen als Reaktion darauf, die Möglichkeit gegeben wird, „Verteidigungsstrategien“ sowie Resistenzmechanismen zu entwickeln.

1.4.1 Lokale antibiotische Infektionsprophylaxe

Aus den zuvor genannten Gründen ist es notwendig, eine Alternative oder therapeutische Ergänzung zur systemischen Antibiotikagabe in Form einer präventiven lokalen Applikation einzusetzen. Ein Ansatz ist die Anwendung von Systemen, die das Antibiotikum durch Integration in einen polymeren Trägerstoff direkt an die Gewebe-Implantat-Grenze transportieren, um dort eine unmittelbare antiinfektive Wirkung zu erreichen (Fuchs et al., 2011; Ostermann et al., 1995). Ziel ist es, implantatassoziierte Infektionen durch die Reduktion der Bakterien an der Implantatoberfläche sowie in unmittelbarer Nähe des Implantats zu verhindern und gleichzeitig die Implantatintegration in das Gewebe zu fördern (Darouiche, 2003; 2004; Diefenbeck et al., 2006; Lucke et al., 2005; Montali, 2006; Vester et al., 2010). Craig et al. (2014) verglichen in einer Metaanalyse die Infektionsrate offener Tibiafrakturen bei Patienten, die mit einer Marknagelung und zusätzlich mit einer lokalen antibiotischen Therapie behandelt wurden, mit Patienten, die nur eine standardmäßige systemische Antibiotikaprophylaxe erhielten. Die absolute Infektionsrate war geringer bei den Patienten, die begleitend einen lokalen antibiotischen Wirkstoff verabreicht bekommen hatten.

Eine lokale antimikrobielle Prophylaxe kann in verschiedenen Formen bereitgestellt werden. untersuchte in seiner Studie vier unterschiedliche lokale antibiotische Methoden, um die Entwicklung postoperativer Infektionen zu verhindern. Zwei Ansätze beschrieben eine implantatunabhängige Anwendung. Zum Einen erfolgte eine antibiotische Spülung des Defektgebietes und zum Anderen kamen spezifische Trägermaterialien, wie antibiotisch getränkte Kollagenschwämme zum Einsatz. Zwei weitere Ansätze beziehen sich auf die Modifikation der Implantatoberfläche, entweder intraoperativ mittels Eintauchen des Implantats in eine antimikrobielle Lösung oder präoperativ durch eine antimikrobielle Beschichtung des Implantats. Im Vergleich der vier genannten lokalen Methoden zur Infektprophylaxe, stellt als Ergebnis die antimikrobielle Beschichtung eines Implantats die vielversprechendste Methode dar. Die Vorteile liegen in der Kenntnis der genauen lokal vorhandenen antibiotischen Wirkstoffmenge und deren Verfügbarkeit über Wochen bis Monate, mit gering systemisch detektierbaren Serumkonzentrationen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Tibiaimplantate mit einer lokalen antimikrobiellen Beschichtung verwendet.

Durch eine Kombination aus Implantat und antimikrobiellen Wirkstoff kann das Implantat im Sinne der Frakturstabilisierung genutzt werden und gleichzeitig als Wirkstoffträger fungieren. Aufgrund der lokalen Verfügbarkeit des Antibiotikums können, im Vergleich zu

der systemischen Applikation, bis 1000-fach höhere lokale Wirkstoffkonzentrationen an der Implantatoberfläche und in dessen unmittelbarer Umgebung erreicht werden (Diefenbeck et al., 2006). Darouiche (2003) konnten dies ebenfalls in ihrer Studie bestätigen. Weiterhin hielt die lokale antimikrobielle Wirkung über Wochen bis Monate an. Zudem sind die systemischen Belastungen bei lokaler Applikation als gering einzustufen (Laurencin et al., 1993; Sasmor et al., 1993).

Das optimale System für eine lokale antibakterielle Prophylaxe sollte die chirurgische Technik nicht beeinflussen und mehreren Anforderungen entsprechen: Um Fremdkörperreaktionen zu verhindern, ist eine ausreichende Biokompatibilität vorteilhaft. Zudem sollte der polymere Trägerstoff biologisch abbaubar sein, um eine nachfolgende Operation für dessen Entfernung zu vermeiden. Polymere Trägerstoffe können in abbaubarer und nicht abbaubarer Form bereitgestellt werden. Das am häufigsten eingesetzte, nicht degradierbare Polymer ist Polymethylmethacrylat (PMMA). Es dient zum Einen als Zementspacer und zum Anderen als lokale Infektionsprophylaxe bei Einsatz als PMMA-Ketten. Da PMMA nicht resorbierbar ist, verbleiben etwa 70% der antibiotischen Dosis dauerhaft in dem PMMA-Zement (Montali, 2006) und in der Regel muss nach vier bis sechs Wochen das Trägermaterial wieder entfernt werden (Krasko et al., 2007; Lautenschlager et al., 1993). Zusätzlich sollte das Freisetzungsprofil des Wirkstoffs auf die klinischen Bedürfnisse zugeschnitten sein (Montali, 2006), wodurch es möglich ist, die Freisetzung des Wirkstoffes durch dessen Integration in ein biologisch abbaubares Polymer auf ein bestimmtes Zeitintervall zu begrenzen. Dieser Ansatz minimiert das Risiko der Ausbildung resistenter Stämme (Diefenbeck et al., 2006).

1.4.2 Poly(D,L-Laktid) - ein bioabbaubarer Polymer-Trägerstoff

Die Erprobung und der Einsatz biodegradierbarer Polymerbeschichtungen, in denen zur lokalen Freigabe Antibiotika eingearbeitet werden, dienen als Weiterentwicklung der zur Osteosynthese verwendeten Materialien. Biodegradierbare Polymere zeichnen sich dadurch aus, dass der Körper in der Lage ist, die Substanzen abzubauen und zu metabolisieren. Der Abbau der Polymilchsäuren, wie dem Poly(D,L-Laktid, PDLLA) erfolgt enzymatisch oder durch hydrolytische Spaltung des Polymergrundgerüsts zu Oligomeren. Die freigesetzte Milchsäure wird nach Einschleusen in den Zitronensäurezyklus des Organismus zu Kohlendioxid und Wasser verstoffwechselt (Cutright et al., 1974; Gollwitzer, 2003; Pitt et al., 1981). Degradierbare Polymere werden parenteral als zu applizierende Wirkstoffträger verabreicht (Middleton & Tipton, 2000; Thoma K., 1991) oder finden Einsatz als resorbierbares Osteosynthese- und Nahtmaterial, wodurch eine sekundäre chirurgische Entfernung des Implantats nicht erforderlich ist (Juutilainen et al., 1997; Kumta et al., 1992; Nelson et al., 1997). Das Polymer PDLLA dient als Trägermaterial für Medikamente sowie biochemische Substanzen und hat hervorragende Eigenschaften in der Verwendung als Implantatbeschichtung (Schmidmaier et al., 2001b). Dafür kann es durch ein Tauchverfahren aufgebracht werden, sodass eine Beschichtung von polierten, unregelmäßigen oder porösen Oberflächenmaterialien möglich ist (Gollwitzer, 2003). Es

zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität (Gollwitzer H., 2002; Schmidmaier et al., 2001b) und hervorragende Biokompatibilität *in-vivo* aus (Hutmacher et al., 1996; Schmidmaier et al., 2001a). Die Freisetzungskinetik des integrierten antibiotischen Wirkstoffes ist abhängig von dem Abbauverhalten des Polymers und basiert auf dem Prinzip der Diffusion und Aufquellung, gefolgt von einer schnellen Polymererosion (Garvin et al., 1994; Schmidmaier et al., 2001b; Strobel et al., 2011a). Zu Beginn erfolgt eine starke Freisetzung des Antibiotikums durch die schnelle Herauslösung der auf der Polymeroberfläche befindlichen antibiotischen Partikel. Tiefere Partikel hingegen lösen sich erst nach Degradation des Polymers. Die Degradationsrate hängt auch von der lokalen Umgebung ab. Eine gut vaskularisierte Umgebung führt zu einem schnelleren Abbau als eine avaskuläre Region (Kumta et al., 1992). Weiterhin wird die Freisetzung des Antibiotikums durch die chemischen Eigenschaften des Polymers und des Wirkstoffs, dessen Konzentration sowie durch die Partikelgröße beeinflusst. Die beschriebenen Vorteile der lokalen Applikation von PDLLA-beschichteten Implantaten begründen die bereits erfolgreiche klinische Anwendung zur Prophylaxe von implantatassoziierten Infektionen (Fuchs et al., 2011; Schmidmaier et al., 2006; Vester et al., 2010). Die Kombination aus einem biodegradierbaren Implantat und einem lokal integrierten Wirkstoff stellt im Management von orthopädischen Infektionen eine optimale Infektionsprophylaxe von Knochen- und Weichteilgewebe dar (Baro et al., 2002; Castro et al., 2003; Lucke et al., 2003; Lucke et al., 2005). In der *in-vitro* Studie von Gollwitzer (2003) wurde gezeigt, dass die in das Polymer eingebauten antibiotischen Stoffe Gentamicin und Teicoplanin lokal eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion zur Folge hatten. Eine implantatassoziierte Osteomyelitis konnte in der Studie von Lucke et al. (2005) durch die systemische Verabreichung von Gentamicin in 15% der Fälle verhindert werden. Im Gegensatz dazu war die lokale Applikation von Gentamicin, freigesetzt aus einer PDLLA-Beschichtung, effektiver. Der Ausbruch einer Infektion konnte in bis zu 90% der Fälle verhindert werden, in denen Tiere mit Gentamicin beschichteten Kirschnerdrähten behandelt wurden und in 80% der Fälle mit einer kombinierten Versorgung aus lokaler und systemischer Antibiotikaapplikation. In der Studie von Craig et al. (2014) konnte durch die Verwendung eines lokal verabreichten antibiotischen Wirkstoffes in Verbindung mit den prophylaktischen Antibiosen gezeigt werden, dass die Infektionsrate bei Patienten mit schweren Frakturen von 14,4% auf 2,4% gesenkt werden konnte. Daher stellt die Kombination einer systemischen Antibiotikaprophylaxe mit einer lokalen Anwendung eines antiinfektiven Wirkstoffes durch Integration in eine PDLLA-Beschichtung eine sinnvolle Möglichkeit dar, um sowohl eine implantatassoziierte Infektion, als auch eine daraus resultierende Osteomyelitis zu verhindern (Lucke et al., 2005).

Als geeigneter Wirkstoff für die Beschichtung von Implantaten als lokale Infektionsprophylaxe dient das Aminoglykosid Gentamicin. Bisher existieren einige Studien über dessen Verwendung als antimikrobielle Beschichtung von Osteosynthesematerialien (Lucke et al., 2003; Lucke et al., 2005) und dessen Einsatz bei implantatassoziierten Infektionen (Schmidmaier et al., 2006). Aufgrund seiner guter Knochengängigkeit hat sich

der Wirkstoff in der Orthopädie etabliert (Lucke et al., 2003) und deckt durch sein breites antimikrobielles Spektrum die Keime ab, die häufig in Verbindung mit tiefen Wundinfektionen und Osteomyelitiden auftreten. Schon seit längerem findet Gentamicin lokale Anwendung in der in der Knochenchirurgie, durch dessen Einbringen in Knochenzement (Palacos®), in Form von Antibiotika-Ketten (Septopal®), als Bestandteil von Kollagenschwämmen (Sulmycin-Implant®), Kollagenvlies (Septocoll® E) oder von Knochenfüllmaterial (Herafill®).

Gentamicin ist ein hochwirksames Breitbandantibiotikum, welches sowohl gegen gram-negative als auch gram-positive Bakterien wirkt, die sich sowohl in der Ruhephase als auch in der Teilungsphase des Vermehrungszyklus befinden. Bei Infektionen durch den Erreger *Pseudomonas aeruginosa* wird die Kombination mit β -Lactam-Antibiotika empfohlen. Als Gentamicin-sensibel gelten Erreger mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (Aktories K., 2013). Die bakterizide Wirkung beruht auf der Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese durch irreversible Bindung an die 30s-Untereinheit der Bakterienribosomen, wodurch das Ablesen der mRNA verhindert wird (Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, 2015; Yoshizawa et al., 1998). Für eine systemische Wirkungsentfaltung sollte eine parenterale Applikation erfolgen, da nach oraler Gabe nur eine geringe Resorption und Metabolisierung des Wirkstoffes im Organismus stattfindet. Serumspitzenwerte sind bereits nach 30 - 60 Minuten zu messen (Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, 2015). Die dosisunabhängige Ausscheidung erfolgt renal durch glomeruläre Filtration. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei normaler Nierenfunktion bei etwa zwei Stunden. Eine Anreicherung des Gentamicins erfolgt in den proximalen Tubuluszellen der Nierenrinde durch aktiven Transport (Cui et al., 2015). Geringe Konzentrationen finden sich in Leber, Gallenblase, Lunge und Milz. Zu beachten ist das Nebenwirkungsprofil, welches durch seine Oto- und Nephrotoxizität charakterisiert ist (Blunston et al., 2015; Khalili et al., 2013; Tange et al., 1995).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Implantatassoziierte Infektionen der Tibia zählen zu den schwerwiegendsten Komplikationen in der Unfallchirurgie und Orthopädie. Ursächlich ist die initiale bakterielle Adhäsion an Fremdmaterialien nach Implantation. Die Modifikation und Optimierung der Oberfläche von Osteosynthesematerialien mit einer lokalen antiinfektiven Beschichtung dient der Prophylaxe von implantatassoziierten Infektionen.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Integration des antibiotischen Wirkstoffes Gentamicin 10% w/w in eine biodegradierbare Poly(D,L-Laktid) Beschichtung von Titankirschnerdrähten. Der Abbau des Polymers erfolgt vollständig durch hydrolytische Spaltung und ermöglicht somit die lokale Freisetzung des eingearbeiteten Antibiotikums direkt am Knochen-Implantat-Interface. Für diese Arbeit wurde der Wirkstoff Gentamicin

ausgewählt, da er sich bereits als zuverlässig in der Anwendung der Knochen- und Weichteilchirurgie bewährt hat.

Bisher konnte das *in-vivo* Freisetzungsverhalten antimikrobieller Wirkstoffe und die Degradation der Implantatbeschichtung nur unzureichend beschrieben werden. Daher dient diese Arbeit dazu, das Freisetzungsverhalten von Gentamicin *in-vitro* und *in-vivo* aus der bioresorbierbaren Beschichtung zu überprüfen und dessen Anreicherung und Verteilung im umliegenden Knochengewebe sowie in der Niere und im Serum zu untersuchen. Das Freisetzungsverhalten soll anhand histologischer, immunhistochemischer, mikrobiologischer Methoden sowie über eine direkte Quantifizierung des Antibiotikums erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Titankirschnerdrähte und Beschichtung

In der Studie wurden von der Firma Synthes® beschichtete sterile Titankirschnerdrähte mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Länge von 15 cm verwendet. Die Drahtoberfläche war mit einem biodegradierbaren Polymer Poly(D,L-Laktid) als Trägermaterial und dem darin integrierten antibiotischen Wirkstoff Gentamicin 10% (w/w in PDLLA) beschichtet. Die Titankirschnerdrähte wurden durch Eintauchen auf eine Höhe von 2 cm beschichtet. Die daraus resultierende Beschichtungsfläche betrug 6,25 cm² mit einer Gesamtbeschichtungsmenge von 629 µg. Dabei entsprachen 83% (522 µg) der Gesamtbeschichtung dem Trägerstoff PDLLA und 17% (107 µg) Gentamicinsulfat. Da Gentamicin in Form seines Sulfatsalzes angewendet wurde, entsprechen 100% Gentamicinsulfat 60% (64 µg) Gentamicin.

Die Gentamicinfreisetzung von der Implantatoberfläche wurde sowohl in einer *in-vitro* Freisetzungsstudie als auch *in-vivo* nach Implantation im Rattenmodell untersucht.

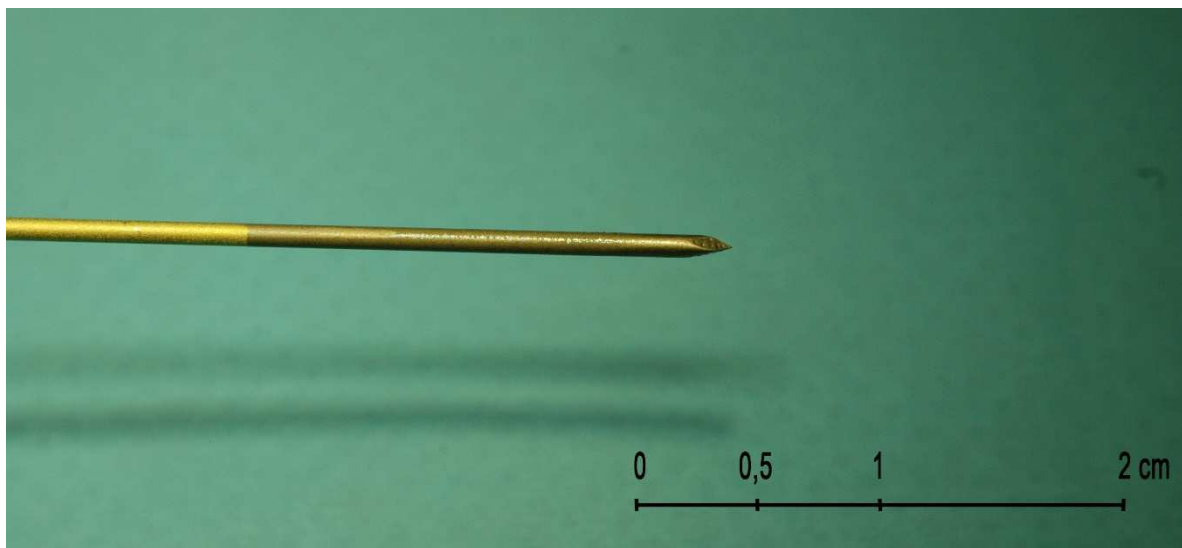


Abb. 3: Darstellung eines Titankirschnerdrahtes nach der Entnahme aus der Transportverpackung.

Deutlich zu erkennen ist die Beschichtungslänge von 2 cm beginnend an der apikalen Spitze des Drahtes sowie die Titanoberfläche oberhalb der Beschichtung.

2.2 *In-vitro* Analyse

Die *In-vitro* Studie diente dazu, die Freisetzung des Wirkstoffs Gentamicin aus der Titankirschnerdrahtbeschichtung zu untersuchen. Die Freisetzung wurde über einen Zeitraum von 42 Tagen untersucht. Jeder Draht befand sich einzeln in einer Pufferlösung. Die Analyse des Zeitraums zehn bis 60 Minuten erfolgte mit insgesamt sechs Drähten. Nach zehn Minuten wurde eine bestimmte Probenmenge entnommen und gemessen. Dieser Vorgang wiederholte sich alle zehn Minuten bis zu einem Zeitpunkt von 60 Minuten. Der gleiche Ablauf wiederholte sich mit neun weiteren Drähten in einem Zeitraum von einer Stunde bis 42 Tage (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht zu den Messzeitpunkten und der Anzahl der verwendeten Drähte für die *in-vitro* Elution (10 min – 42 d)

Zeitpunkt	Minuten [min]						Stunden [h]			Tage [d]					
	10	20	30	40	50	60	1	4	24	3	7	14	21	28	42
Anzahl Drähte	6						9								

Die Untersuchung der Freisetzung erfolgte für alle Titankirschnerdrähte identisch in Anlehnung an Strobel et al. (2011b). Die Drähte wurden zunächst mit einer Zange auf einer Höhe von 5 cm abgetrennt. 5 ml sterile Phosphat-Pufferlösung (PBS) wurden auf 37°C erwärmt und in 15 ml Falcontubes vorgelegt. Die Drähte wurden der PBS hinzugefügt, sodass die Beschichtung komplett vom Puffer bedeckt war. Nach verschiedenen Zeitpunkten (zehn Minuten bis 42 Tage) wurden 0,5 ml Probe entnommen und durch 0,5 ml frisches 37°C warmes, steriles PBS ersetzt. Daraus ergab sich ein Verdünnungsfaktor $F_{\text{dilution}} = 0,9$. Anschließend wurden die Falcontubes bis zum nächsten Analysezeitpunkt in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Die entnommene Probenflüssigkeit von 0,5 ml wurde bis zur Analyse bei - 20°C verwahrt.

Die kumulative Freisetzungskinetik zwischen den Probenentnahmezeiträumen wurde wie folgt berechnet (Strobel et al., 2011a):

$$FK = \sum ((c_i \cdot V_{\text{elution}}) - (c_{i-1} \cdot V_{\text{elution}} \cdot F_{\text{dilution}})) \quad [\mu\text{g/ml}]$$

c_i	Konzentration	[$\mu\text{g/ml}$]
V_{elution}	Volumen	[ml]
F_{dilution}	Faktor	[-]

Nach Beendigung der Elution wurden exemplarisch zwei Implantate mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops bildlich dargestellt.

2.3 *In-vivo* Analyse

2.3.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen und nach Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (Genehmigungsnummer G0046/12) genehmigt. Es wurden weibliche Sprague Dawley® Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 20 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von $300 \text{ g} \pm 21 \text{ g}$ (MW \pm SD) verwendet. Die Haltung der Versuchstiere und die Durchführung der Versuche erfolgte in den Räumen der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

Die Versuchstiere wurden zunächst eine Woche nach Anlieferung gehalten, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Die Einteilung der Tiere erfolgte in neun Gruppen entsprechend dem *in-vitro* Versuch (eine Stunde bis 42 Tage) mit jeweils vier Tieren pro Gruppe. Die Ratten wurden dem Zufallsprinzip nach an der Schwanzwurzel mit einem festgelegten Farbschema nummeriert und den einzelnen Gruppen randomisiert zugeordnet. Die Tiere wurden in Gruppen zu je vier Tieren in Versuchstierkäfigen gehalten. Durch die Haltung in der Gruppe, sowie die Zugabe von Käfigeinrichtungen (Zellstoffmaterial, Plastikröhren, Nagehölzer) wurde versucht auf die physiologischen Bedürfnisse der Tiere einzugehen. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Belüftung des Stalls erfolgte durch eine Klimaanlage, sodass eine konstante Raumtemperatur von $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ und eine relative Luftfeuchtigkeit von $60\% \pm 15\%$ aufrechterhalten werden konnte. Die Regelung der Lichtverhältnisse wurde entsprechend an einen natürlichen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus angepasst.

2.3.2 Operativer Eingriff

Die Implantation der Kirschnerdrähte erfolgte unter sterilen Bedingungen in beide Hintergliedmaßen in den Markraum der Tibiae. Der Knochen sowie das umgebende Periost blieben, mit Ausnahme der Kirschnerdrahteintrittsstelle, unversehrt. Die Einleitung der Narkose wurde mithilfe einer kurzen Inhalation (O_2 : 1,5 l/min; Isofluran: 3,5 Vol. %) durchgeführt. Die Tiere wurden dafür in einen dicht verschließbaren Plastikbehälter gesetzt, in den das Gasgemisch eingeleitet wurde. Sobald das Tier narkotisiert war, wurde es herausgenommen und die Injektionsnarkose mittels Ursotamin® (80 mg/kg Körpergewicht) (KGW) und Rompun® 2% (12 mg/kg KGW) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Narkosetiefe wurde durch Kneifen in die Zwischenzehenhaut kontrolliert. Mit dem Eingriff wurde erst begonnen, wenn die Tiere das jeweilige Bein nicht mehr zurückzogen und somit ein ausreichendes Toleranzstadium erreicht war. Mit ausreichender Narkosetiefe wurde die Harnblase ausgestrichen. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde den

Tieren Bepanthen® Augen- und Nasensalbe appliziert. Beide Hintergliedmaßen wurden mit Mulltupfern gereinigt und befeuchtet sowie das Operationsfeld großzügig rasiert. Im Anschluss wurde selbiges mit Jodlösung desinfiziert. Der Eingriff erfolgte auf einer Wärmematte. Während der Narkose wurden die Tiere permanent kontrolliert sowie Atem- und Pulsfrequenz überwacht. Das Einbringen des Implantats wurde auf Grundlage der Arbeit von Schmidmaier et al. (2001b) durchgeführt (Abb. 4a - d). Der operative Zugang erfolgte durch einen 3 mm großen Hautschnitt medial der Tuberositas tibiae. Als Orientierungshilfe diente der y-förmige epifasziale Venenplexus über der Tuberositas tibiae. Im Anschluss wurde der Markraum der proximalen Metaphyse von craniomedial mithilfe eines 0,8 mm Kirschnerdrahtes unter Drehbewegungen aufgebohrt. Dieser wurde bis zwischen das Ende der Tibia und dem Articulatio talocruralis vorgeschoben. Der gleiche Vorgang wurde mit einem einem Millimeter langen Kirschnerdraht wiederholt. Anschließend wurde der beschichtete Titandraht in die gesamte Markhöhle eingebracht und somit die Beschichtungslänge vollständig in der Tibia appliziert. Der überstehende Kirschnerdraht wurde an der Austrittsstelle mit einer Kneifzange abgetrennt. Das Vorbohren und auch das Einbringen des Implantats wurden intraoperativ unter Durchleuchtung mittels C-Bogen kontrolliert, um eine korrekte Lage des Implantats zu garantieren.



Abb. 4: chirurgische Implantation des Titankirschnerdrahtes in die Tibia

(a) zur Operation vorbereitetes Tier (b) Operationsfeld nach dem Hautschnitt (c) Eröffnung des Markraums mit Kirschnerdraht (d) Einbringen des Titankirschnerdrahts in die Markhöhle der Tibia (Quelle: AG Wildemann)

Die Haut wurde mittels Einzelknopfnahnt verschlossen und anschließend Pflasterspray aufgetragen. Nach Abschluss des chirurgischen Eingriffs erfolgte ein laterolaterales Kontrollröntgen beider Hintergliedmaßen zur Dokumentation der Implantatposition. Zur postoperativen Schmerzanalgesie erfolgte eine einmalige Injektion mit Temgesic® (0,05 mg/kg KGW) subkutan (s.c.) und eine orale Therapie über das Trinkwasser mit Tramal® (25 mg/L) für drei Tage. Weiterhin erhielten die Tiere 2 ml körperwarme 0,9% Natriumchloridlösung je Körperseite s.c. Tiere, bei denen die Untersuchung der Gentamicinfreisetzung nach mehr als „vier Stunden“ nach Implantation erfolgen sollte, wurden wieder aus der Narkose erweckt. Bis zum Wiedererwachen wurden die Tiere einzeln unter einer Wärmelampe gelagert und befanden sich währenddessen unter stetiger Beobachtung. Anschließend erfolgte die Rückführung in die Gruppenhaltung. Täglich wurden die Operationswunde, das Verhalten sowie die Trinkwasser- und Futteraufnahme kontrolliert. Es wurde speziell darauf geachtet, ob die Tiere ihre operierten Extremitäten physiologisch belasteten. Am Tag nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Ratten in Dreier- bzw. Vierer-Gruppen gehalten.

2.3.3 Euthanasie und Probenentnahme

Vor der Euthanasie erfolgte die Einleitung der Narkose mithilfe einer kurzen Inhalation (O₂: 1,5 l/min; Isofluran: 3,5 Vol. %), wie oben beschrieben. Nach dem die erwartete Wirkung eingetreten war, wurde die Injektionsnarkose mittels Ursotamin® (80 mg/kg KGW) und Rompun® 2% (12 mg/kg KGW) i.p. verabreicht. Vor der Euthanasie erfolgten ein Abschlussröntgen der Hintergliedmaßen für eine abschließende Beurteilung der Implantatlage und zur Begutachtung des Weich- und Knorpelgewebes sowie eine finale Blutentnahme aus dem Herzen. Entsprechend den Zeitpunkten wurden die Tiere euthanasiert. Die Tiere die zu den Zeitpunkten „eine“ und „vier Stunden“ nach Implantation verwendet wurden (Tab. 4), konnten im Rahmen der Erstnarkose euthanasiert werden bzw. wurden während der Narkose überwacht, nach zwei Stunden mit einem Drittel der Initialdosis nachdosiert und dann euthanasiert.

Tab. 4: Übersicht zu den Untersuchungszeitpunkten für die *in-vivo* Analyse und der geplanten Anzahl an Tieren. Zu den ersten beiden Zeitpunkten (1 h – 4 h) erfolgte kein Wiedererwachen aus der Narkose.

Untersuchungszeitpunkt	Stunden [h] nach Implantation			Tage [d] nach Implantation					
	1	4	24	3	7	14	21	28	42
Anzahl Tiere	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Die Blutentnahme erfolgte mittels Herzpunktion. Um eine Gerinnung des Blutes im Kanülenlumen zu vermeiden, wurde die Kanüle zur Punktion zuvor mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) durchgespült. Im Anschluss wurde das Herz links lateral, transversal zur Körperoberfläche in Höhe des dritten bis fünften Intercostalraums punktiert und das Blut anschließend in ein Serumröhrchen umgefüllt. Die Euthanasie erfolgte schließlich über dieselbe Kanüle durch Injektion von 1 ml Rompun® 2%. Das Serum wurde nach zwei Stunden für zehn Minuten und 4000 „revolutions per minute“ (rpm) zentrifugiert (Makinen et al., 2005), der Überstand pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C tiefgefroren. Nach sicherer Feststellung des Todes wurden die zu untersuchenden Proben entnommen. Dafür wurden jeweils beide Tibiae aus der Hintergliedmaße zwischen *Articulatio genus* und *Articulatio talocruralis* mit einem Skalpell herausgetrennt, von Bindegewebe, Sehnen und Muskulatur befreit und die Fibula entfernt. Die Tibia wurde für die anschließende Gentamicinbestimmung in drei Teile zerlegt (Abb. 5), in ein proximales und distales Endstück (ohne direkten Kontakt zum Titankirschnerdraht), sowie in den mittleren Tibiaschaft (mit direktem Kontakt zum Titankirschnerdraht).

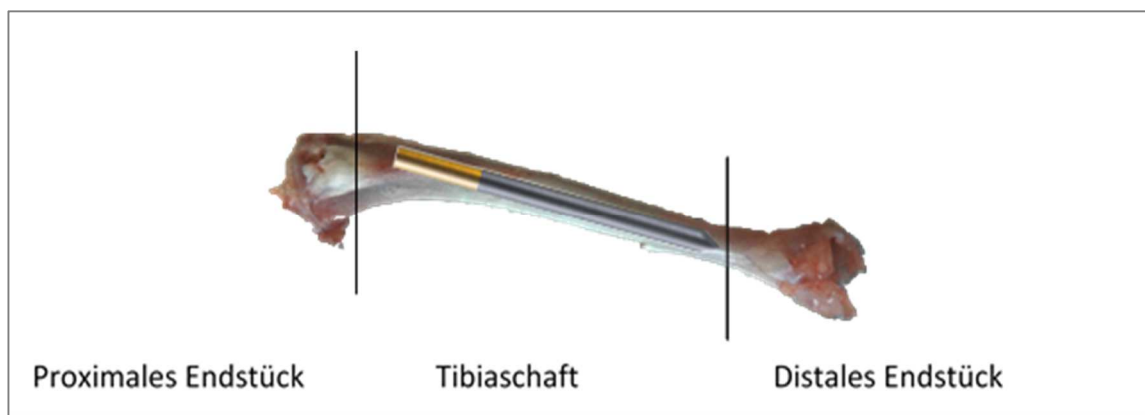


Abb. 5: schematische Darstellung der Position des Titankirschnerdrahtes im Tibiamarkraum sowie die vorgenommene Dreiteilung des Tibiaknochens für die anschließende separate Aufbereitung

Mit einem Diamantscheibentrenner wurde das proximale Endstück, bestehend aus den lateralen und medialen Condylen, vor der Eintrittsstelle des Implantats abgesetzt und in ein Eppendorfgefäß für die Negativkontrollanalyse gegeben. Anschließend wurde der Tibiaschaft lateral und medial in Längsrichtung von proximal nach distal aufgetrennt. Die aufgesägten Knochenstücke wurde entfernt und der Draht mit einer Pinzette aus dem Markkanal entnommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben (Abb. 6a – d). Das distale Stück der Tibia wurde an der Stelle mit dem Diamantscheibentrenner unterhalb des Implantates abgesägt. Das Endost wurde mit einem scharfen Löffel aus dem geöffneten Markkanal ausgekratzt und in ein Eppendorfgefäß, das vor und nach der Probenzugabe gewogen wurde, überführt. Ebenfalls wurden beide Nieren entnommen. Für den Gentamicinnachweis wurde die rechte Niere transversal geteilt. Die linke Niere wurde für

die histologische Untersuchung in eine Plastikkassette gelegt und mit isotoner Formaldehyd-Alkohol-Lösung fixiert. Die verschiedenen Proben der Tibiae, die rechte Niere sowie das Implantat wurden unmittelbar nach Entnahme in ein Eppendorfgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff verbracht sowie bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

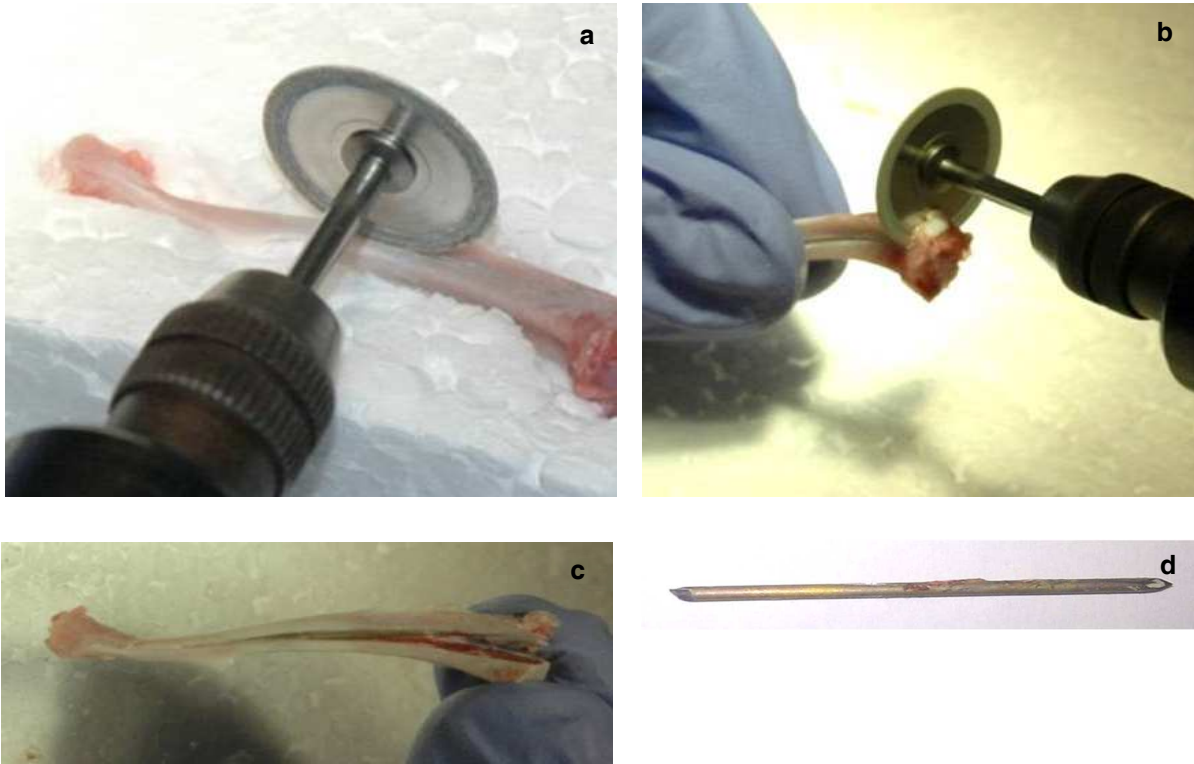


Abb. 6: Freilegung des Implantats mittels Diamantscheibentrenner, (a) Auffräsen des Tibiaschafts in Längsrichtung (b) Entfernung des proximalen Endstücks der Tibia (c) nach Entfernung des proximalen Endstücks ist das Implantat in der Markhöhle erkennbar (d) Implantat nach Entnahme aus der Markhöhle mit Geweberückständen

2.4 Probenaufbereitung

2.4.1 Aufarbeitung des Knochengewebes

Als Grundlage für die Knochenaufbereitung wurde das Protokoll von Vester et al. (2010) herangezogen und variiert. Zu Beginn der Analyse wurden pro Tibia vier Eppendorfgefäße (proximales und distales Endstück sowie zwei Gefäße für den Tibiaschaft) vorbereitet und deren Leergewicht notiert. Die Knochenproben wurden von -80°C in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Gefäß überführt. Mörser und Stößel wurden mithilfe des Stickstoffes gekühlt, um Anhaftungen von Probenmaterial während des Mörservorgangs zu verhindern. Der zu bearbeitende Knochenabschnitt wurde unter weiterer ständiger Stickstoffkühlung im Mörser zu einem homogenen Knochenpulver verarbeitet und das Pulver in das jeweilige

Eppendorfgesäß umgefüllt. Zwischen jeder Probenbearbeitung wurden Mörser, Stößel und Spatel sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurde das Gewicht des Eppendorfgesäßes mit der enthaltenen Probe erneut bestimmt. Das Knochenpulver wurde mit 0,001 mol/l Salzsäure in einem Verhältnis 100 mg Probe / 1 ml HCl aufgefüllt. Alle Proben wurden dann für zwei Minuten gevortext und vier Tage bei 4°C auf einem Schüttler bei Stufe 1,5 eluiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Zentrifugation für 30 Sekunden, 10.000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfgesäß pipettiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.2 Aufarbeitung des Endosts

Die Probenaufbereitung wurde in Anlehnung an das Protokoll von Vester et al. (2010) variiert durchgeführt. Das Endost wurde mit 300 µl Aqua dest. gemischt und auf Eis gestellt. Das Gewebe wurde mit dem Ultra Turrax und einem Dispergierwerkzeug (S 10 N - 10 G - ST) auf Stufe drei homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Aufsatz entfernt, sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Die Proben wurden nach Homogenisierung zwei Minuten gevortext und für vier Tage bei 4°C eluiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.4.3 Aufarbeitung des Titankirschnerdrahtes

Für die Bestimmung der verbliebenen Beschichtung auf dem Implantat wurden die Kirschnerdrähte aufgrund der unterschiedlichen Lösungseigenschaften des Trägermaterials PDLLA (hydrophob) und des Wirkstoffs Gentamicin (hydrophil) mithilfe einer Phasentrennung ausgeschüttelt. Zu Beginn wurde der Draht auf einer Feinwaage dreimal gewogen und der Mittelwert notiert. Anschließend wurde der Draht in einen Kolben, gefüllt mit 9 ml Butylacetat, zum Lösen der Polymerbeschichtung gegeben. Der Kolben wurde für zehn Minuten in einem Ultraschallbad behandelt und danach für zehn Minuten auf einem Schüttler bei Stufe zwei sanft geschwenkt. Anschließend wurde der Draht erst mit 1 ml Butylacetat und danach mit 5 ml 0,001 mol/l HCl abgespült, in ein leeres 15 ml Falconröhrchen überführt und bei -20°C verwahrt. Zu der Lösung im Kolben wurden weitere 20 ml 0,001 mol/l HCl gegeben, so dass das finale Volumen 35 ml betrug. Die Butylacetat - HCl - Flüssigkeit wurde, bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war, 20 Minuten bei Stufe 1,5 auf einem Magnetrührer gemischt (Abb. 7a). Die Mischung wurde dann für fünf bis zehn Minuten stehen gelassen, bis eine Phasentrennung klar sichtbar wurde (Abb. 7b). Das Gentamicinsulfat ging in die hydrophile Phase (HCl) über und wurde somit von dem Trägermaterial PDLLA getrennt. Aus der Unterphase wurden 10 ml entnommen, in ein Falconröhrchen überführt und bei -20°C bis zur Analyse verwahrt. Das Implantat wurde nach dem Ausschütteln erneut zur Ermittlung des Gewichts auf einer Feinwaage dreimal gewogen.

Nach Beendigung des Ausschüttelns wurde exemplarisch die Oberfläche von zwei Implantaten mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops bildlich dargestellt.



Abb. 7: Ausschüttelvorgang der Marknägel unter der Verwendung von Butylacetat und HCl mit deutlicher Ausbildung zweier Phasen für die Gentamicinbestimmung

(a) Probenmischung auf dem Magnetrührer, eine Phasentrennung ist nicht sichtbar (b) klare Phasentrennung: obere Phase mit Butylacetat und PDLLA, untere Phase mit HCl und Gentamicin

2.4.4 Aufarbeitung des Nierengewebes

Für die Konzentrationsbestimmung von Gentamicin im Nierengewebe wurde zu Beginn das Leergewicht beider Eppendorfgefäße für die Aufnahme der zwei Nierenhälften bestimmt und nach Zugabe der Probe erneut gewogen. Das Gewebe wurde mit 1 ml 0,001 mol/l HCl versetzt und mit dem Ultra Turrax und einem schmalen Aufsatz auf Stufe drei homogenisiert, zwei Minuten gevortext und für ein Tag bei 4°C auf dem Schüttler bei Stufe 1,5 gelagert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Aufsatz entfernt, sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 3000 rpm in Anlehnung an Randjelovic et al. (2012). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei - 20°C gelagert.

Im Rahmen der histologischen und immunhistologischen Probenbearbeitung verblieben die Kassetten mit dem Nierengewebe für zwei Tage in einer Fixierlösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurden die Proben für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und in den Entwässerungsautomaten überführt. Die Entwässerung im Automaten erfolgte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe in mehreren Arbeitsschritten nach dem Schema abgebildet in Tab. 5.

Tab. 5: Schema Entwässerungsautomat

	Alkohol								
Medium	70%	80%	80%	96%	100%	100%	Xylol	Xylol	Paraffin
Zeit [h]	1	1	2	2 x 2	2 x 2	3	1	1,5	2 x 2

Anschließend wurden die Proben in eine Metallform überführt, mit flüssigem Paraffin übergossen und anschließend auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke aus den Formen herausgelöst. Es wurden am Rotationsmikrotom 4 µm dicke aufeinander folgende Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden zunächst in einem Wasserbad (45°C) gestreckt und anschließend auf einen Objektträger aufgezogen und bei 37°C im Trockenschrank über Nacht getrocknet.

2.5 Analysemethoden zur Probenauswertung

Wie in Tab. 6 dargestellt, wurden die entnommenen Proben anhand verschiedener Methoden untersucht.

Tab. 6: Übersicht für die Auswertungsmethoden der entnommenen Proben; + gewählte Methode, - nicht durchgeführte Methode

Testprinzip							
Probe	KIMS	HPLC	Elektronen- mikroskopie	Histo- logie	Immun- histo- chemie	Mikro- biologie	Röntgen
Implantat	+	+	+	-	-	+	+
Knochen	+	-	-	-	-	+	+
Endost	+	-	-	-	-	+	-
Niere							
rechts	+	+	-	-	-	+	-
links	-	-	-	+	+	-	-
Serum	+	+	-	-	-	-	-

2.5.1 Bestimmung der Gentamicinkonzentration

Für die Bestimmung der Gentamicinkonzentration in den Knochengewebe, Nieren- und Serumproben, sowie für die Analyse der aus der Beschichtung freigesetzten Menge Gentamicin, erfolgte der Nachweis der Wirkstoffkonzentration mittels KIMS-Test (kinetic interaction of microparticles in a solution, KIMS) im Labor Berlin Charité Vivantes Services GmbH. Dieser Test beruht auf der Veränderung der Trübung durch die kinetische Wechselwirkung von Mikropartikeln in einer Lösung. An Mikropartikel gebundene Antigene komplexieren über Bindung mit Antikörper und erhöhen die Trübung der Lösung. Werden unkonjugierte Antigene in die zu untersuchende Probe zugegeben, binden diese an die Antikörper und weniger Komplexe werden gebildet. Die Lösung erscheint klar (Abb. 8).

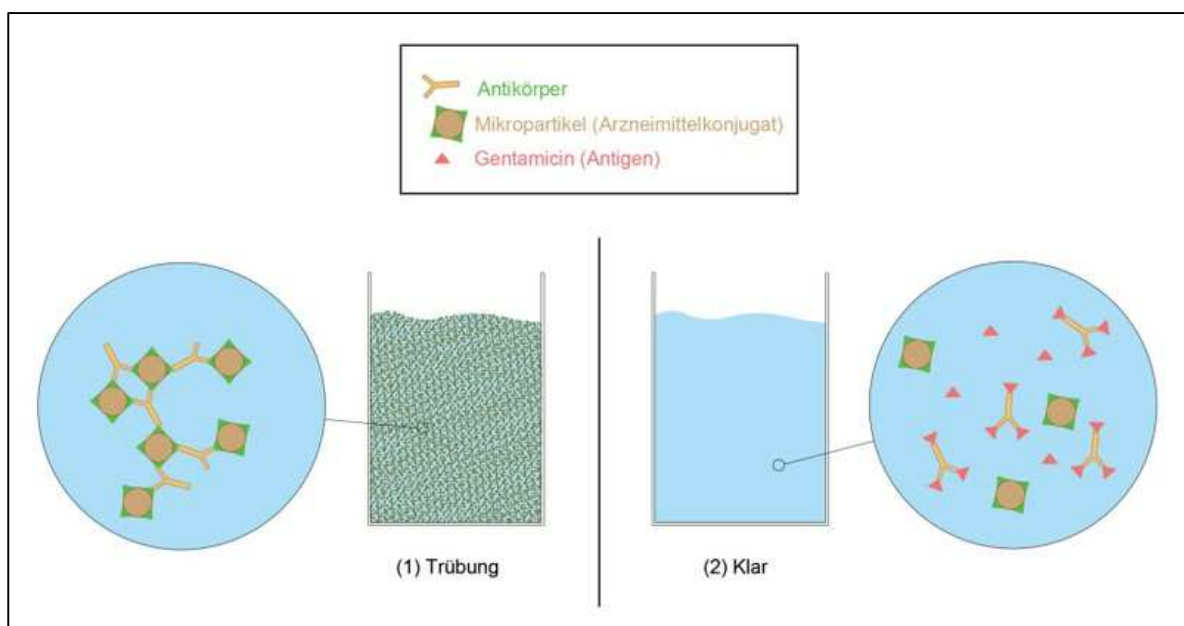


Abb. 8: Messprinzip KIMS

Bei der kinetischen Wechselwirkung von Mikropartikeln in Lösung (KIMS) konkurrieren das Arzneimittelkonjugat (Antigen gebunden an Mikropartikel) und der Wirkstoff Gentamicin um die Bindungsstellen des Gentamicin-Antikörpers. Bei Abwesenheit des Zielwirkstoffes in der Probe, werden die Mikropartikel vernetzt und bilden Komplexe. Dadurch erfolgt eine Trübung der Lösung (1). Durch die Anwesenheit von freien Antigenen in der Probe werden die Antikörper mit unkonjugierten Antigenen gesättigt. Dadurch wird eine Bindung des Antikörpers mit den Mikropartikeln gehemmt und die Lösung erscheint klar (2). Daraus ergibt sich, dass die Trübung indirekt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge des Arzneimittels., Abbildung: eigene Darstellung

Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Anti - Gentamicin - Antikörper der Maus. Das Testverfahren ist bisher nur für humane Proben etabliert. Das Detektionslimit lag bei 0,8 µg/ml. Für die Messung wurden die Proben aufgetaut, mittels Vortexer kurz gemischt und anschließend 150 µl entnommen und in geeignete Probenröhrchen vom Labor Berlin überführt. Die restliche Probenmenge wurde wieder bei - 20°C tiefgefroren.

Als eine weitere Analysemethode diente die „high performance liquid chromatography“ (HPLC). Diese ist ein Flüssigkeitschromatographie-Verfahren, bei dem die zu untersuchende Probe zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase durch eine Trennsäule gepumpt wird. Diese enthält die stationäre Phase. Je nachdem wie stark die Wechselwirkung eines Bestandteils aus der zu untersuchenden Probe mit der stationären Phase ist, verändert sich die Verweildauer in der Säule. Die Retentionszeit kann im Anschluss mithilfe eines Detektors ermittelt werden. Anhand der Retentionszeit kann man eine chemische Verbindung identifizieren, indem man diese mit der eines Standards vergleicht.

Eine HPLC-Analyse der Proben aus dem Ausschüttelvorgang der Implantate erfolgte durch die Firma Synthes®. Die Bestimmungsgrenze betrug 0,08 µg/ml. Da Synthes® jedoch nicht die Serum- und Nierenproben analysieren konnte, erfolgte in Zusammenarbeit mit dem VLB - Forschungsinstitut für Spezialanalytik (FIS) Berlin eine HPLC-Analyse. Die Analytik wurde in Anlehnung an Kabra et al. (1983) durchgeführt. Da Gentamicin selbst keine Absorption im UV/VIS-Bereich aufweist, wurde als analytische Methode eine Derivatisierung mit Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS) durchgeführt. Dieses Reagenz reagiert mit den primären Aminogruppen des Gentamicins. Das Derivat absorbiert im UV/VIS-Bereich. Die Messung erfolgt bei 340 nm. Als Trennsäule diente eine C₁₈-Säule. Diese C₁₈-Ketten sind terminal. Das heißt sie sind mit dem Ende welches in das Säuleninnere zeigt, derivatisiert, wodurch die Säule eine bessere Toleranz gegenüber wässrigen Lösungsmitteln aufweist. Als Laufmittel wurden Phosphatpuffer/ Acetonitril/ Methanol verwendet (400/ 493/ 120). Die Bestimmungsgrenze für Gentamicin lag bei 0,5 µg / ml. Für eine sichere Identifizierung wurden bei jeder Messung ein Standard aus Wasser und Serum mitgeführt.

2.5.2 Rasterelektronenmikroskopische Auswertung

Als Visualisierungsmöglichkeit der Beschichtung wurden die Titankirschnerdrähte elektronenmikroskopisch untersucht. Mithilfe der Oberflächendarstellung lassen sich Rückschlüsse auf die Beschichtungsbeschaffenheit nach Wechselwirkung mit den Knochen- und Weichteilgeweben ziehen. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Anatomie, Abteilung Elektronenmikroskopie an der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Um Aufladungseffekte zu vermeiden wurden die Proben unter Vakuum mit Gold besputtert und konnten anschließend in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt werden. Zur exemplarischen Darstellung der Beschichtung wurden sechs Marknägel aus der *in-vitro* und *in-vivo* Studie mittels Elektronenmikroskopie analysiert (Tab. 7). Einige Proben der Elution wurden über einen Zeitraum von 98 Tagen weiter eluiert und beispielhaft elektronenmikroskopisch untersucht.

Tab. 7: verwendete Marknägel für die elektronenmikroskopische Darstellung der Beschichtung aus der der *in-vitro* und *in-vivo* Analyse

Marknagel	Durchführung	Untersuchungszeitpunkt
1	Beschichtet, steril	
2	<i>in-vitro</i> Elution	1 Stunde
3	<i>in-vitro</i> Elution	98 Tage
4	<i>in-vitro</i> Elution und Ausschütteln	42 Tage
5	<i>in-vivo</i> Implantation und Ausschütteln	1 Stunde
6	<i>in-vivo</i> Implantation und Ausschütteln	42 Tage

2.5.3 Histologische und immunhistologische Färbungen

Die Nierengewebsproben wurden zum einen mit der Übersichtsfärbung Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung) und zum anderen mittels immunhistologischer Markierung gefärbt. In Tab. 8 werden die Schritte der HE-Färbung beschrieben und in Tab. 9 das Schema für die immunhistochemische Markierung von Gentamicin.

Tab. 8: Färbeprotokoll Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Färbeschritt	Zeit [min]
Entparaffinieren mit Xylol	2 x 10
Rehydrieren	2
Spülen mit Aqua dest.	2
Hämatoxylin nach Mayer (1:2 verdünnt mit Aqua dest.)	10
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Spülen in Leitungswasser	10
Eosin	1
Aufsteigende Alkoholreihe; 2 x 96% und 2 x 100%	2
Xylol	2 x 2

Die HE – Färbung dient der Unterscheidung einzelner Gewebestrukturen. Anhand der guten Farbkontraste dient diese Routinefärbung bei der morphologischen Untersuchung von histologischen Schnitten. Hämatoxylin ist ein natürlich vorkommender Farbstoff, der basophile Zellstrukturen blau färbt. Dazu zählen z.B. DNA, Zellkerne, Ribosomen und das raue Endoplasmatische Retikulum (rER). Bei Eosin handelt es sich hingegen um einen synthetisch hergestellten Farbstoff, der Zellstrukturen rot färbt, die basisch (eosinophil) bzw. acidophil sind, wie z.B. Proteine, Zytoplasma, Mitochondrien, glattes Endoplasmatisches Retikulum (sER) und Kollagen. Nach Beendigung der histologischen Färbung wurden die

Präparate mit einem Deckgläschen und Vitroclud luftdicht eingeschlossen und bei Raumtemperatur waagrecht über Nacht gelagert.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin- Biotin- Complex Methode (ABC – Methode) beruht auf der Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen, wodurch das gesuchte Antigen dargestellt wird. Zu Beginn werden unerwünschte Hintergrundfärbungen durch die Inkubation in zweiprozentigem Normalserum reduziert. Anschließend wird der Primärantikörper (1. AK) auf die Gewebeschnitte pipettiert (1:50 Verdünnung). Dieser polyklonale Antikörper richtet sich gegen das gesuchte Antigen (AG) Gentamicin und bindet es. Die Detektion dieses Komplexes erfolgt durch Zugabe eines biotynlierten Sekundärantikörpers (2. AK), welcher sich gegen den Primärantikörper richtet. Durch die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes (AB-Komplex bestehend aus zwei Reagenzien (Reagenz A: hochgereinigtes Avidin mit einer hohen Affinität zu Biotin; Reagenz B: am Avidin gebundener biotinylierte Alkalische Phosphatase, katalysiert die Farbreaktion) kann der Sekundärantikörper gebunden werden. Im nächsten Schritt wird unter mikroskopischer Kontrolle das Substrat für die Farbreaktion hinzugefügt, bei dem Neufuchsin zum roten Chromogen reduziert wird, wodurch das Antigen im Gewebe sichtbar wird und quantitativ oder qualitativ bestimmt werden kann. Zur Identifizierung der umliegenden Gewebestrukturen erfolgt eine Gegenfärbung mit Methylgrün.

Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Niere, ohne Kontakt mit Gentamicin, in verschiedenen Verdünnungen gefärbt. Dies diente dem Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Gentamicin-Antikörpers. Des Weiteren erfolgte eine Kontrolle der immunhistologischen Färbung ohne die Verwendung des Primärantikörpers. Die bildliche Darstellung der Signalstärke wurde mithilfe zwei verschiedener Gentamicinkonzentrationen (10 mg/ml PBS und 10 µg/ml PBS) getestet. Es erfolgte jeweils eine manuelle Injektion der jeweiligen Gentamicinprobe in das Nierenbecken einer unbehandelten Niere.

Tab. 9: Schema Immunhistologische Färbung

Durchführung	Inkubationszeit	Reagenzien	Temperatur
Entparaffinieren	2 x 10 min	Xylol	RT / Abzug
Rehydrieren	je 2 min	2x100%, 1 x96%, 1x80%, 1x70% Ethanol, Aqua dest	RT
Spülen	2 x 5 min	PBS	RT
Der Schnitt wird um das Gewebe herum trocken gewischt. Dabei sollte ein Austrocknen des Gewebes verhindert werden. Anschließend wird das Gewebe mit einem Fettstift umrandet.			
Blocken	30 min	Normal goat serum	RT / feuchte Kammer
1. Antikörper	über Nacht	Gentamicin antibody, rabbit, 1:50	4°C
Spülen	2 x 5 min	PBS	RT
2. Antikörper	30 min	Biotinylated Anti rabbit IgG	RT / feuchte Kammer
Spülen	2 x 5 min	PBS	RT
AB-Komplex	50 min	AK 5000 Alkalin-Phosphatase-Standard-Kit	RT / feuchte Kammer
Spülen	2 x 5 min	PBS	RT
Chromogenpuffer Inkubation	2 x 5 min	Chromogenpuffer	RT / feuchte Kammer
Spülen	2 x 5 min	PBS	RT
Entwickeln	20 min (mikroskopische Kontrolle)	Substrate Kit SK-5100	RT / dunkel / feuchte Kammer
Gegenfärbung	10 min	Methylgrün nach Vector	RT
Dehydrieren	kurz	96% Ethanol	RT
Dehydrieren	je 2min	2x100% Ethanol	RT
Entparaffinieren	2 x 10 min	Xylol	RT / Abzug
Eindecken	-	Vitroclud	RT / Abzug

2.5.4 Histologische Auswertung

Nach der erfolgten Färbung aller Gewebeschnitte wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet.

Die Beurteilung der Nierengewebsstrukturen im Sagittalschnitt und deren histologische Auswertung erfolgten deskriptiv an den HE-übersichtsgefärbten Präparaten. Beurteilt wurden mögliche Strukturveränderungen in der Nierenrinde (*Cortex renalis*) und im Nierenmark (*Medulla renalis*) mit Hilfe eines histologischen Scores. Dieser umfasste folgende Kriterien, welche semiquantitativ anhand von vier Stufen eingeteilt (Cui et al., 2015) wurden (Tab. 10).

Tab. 10: histologischer Score zur Beurteilung von Strukturveränderungen im Nierengewebe anhand von relevanten Kriterien (a) und deren Intensität (b)

(a) Kriterien	(b) Grad der Intensität
Epitheliale Zellvakuolisierung	0 (Abwesenheit des Kriteriums, normales Gewebe ohne Zerstörung)
Zelldegeneration	1 (gering/fokal)
Hyaline Veränderungen/Zylinder	2 (mäßig/multifokal)
Tubuläre Dilatation	3 (stark/diffus)
Tubuläre Nekrosen	

Für die histomorphometrische Auswertung der gefärbten Nierenpräparate wurden die Gewebeschnitte mit einem 2.5x Objektiv als Mosaikaufnahme mithilfe eines Durchlichtmikroskops und mit dem Computerprogramm AxioVision© 4.0 digitalisiert.

Die mittels Gentamicin-Antikörper angefärbte Fläche der Nieren konnte anschließend mit dem Computerprogramm ImageJ© 1.47 quantifiziert werden. Das Programm wurde für diese Berechnung mit einem eigenen Makro versehen. Dadurch war es möglich anhand bestimmter Farbpixel Flächen zu erkennen und zu berechnen. Der Nierenumriss wurde gelb markiert. Anschließend konnte die markierte Fläche manuell verfeinert werden, indem Leerräume (Gewelücken) markiert und Nicht- Nierengewebe (Nierengefäße) ausgeschlossen wurden. Dies ermöglichte die Berechnung der Gesamtfläche der Niere. Im Anschluss konnten die Farbschwellen mithilfe des Computerprogramms manuell definiert und das zu untersuchende rötliche Farbspektrum eingrenzt werden. Aus diesen Informationen wurde der Flächenanteil des Gentamicins innerhalb der Niere berechnet.

2.5.5 Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung

Eine Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität des freigesetzten Gentamicins erfolgte aus den Proben, die während des *in-vitro* Elutionversuches entnommen wurden, aus den Überständen der Knochen- und Nierenaufbereitung sowie den Serumproben. Die genannten Proben wurden im Hemmhofstest untersucht. Die Analyse fand in

Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Schiller an der Charité - Campus Benjamin Franklin Institut für Mikrobiologie und Hygiene CCM / CBF statt. Die Untersuchung erfolgte durch einen Agar-Disc-Test. Der Nachweis einer wachstumshemmenden Konzentration von Gentamicin erfolgte gegenüber dem Keim *Staphylococcus aureus*, der in einer physiologischen NaCl - Lösung mit McFarland 0,5 bereitgestellt und auf einem Müller-Hinton-Agar II mit einem Watteträger ausplattiert wurde. Anschließend wurden mit einer sterilen Pinzette die Filterplättchen auf dem Agar platziert und jeweils 15 µl der jeweiligen Überstands-Probe aufpipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die entstandenen Inhibitionszonen (Zone of Inhibition, ZOI), die sich um die zu testende Filterplättchen gebildet hatten, mithilfe des Computerprogramms Image J© dokumentiert und vermessen. Zusätzlich wurden als Kontrollen Filterplättchen mitgeführt, die mit 30 µg Gentamicinprobe in oben genannter Vorgehensweise benetzt wurden.

2.5.6 Radiologische Auswertung

Die röntgenologische Untersuchung diente der Lokalisation der Implantate nach intramedullärem Einbringen in beide Tibiae und als exemplarische Dokumentation zum Zeitpunkt der Euthanasie. Dabei handelte es sich um konventionelle Röntgenaufnahmen für zehn Sekunden bei 30 kV/ 52 kV und 1,8 mAs mit laterolateralem Strahlengang. Der Abstand zwischen der Röntgenplatte und dem Röntgengerät betrug 100 cm. Für die laterolateralen Aufnahmen wurde die Hintergliedmaße abduziert und seitlich auf der Röntgenplatte fixiert. Um mögliche Reaktionen des Knochen- und Weichteilgewebes im Bereich der Implantate zu beurteilen, wurden die Röntgenaufnahmen auf folgende Parameter untersucht und semiquantitativ mit Hilfe von vier Stufen eingeteilt (Tab. 11) (Schmidmaier et al., 2006).

Tab. 11: Untersuchungsschema für die Beurteilung des Knochen- und Weichteilgewebes anhand der exemplarischen Röntgenaufnahmen bezüglich relevanter Parameter (a) und Grad der Intensität (b)

(a) Parameter	(b) Grad der Intensität
Weichteilschwellung	0 (Abwesenheit des Kriteriums)
Knochendestruktion und Knochenfehlbildung (wie zB. Exostosen)	1 (gering; Vorhandensein des Kriteriums)
Periostreaktion	2 (mäßig)
Osteolyse	3 (stark)
Auftreten einer Spontanfraktur	
Sequesterbildung	
Gesamteindruck	

2.5.7 Elektronische Dokumentation der Ergebnisse

Die Darstellung der Daten erfolgte mit der Software MS-Excel©. Es wurden die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der Gentamicinkonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten *in-vitro* sowie im Vergleich *in-vivo* nach Probenentnahme auf dem Implantat und in den verschiedenen Geweben berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 *In-vitro* Analyse

Die *in-vitro* Untersuchung diente der Quantifizierung der Wirkstofffreisetzung des Gentamicins aus der PDLLA-Kirschnerdrahtbeschichtung. Zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten wurde die kumulative Freisetzung initial innerhalb der ersten Stunde (Abb. 9) und nach einem Zeitraum von bis zu 42 Tagen untersucht (Abb. 10). Die initiale Freisetzung zeigte einen sofortigen Anstieg innerhalb der ersten zehn Minuten von bis zu 60% und einer maximalen Freisetzung des Wirkstoffs von bis zu 80% nach bereits 50 Minuten. Anschließend zeigte die Kurve zum Zeitpunkt „60 Minuten“ eine kumulative Freisetzung von unter 70%.

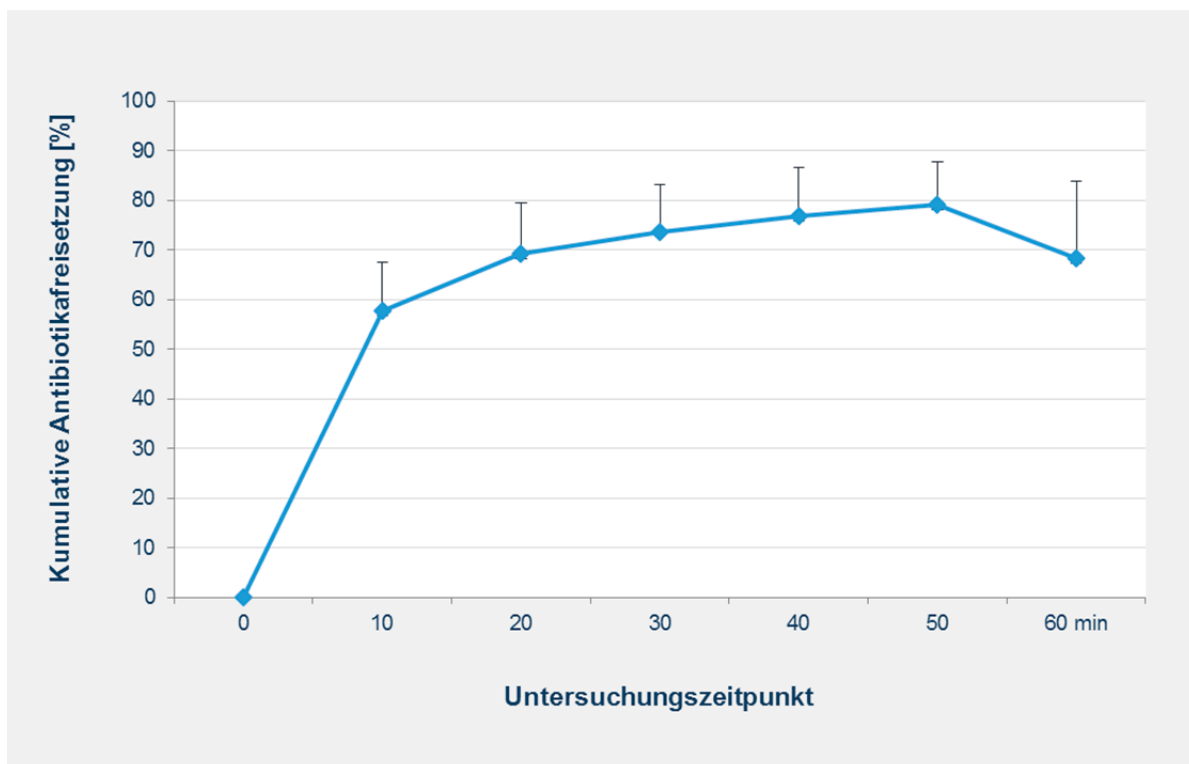


Abb. 9: initiale Elution *in-vitro* bis 60 Minuten (n = 6), Angaben in % bezogen auf die ursprüngliche in der Beschichtung enthaltene Menge Gentamicin

Die Langzeitelution wies einen initial raschen Anstieg nach einer Stunde sowie nachfolgend einen gleichmäßig kontinuierlichen Anstieg auf ein Plateau mit einer maximalen durchschnittlichen Freisetzung von 79% nach 28 Tagen. Am Ende des Untersuchungszeitraums nach 42 Tagen lag die durchschnittlich freigegebene Menge des Wirkstoffs bei 76% Freisetzung.

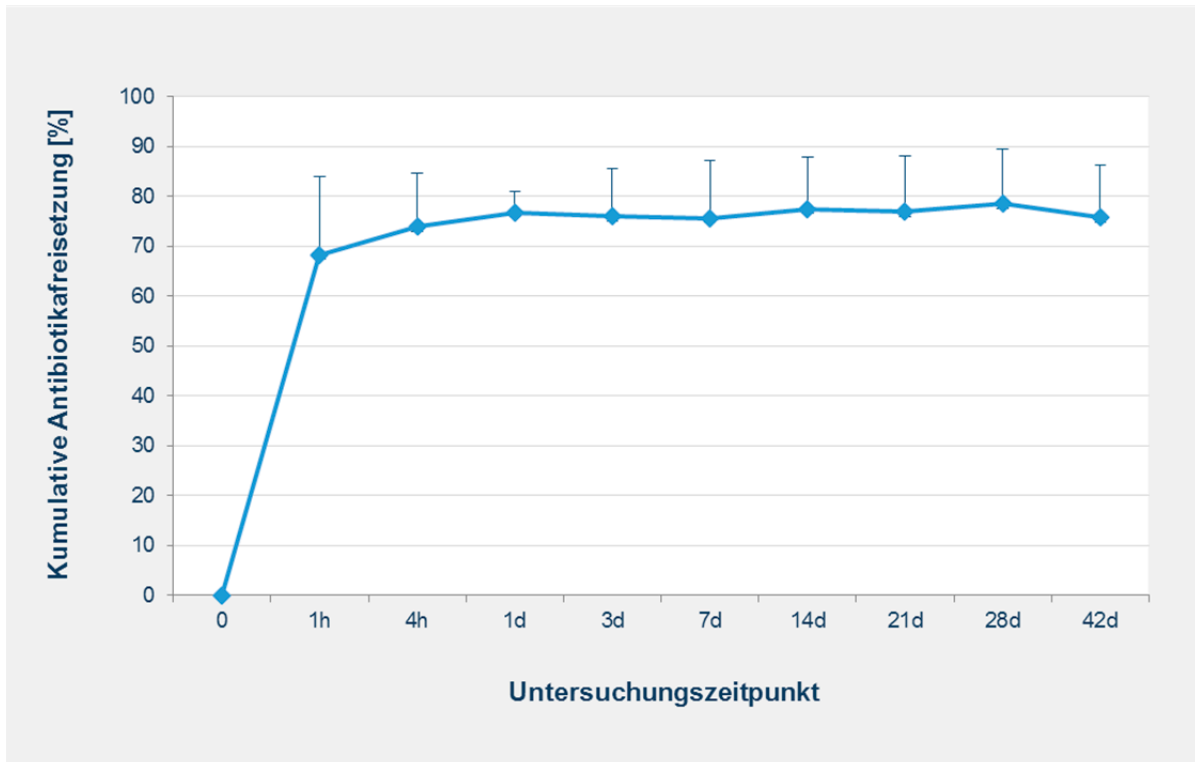


Abb. 10: Langzeitelution *in-vitro* bis 42 Tage (n = 9)

initiale Freisetzung von Gentamicin aus der Beschichtung innerhalb der ersten Stunden mit konstanter Freisetzung über 42 Tage, Angaben in % bezogen auf die ursprüngliche in der Beschichtung enthaltene Menge Gentamicin

3.2 *In-vivo* Analyse

3.2.1 Operationsverlauf und postoperativer Verlauf

Der tierexperimentelle Teil der Studie wurde mit 36 Ratten durchgeführt. Jedem Tier wurden in beide Tibiae je ein Titankirschnerdraht implantiert. In Anlehnung an die *in-vitro* Studie wurden zu den gleichen Zeitpunkten (Vgl. Tab.11) Tiere untersucht (n = 3 - 4 Tiere, ergeben n = 6 - 8 Tibiae pro Zeitpunkt). Zwei Tiere verstarben zu Beginn der Narkose für den operativen Eingriff an Herz- Kreislaufversagen. Des Weiteren wurde bei drei Tieren (bei jeweils einem Tier aus der Gruppe mit den Untersuchungszeitpunkten „eine Stunde“, „ein Tag“ und „14 Tage“) nach der Implantation festgestellt, dass das Implantat die Tibia distal durchbohrte. Diese Tibiaknochen wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. Gleiches

erfolgte mit den entnommenen Implantaten. Lediglich das Implantat des Tieres mit „einer Stunde“ nach Implantation, ging in den anschließenden Untersuchungen mit ein.

Bei vier Tieren bestand nach Implantation an der Nahtstelle ein leichter Leckreiz, wodurch sich eine oberflächliche Wundinfektion gebildet hatte. Es erfolgte eine lokale Therapie mit Bepanthen® und Jod. Aufgrund einer Nahtdehiszenz wurde der Heilungsverlauf bei einem Tier beeinträchtigt. Es musste sofort euthanasiert werden und es erfolgte eine Umwidmung des Zeitpunkts auf den nächst entsprechenden Zeitpunkt „einen Tag“. Bei allen anderen Versuchstieren verlief die postoperative Phase komplikationsfrei und es erfolgte eine schnelle Belastung der operierten Extremitäten. Die anschließende Analyse erfolgte an 34 Tieren mit einer Probengröße von 65 Tibiae und 66 Titankirschnerdrähten (Tab. 12).

Tab. 12: Übersicht zu den *in-vivo* Untersuchungszeitpunkten und der dazugehörigen Anzahl der Versuchstiere, Tibiaeprobe und Implantaten

Zeitpunkt	Stunden [h] nach Implantation			Tage [d] nach Implantation					
	1	4	24	3	7	14	21	28	42
Anzahl Tiere	4	4	4	4	4	4	4	3	3
Anzahl der Tibiae	7	8	7	8	8	7	8	6	6
Anzahl der Implantate	8	8	7	8	8	7	8	6	6

3.2.2 Radiologische Ergebnisse

Mithilfe konventioneller Röntgenaufnahmen wurden mögliche Reaktionen des umliegenden Knochen- und Weichteilgewebes auf Gentamicin beurteilt. In den aufgenommenen Röntgenbildern (Abb. 11a - f) war das Implantat postoperativ und vor der Euthanasie zu den Zeitpunkten „sieben“, „14“ und „28 Tage“ deutlich zu erkennen.

7 Tage 14 Tage 28 Tage

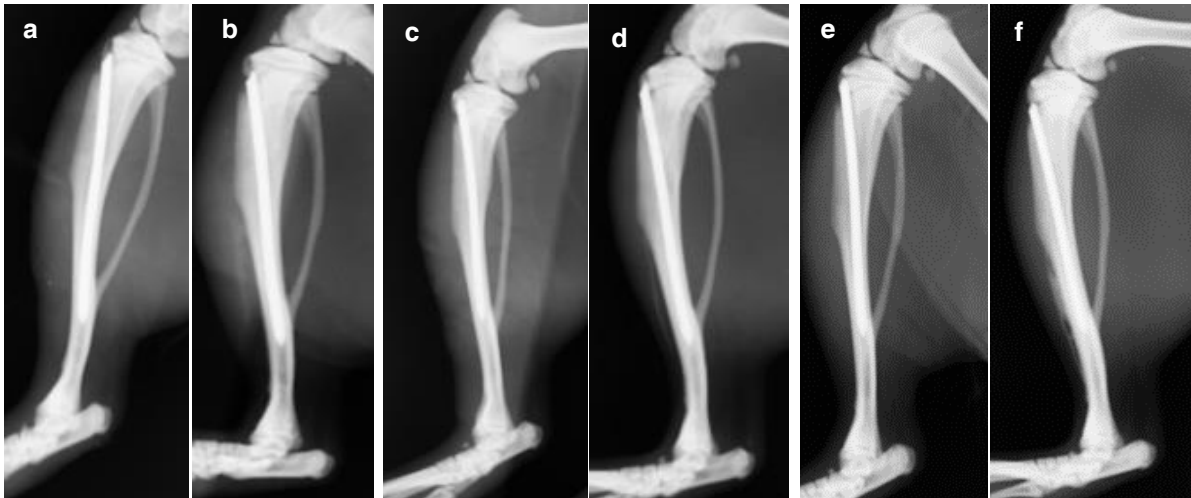


Abb. 11: exemplarische Darstellung der Röntgenaufnahmen der jeweils rechten Tibiae in der laterolateralen Ebene im zeitlichen Verlauf von Zeitpunkt „sieben Tage“ bis „28 Tage“

(a,c,e) zum Zeitpunkt der OP: Nach der Implantation sind keine Veränderungen in den Knochenstrukturen oder im Weichteilgewebe erkennbar. Das Implantat befindet sich in der gewünschten Position im Bereich des Tibiaschafts.

(b,d,f) zum Zeitpunkt der Euthanasie: Im gesamten Zeitverlauf ist keine Veränderung im Bereich der Implantationsstelle sowie innerhalb der Tibia oder im umliegenden Knochen- und Weichteilgewebe sichtbar.

In den Aufnahmen war eine korrekte Position des Drahtes innerhalb des intramedullären Raumes erkennbar und die Tibia war intakt. Eine Dislokation des Implantats zum Zeitpunkt der Euthanasie konnte nicht festgestellt werden. Ebenfalls war keine Gewebereaktion im Bereich der Implantationsstelle sichtbar. Alle Parameter des Untersuchungsschemas wiesen somit zu allen Zeitpunkten einen Grad der Intensität mit der Scorebewertung Null auf.

3.3 Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Knochengewebe

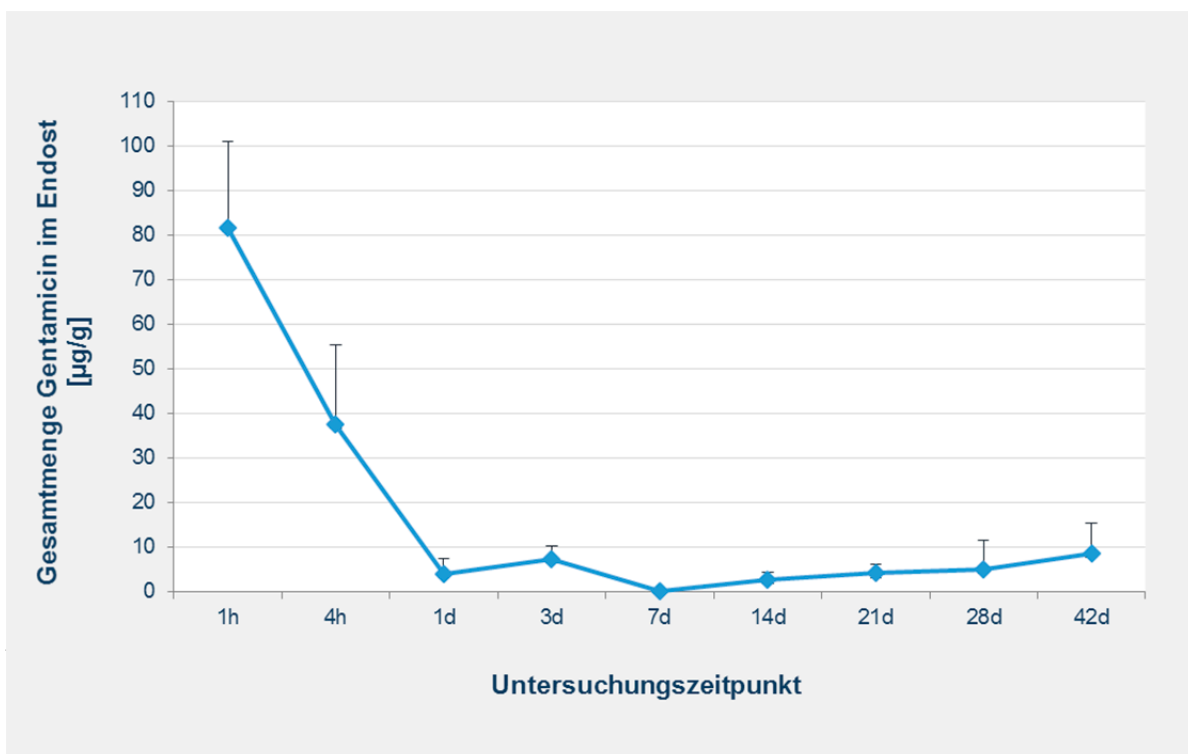
Die Analyse der Knochenproben beider Tibiae zeigte für den Untersuchungszeitpunkt „eine Stunde“ bei allen sieben Proben für den mittleren Tibiateil mit Kontakt zum Implantat, einen positiven Gentamicinnachweis mit $8,29 \mu\text{g/g} \pm 5,31 \mu\text{g/g}$ Knochengewebe (MW \pm SD). Für den Zeitpunkt „vier Stunden“ nach Implantation erfolgte ebenfalls bei vier Proben von zwei Tieren ein geringer positiver Nachweis: zum einen im Nagelteil mit Werten von $8 \mu\text{g/g}$ und zum anderen im proximalen Tibiaabschnitt, mit einem Ergebnis von $1 \mu\text{g/g}$ (Tab. 13). In allen nachfolgenden Zeitpunkten „ein Tag“ bis „42 Tage“ konnte kein Gentamicin detektiert werden.

Tab. 13: Quantifizierung von Gentamicin [$\mu\text{g/g}$] im Knochengewebe

Untersuchungszeitpunkt	Positiver Nachweis	Menge Gentamicin $\mu\text{g/g}$
1 h	7/7	$8,29 \pm 5,31$
4 h	2/8	$9,00 \pm 1,00$
Folgende	0	Kein Nachweis

3.4 Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Endost

Im Endost war zu allen Zeitpunkten, mit Ausnahme des Zeitpunkts „sieben Tage“ nach Implantation, Gentamicin nachweisbar. Insgesamt ließ sich für den gesamten Untersuchungszeitraum eine Gentamicinkonzentration von $16,77 \mu\text{g/g} \pm 6,68 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD) ermitteln. Die höchste Konzentration wurde zum Zeitpunkt „eine Stunde“ nach Implantation erreicht und lag bei $81,65 \mu\text{g/g} \pm 19,17 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD). Im weiteren Verlauf zeigten sich rasch sinkende Werte bis zu einem Tag nach Implantation mit nachfolgend gleichbleibend niedrigen Konzentrationen von durchschnittlich $4,63 \mu\text{g/g} \pm 3,28 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD) und einem geringen Anstieg nach „21 Tagen“ bis „42 Tagen“ auf $5,91 \mu\text{g/g} \pm 5,06 \mu\text{g/g}$ (Abb. 12).

Abb. 12: Gentamicinkonzentration im Endost ($\mu\text{g/g}$; MW \pm SD) zu den verschiedenen Zeitpunkten

3.5 Bestimmung der Gentamicinkonzentration auf dem Draht nach Explantation

Um die verbliebene Restmenge von Gentamicin auf dem Draht zu quantifizieren, die nicht in das umliegende Gewebe abgegeben wurde, erfolgte nach Entnahme der Implantate aus der Tibia eine Ablösung der Beschichtung und eine Bestimmung der Gentamicinkonzentration. Die Analyse der Wirkstoffmenge nach Ausschütteln erfolgte mittels KIMS-Test durch das Labor Berlin. Lediglich zum Zeitpunkt „28 Tage“ nach Implantation konnte in einer Probe eine verbliebene Restmenge Gentamicin von 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bestimmt werden. Bei allen anderen Proben war die Konzentration in der Ausschüttelflüssigkeit so gering, dass sie nicht ermittelt werden konnte, da sie unterhalb des Detektionslimits von 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lag.

Weil die Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurde eine zweite Messung mittels HPLC durchgeführt. Dabei erfolgte die Analyse bei einem zehnfach niedrigeren Detektionslevel von 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ein positiver Nachweis von Gentamicin gelang dadurch bei allen explantierten Drähten bis „vier Stunden“ nach Implantation und betrug 0,14 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{ml}$ (MW \pm SD). Zu den nachfolgenden Zeitpunkten reduzierte sich der Nachweis von Gentamicin bis zum „Tag 42“ unterhalb des Detektionslimits (Abb. 13), an dem nur noch auf einem von sechs Implantaten zum Zeitpunkt „28 Tage“ nach Implantation eine Restmenge nachweisbar war.

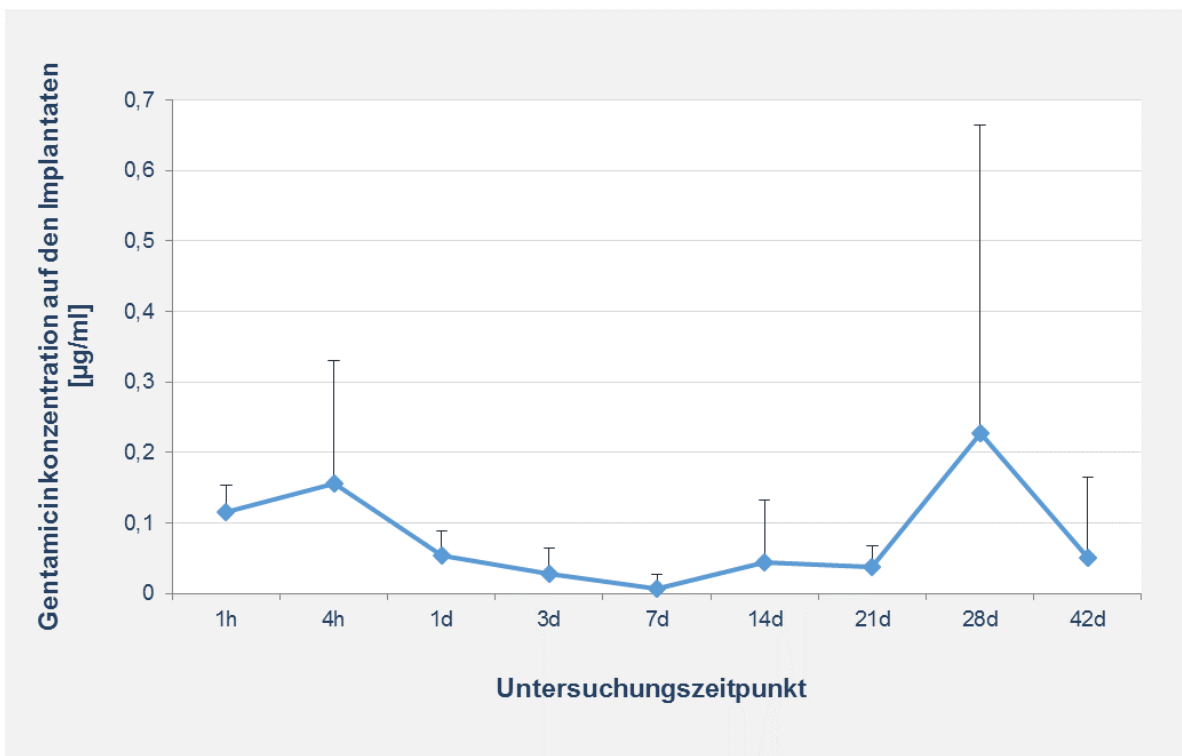


Abb. 13: Gentamicinkonzentrationmessung via HPLC auf den Implantaten ($\mu\text{g}/\text{ml}$; MW \pm SD) nach Entnahme aus der Tibia und anschließendem Ausschütteln zu den verschiedenen Zeitpunkten

3.6 Rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Polymerbeschichtung

Die rasterelektronischen Aufnahmen (REM) dienen der exemplarischen bildlichen Darstellung der Implantatpolymerbeschichtung nach Herstellung, bei der *in-vitro* sowie *in-vivo* Analyse. Dabei sollten die in das Polymer PDLLA inkorporierten Gentamicinpartikel sowie die Degradation der Beschichtung im Verlauf der verschiedenen Analysezeitpunkte nach *in-vitro* und *in-vivo* Verbleib abgebildet werden.

Dazu wurde ein originalverpacktes Implantat nach der Entnahme aus der Transportverpackung elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei handelte es sich um einen Titankirschnerdraht ohne eine vorherige Verwendung für die *in-vitro* oder *in-vivo* Analysen. Die Beschichtung wies an der Spitzenoberfläche eine deutliche Bruchkante auf, die anschließend in einen glatten und homogenen Verlauf überging. Viele kleine Gentamicinpartikel waren tief in die Beschichtung eingebettet. Größere Partikel lagen bis zur Hälfte in der Beschichtungsoberfläche. Die Titanoberfläche war unterhalb der Beschichtung erkennbar (Abb. 14a – b).

Weiterhin wurde die Implantatbeschichtung nach einer Stunde und nach 98 Tagen Elution *in-vitro* dargestellt. Die Beschichtung war partiell abgelöst, zeigte fließende Übergänge sowie stark ausgeprägte Bruchkanten. Größere Wirkstoffpartikel waren aus der Beschichtung herausgelöst. Die Oberfläche war uneben und mit Höhlen und Löchern durchzogen. Es zeigten sich Unterschiede in der Anzahl und Größe der Poren zu den verschiedenen Zeitpunkten. Nach 98 Tagen wies die Polymerbeschichtung größere und quantitativ mehr Perforationen auf. Eine Einbettung der Wirksubstanz war nicht erkennbar. Unterhalb der Beschichtung war die Titanoberfläche des Drahtes sichtbar (Abb. 15a – d).

In den REM – Aufnahmen nach *in-vivo* und *in-vitro* Versuch mit anschließendem Ausschütteln der Beschichtung waren keinerlei Beschichtungsrückstände mehr erkennbar (Abb. 16a – b).

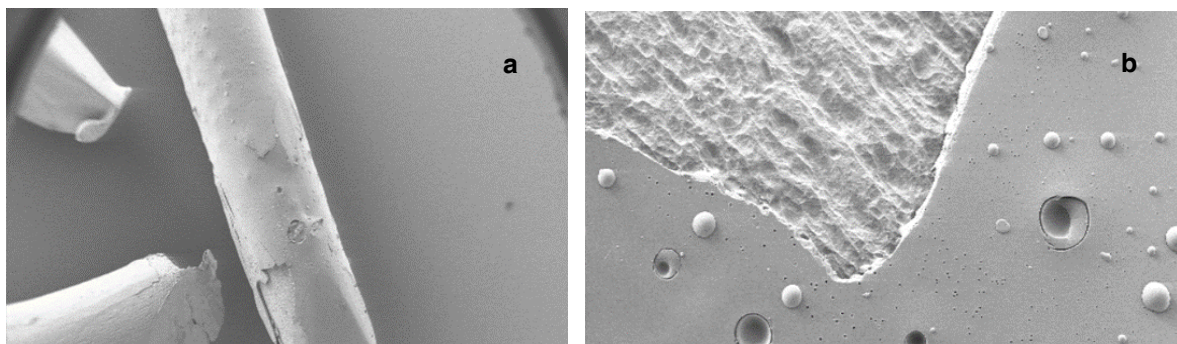


Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der beschichteten Spitze eines sterilen Implantats (1 mm Ø) nach Produktion

(a) An der Spitze zeigt sich teilweise die Ablösung der Beschichtung und die darunter liegende Titanoberfläche des Implantats (Übersicht, 21x, Balken 1 mm). (b) Einbettung kleinerer Partikel vom Polymer, größere Partikel liegen der Polymerschicht auf, teilweise sind bereits Partikel herausgelöst, deutliche Bruchkante des Polymers am Übergang zur Nageloberfläche erkennbar (Detailaufnahme, 500x, Balken 50 µm)

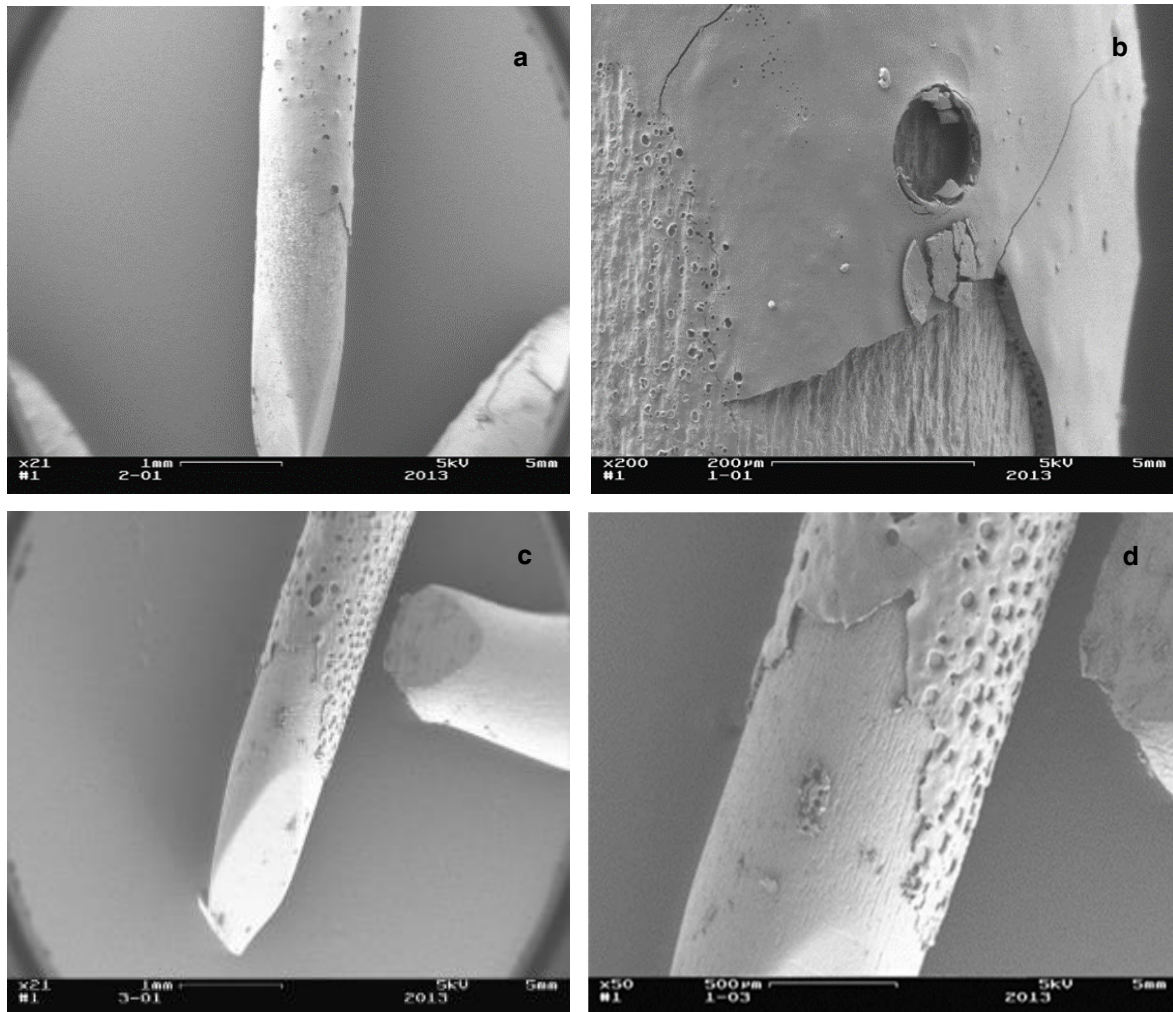


Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Implantate (1 mm Ø) nach Elution „eine Stunde“ bis „98 Tage“

(a,b) an der Spitze komplette Ablösung der Beschichtung, sichtbare Titanoberfläche des Implantats mit fließendem Übergang zum Polymer sowie einer deutlichen Bruchkante, Beschichtung weist unterschiedlich große Poren, aufgelagerte Partikel, sowie Mikrorisse auf (c,d) an der Spitze komplette Ablösung der Beschichtung, im weiteren Verlauf Herauslösung der Partikel aus Beschichtung, Poren bilden löchrige Struktur (links: Darstellung der Übersichten, Balken 1 mm; rechts: Darstellung der Details, (b) Balken 200 µm (d) Balken 500 µm)

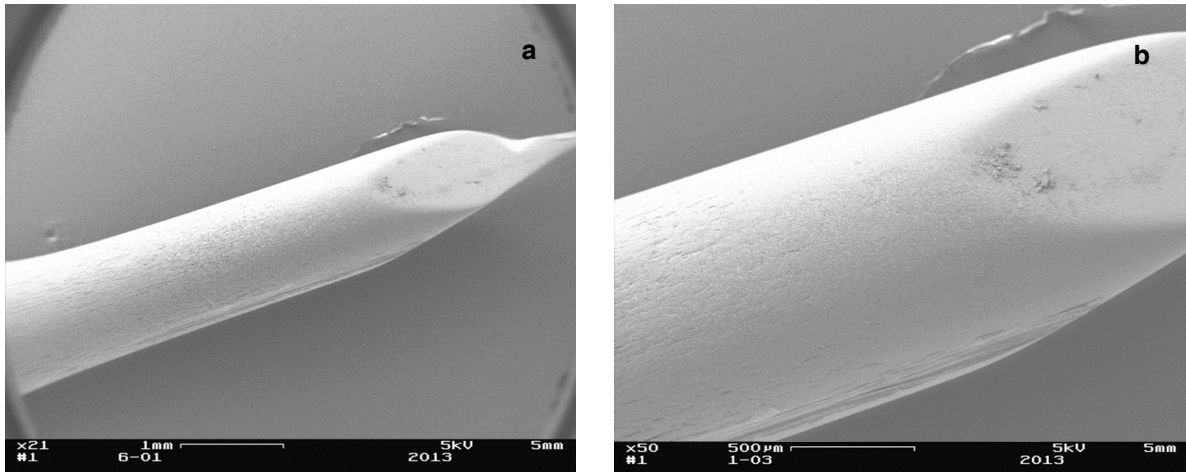


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Implantatspitze (1 mm \varnothing) nach *in-vivo* Verbleib „42 Tage“ und anschließendem Ausschütteln

(a,b) sichtbare Titanoberfläche ohne Beschichtungsrückstände (links: Übersicht, 21x, Balken 1 mm; rechts: Detailaufnahme, 500x, Balken 50 μ m)

3.7 Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Nierengewebe

Die Analyse der Gentamicinkonzentration im Nierengewebe erfolgte mit der labortechnischen Methode KIMS (Abb. 17). Nach einer Stunde konnte eine Gentamicinkonzentration von $2,1 \mu\text{g/g} \pm 1,19 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD) gemessen werden. Diese stieg bis zum Zeitpunkt „ein Tag“ nach Implantation auf den höchsten Wert der Messreihe von $4,96 \mu\text{g/g} \pm 1,83 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD). Anschließend sanken die Werte kontinuierlich. Die Konzentrationen der nachfolgenden Proben ab „Tag 14“ befanden sich unterhalb des Detektionslevels. Zu den ersten fünf Messzeitpunkten „eine Stunde“ bis „sieben Tage“ erfolgte somit ein positiver Nachweis von Gentamicin von durchschnittlich $2,89 \mu\text{g/g} \pm 1,06 \mu\text{g/g}$ (MW \pm SD).

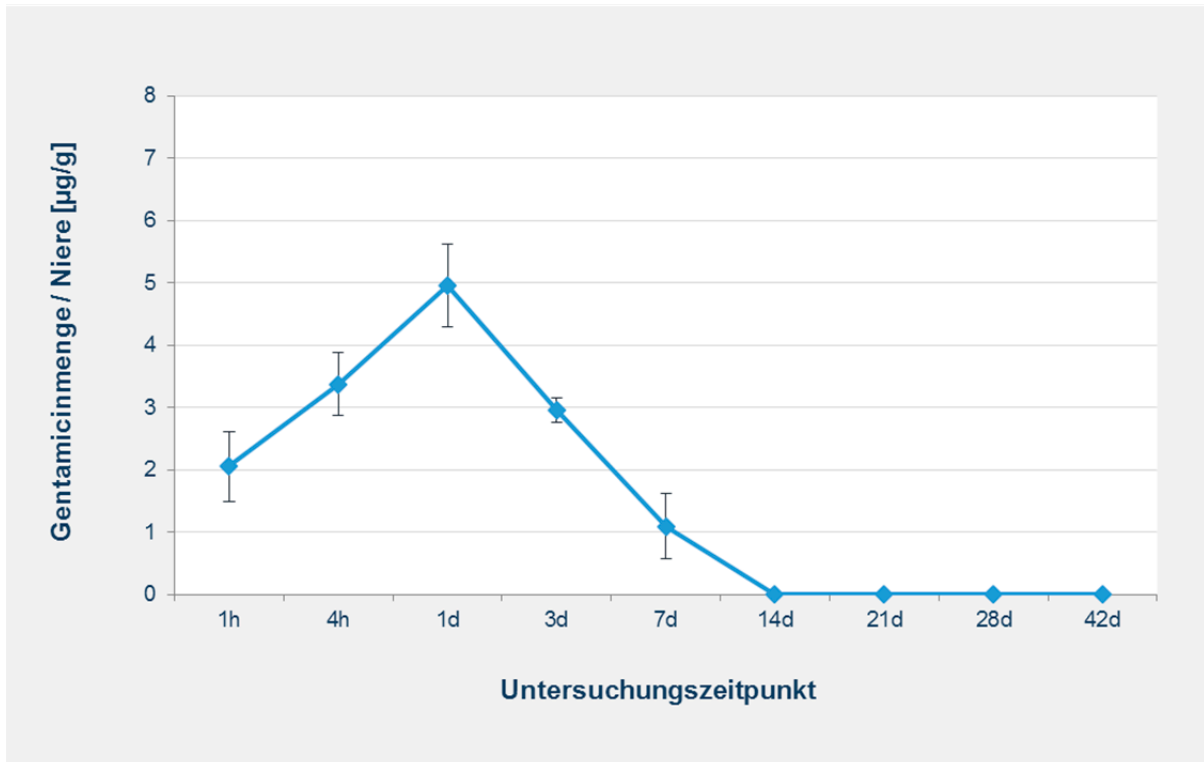


Abb. 17: Ermittelte Gentamicinkonzentration einer Niere ($\mu\text{g/g}$; MW \pm SD) zu den verschiedenen Zeitpunkten

3.8 Histologische und immunhistologische Ergebnisse

Bei der deskriptiven Auswertungsmethode wurden die Nierengewebeschnitte in der HE-Übersichtsfärbung betrachtet. Die Schnitte verliefen in der Sagittale mit Darstellung der Nierenrinde (*Cortex renalis*), des Nierenmarks (*Medulla renalis*), des Nierenbeckens (*Pelvis renalis*) und der Ein- bzw. Austrittsstelle der Nierengefäße (*Hilus renalis*). Alle Präparate waren von sehr guter Farbqualität und die einzelnen Gewebestrukturen ließen sich gut voneinander differenzieren.

In den anatomischen Regionen des *Cortex* und der *Medulla* wurden mögliche Strukturveränderungen semiquantitativ anhand von vier Stufen (Null bis Drei) beurteilt. Es zeigten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum keine pathologischen Veränderungen im Nierengewebe. Sowohl die Nierenrinde als auch das Nierenmark wiesen eine physiologische Struktur auf ohne Zerstörung der Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*) oder des Tubulussystems (Abb. 18a - c). Somit wiesen alle Parameter des Untersuchungsschemas zu allen Zeitpunkten einen Grad der Intensität mit der Scorebewertung Null auf.

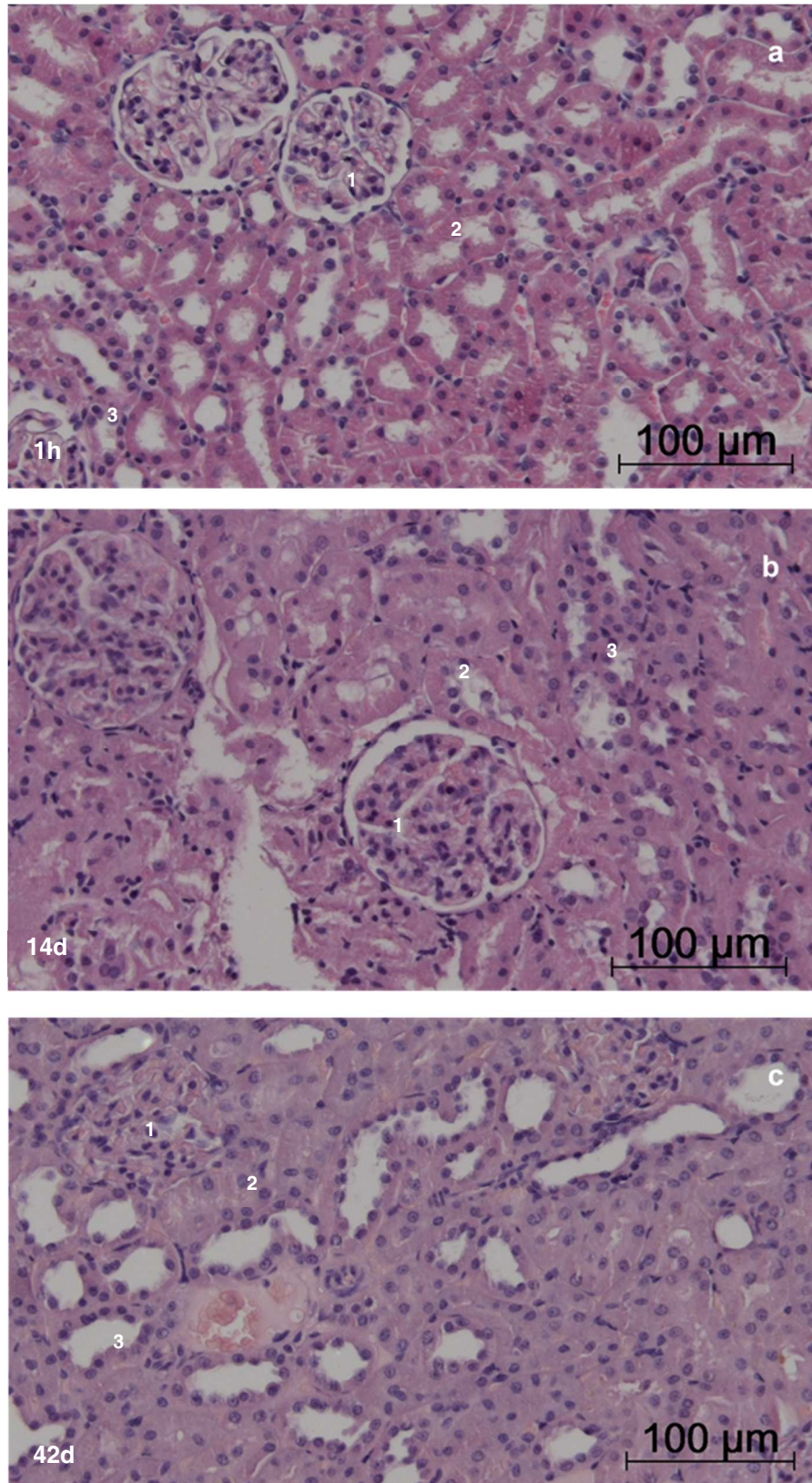


Abb. 18: exemplarische histologische Darstellung des Nierenparenchyms im Bereich des *Cortex renalis* im Zeitverlauf (HE-Färbung)

(a) Zeitpunkt „eine Stunde“ (b) Zeitpunkt „14 Tage“ (c) Zeitpunkt „42 Tage“ (*Cortex renalis*, 20x, Balken 100 µm)

(1) *Corpusculum renale* mit *Glomerulus* und Bowman-Kapsel (2) Querschnitt proximaler Tubulus (3) Querschnitt distaler Tubulus

Die immunhistologische Färbung diente dem Nachweis von Gentamicin in der Niere im Gesamtzeitraum von 42 Tagen. Die Bindung des Antikörpers an den Wirkstoff wurde durch eine rote Färbung im Nierengewebe visualisiert. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Niere, ohne Kontakt mit Gentamicin, in verschiedenen Verdünnungen gefärbt (Abb. 19). Dies diente dem Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Gentamicin-Antikörpers. Bei makroskopischer als auch mikroskopischer Beurteilung erfolgte keine Rotfärbung des Präparates (Abb. 20a - b).



Abb. 19: Niere im Parasagittalschnitt ohne Behandlung mit Gentamicin; eine Rotfärbung ist nicht erkennbar (Übersicht, 1,25 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

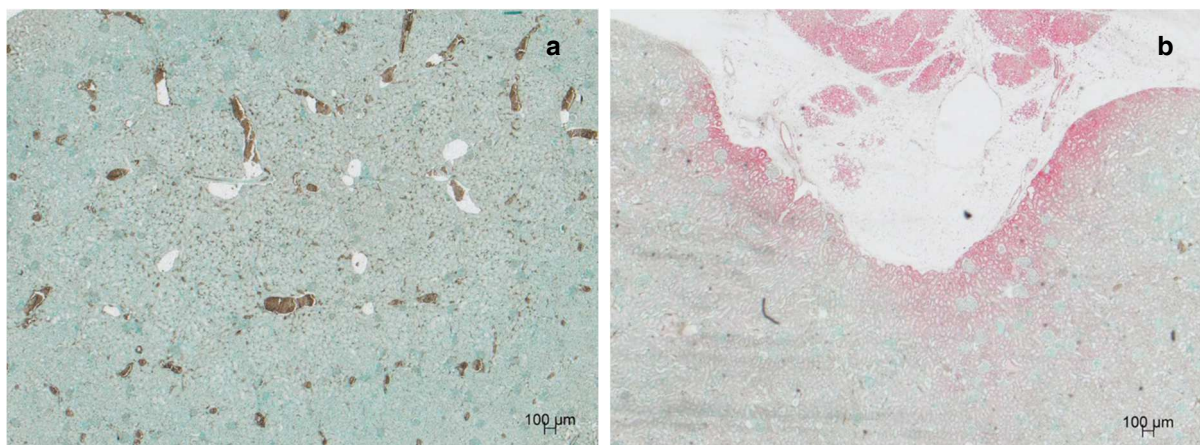


Abb. 20: Darstellung des Nierenparenchyms im Bereich des *Cortex renalis* nach immunhistologischer Markierung im Vergleich mit und ohne Gentamicinbehandlung

(a) Detailaufnahme Nierenparenchym ohne Behandlung mit Gentamicin (*Cortex renalis*, 2,5 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung) (b) Detailaufnahme einer behandelte Niere mit 10 mg Gentamicin / 1 ml PBS (*Cortex renalis*, 2,5 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

Bei der Negativkontrolle (ohne Verwendung des Primärantikörpers) zeigte sich im gesamten Nierengewebe keine unspezifische Färbung bzw. Bindung des sekundären Antikörpers. Nach Injektion von zwei Gentamicinkonzentrationen (10 mg/ml PBS und 10 µg/ml PBS) in die Niere vor Paraffineinbettung zeigten sich Unterschiede in der Farbintensität. In Abb. 21a - b ist jeweils ein Ausschnitt im Bereich des *Cortex renalis* im sagittalen Anschnitt dargestellt. Nierenepithelien im Bereich des *Cortex renalis* zeigten nach Injektion der hohen Konzentration ein deutliches rotes Farbsignal (Abb. 21a) im Gegensatz zur Injektion einer geringen Konzentration (Abb. 21b).

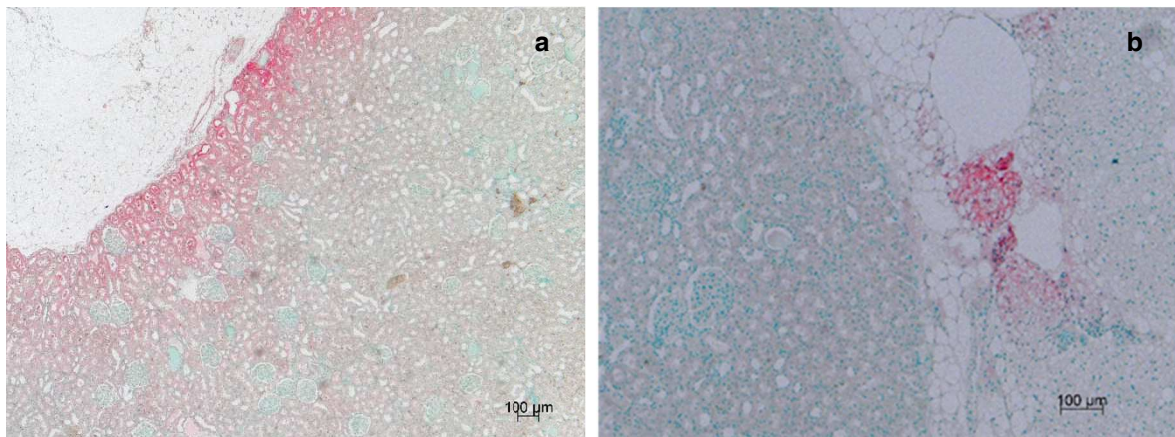


Abb. 21: Darstellung der Gentamicinsignalstärke im *Cortex renalis* nach immunhistologischer Markierung
(a) behandelte Niere mit 10 mg Gentamicin / 1 ml PBS (*Cortex renalis*, 5 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung)
(b) behandelte Niere mit 10 µg Gentamicin / 1 ml PBS (*Cortex renalis*, 10 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung),
Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

Die Gewebeschnitte aus dem Implantationsversuch zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten nach immunhistochemischer Markierung eine erkennbare Rotfärbung und somit einen positiven Nachweis von Gentamicin. Das Auftreten des rötlichen Farbsignals wurde bezüglich der Lokalisation und der Farbintensität zu den verschiedenen Zeitpunkten beurteilt.

Bezüglich der Lokalisation zeigte sich in allen Präparaten, dass vor allem im Bereich des *Cortex renalis* eine immunhistologische Färbung über den gesamten Untersuchungszeitraum nachzuweisen war. In der *Medulla renalis* konnte vereinzelt eine rötliche Darstellung gefunden werden (Abb. 22a - b).

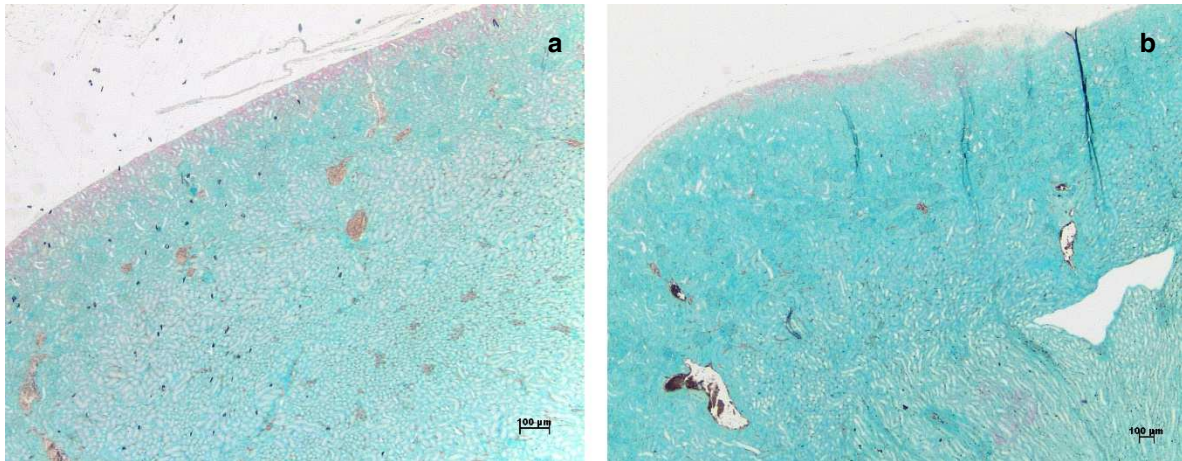


Abb. 22: immunhistologische Markierung von Gentamicin im *Cortex renalis* im Zeitverlauf
(a) Zeitpunkt „drei Tage“ (*Cortex renalis*, 5x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung) (b) Zeitpunkt „28 Tage“ (*Cortex renalis*, 2,5x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

In einer detaillierten Betrachtung des *Cortex renalis*, war eine rötliche Färbung der Tubuli proximalis und distalis erkennbar (Abb. 23). Die einschichtigen iso- bis hochprismatischen Epithelzellen des Hauptstücks (bestehend aus *Tubulus contortus proximalis* und *Tubulus rectus proximalis*) sind gekennzeichnet durch einen dichten Mikrozottenbesatz, dunkle Zellkerne und unklare Zellgrenzen. Das Epithel des Mittelstücks (bestehend aus *Tubulus rectus distalis* und *Tubulus contortus distalis*) ist mit einem spärlichem Mikrozottenbesatz, deutlichen Zellgrenzen und einer basalen Streifung charakterisiert.

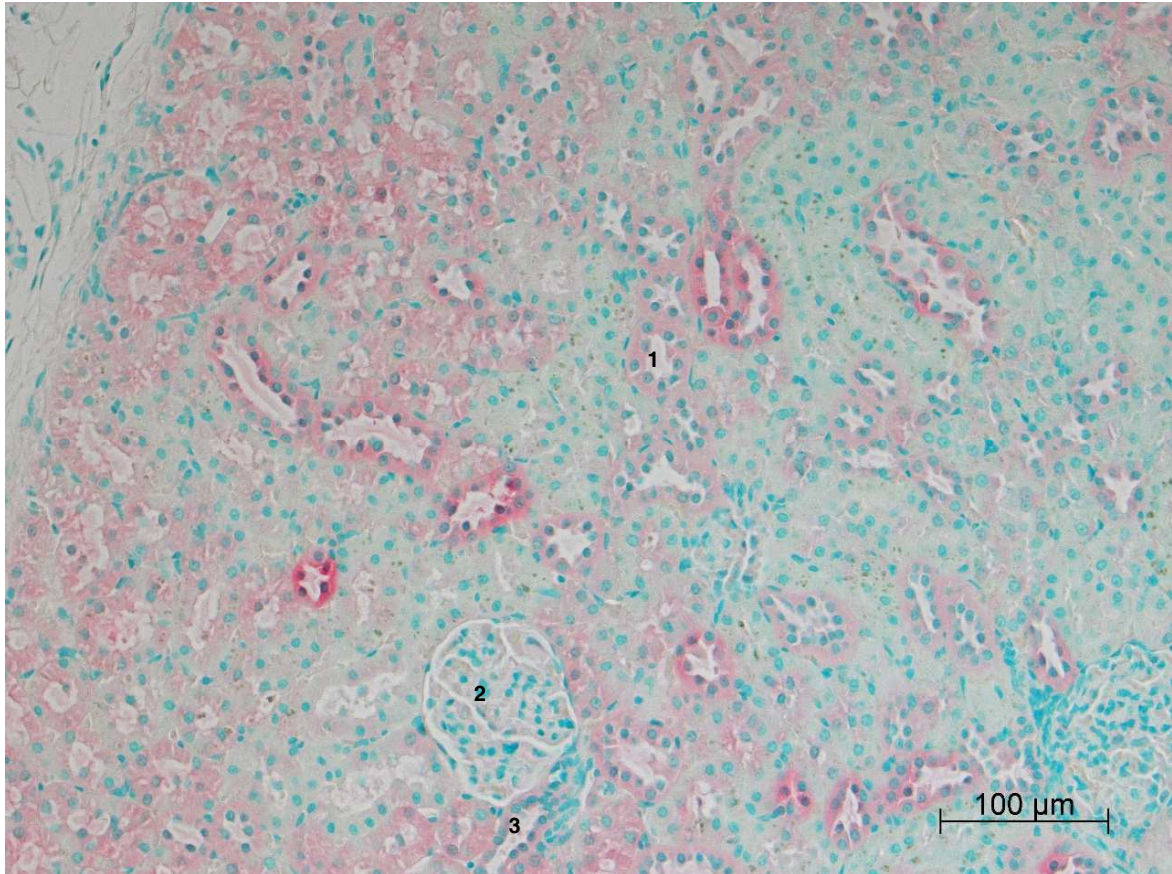


Abb. 23: Detailaufnahme der immunhistologischen Markierung von Gentamicin im Nierenparenchym im Bereich des *Cortex renalis*

(1) Querschnitt proximaler Tubulus (2) *Corpusculum renale* mit Glomerulus und Bowman-Kapsel (3) Querschnitt distaler Tubulus (Zeitpunkt „sieben Tage“, *Cortex renalis*, 20 x, Balken 100 μm , 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

Zu den verschiedenen Untersuchungszeiten zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Farbintensität der Rotfärbung in der Nierenrinde. Die Präparate der ersten drei Zeitpunkte „eine Stunde“ bis „ein Tag“ wiesen eine deutlich erkennbare Rotfärbung auf (Abb. 24a - c). In den Untersuchungszeitpunkten von „drei Tage“ bis „42 Tage“ zeigte sich nur noch eine schwache Färbung. In allen Präparaten war noch eine leichte rote Farbgebung in den *proximalen Tubuli* zu erkennen (Abb. 25a – h). Als Ausnahme konnte jedoch in einem Präparat auch nach sieben Tagen eine deutlich rote Markierung in der Nierenrinde nachgewiesen werden (Abb. 26).

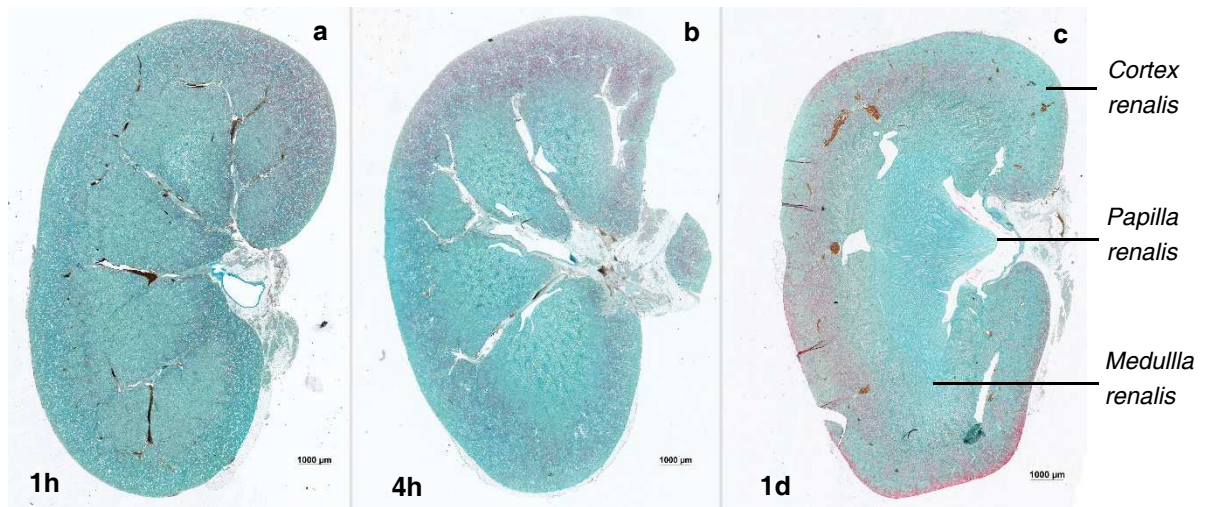


Abb. 24: exemplarische Darstellung des Nierenparenchyms nach immunhistologischer Färbung zu den Zeitpunkten mit starkem rotem Signal, rötliche Anfärbung im Cortex renalis im Sagittalschnitt

(a) Zeitpunkt „eine Stunde“ (b) Zeitpunkt „vier Stunden“ (c) Zeitpunkt „ein Tag“ (a – c: Übersichtsaufnahme, 2,5 x, Balken 1000 µm, 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

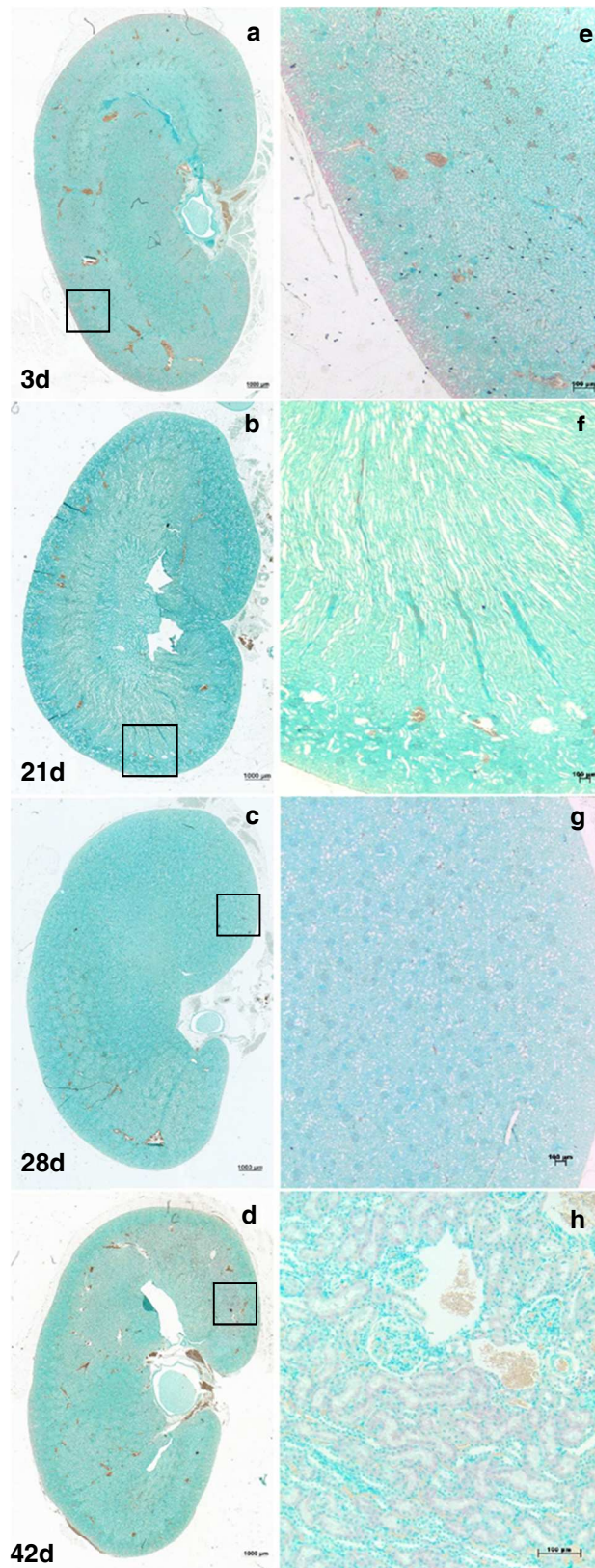


Abb. 25: exemplarische Darstellung des Nierenparenchyms nach immunhistologischer Färbung zu den Zeitpunkten mit schwachem rotem Signal, Anfärbung im *Cortex renalis* im Sagittalschnitt

(a,e) Zeitpunkt „drei Tage“ (b,f) Zeitpunkt „21 Tage“ (c,g) Zeitpunkt „28 Tage“ (d,h) Zeitpunkt „42 Tage“
 (a-d: Übersichtsaufnahme, 2,5 x, Balken 1000 µm, 1:50 Verdünnung, e-g: Detailaufnahme des *Cortex renalis*, 2,5x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung, h) Detailaufnahme des *Cortex renalis*, 10x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung), Gegenfärbung mit Methylgrün nach Vector

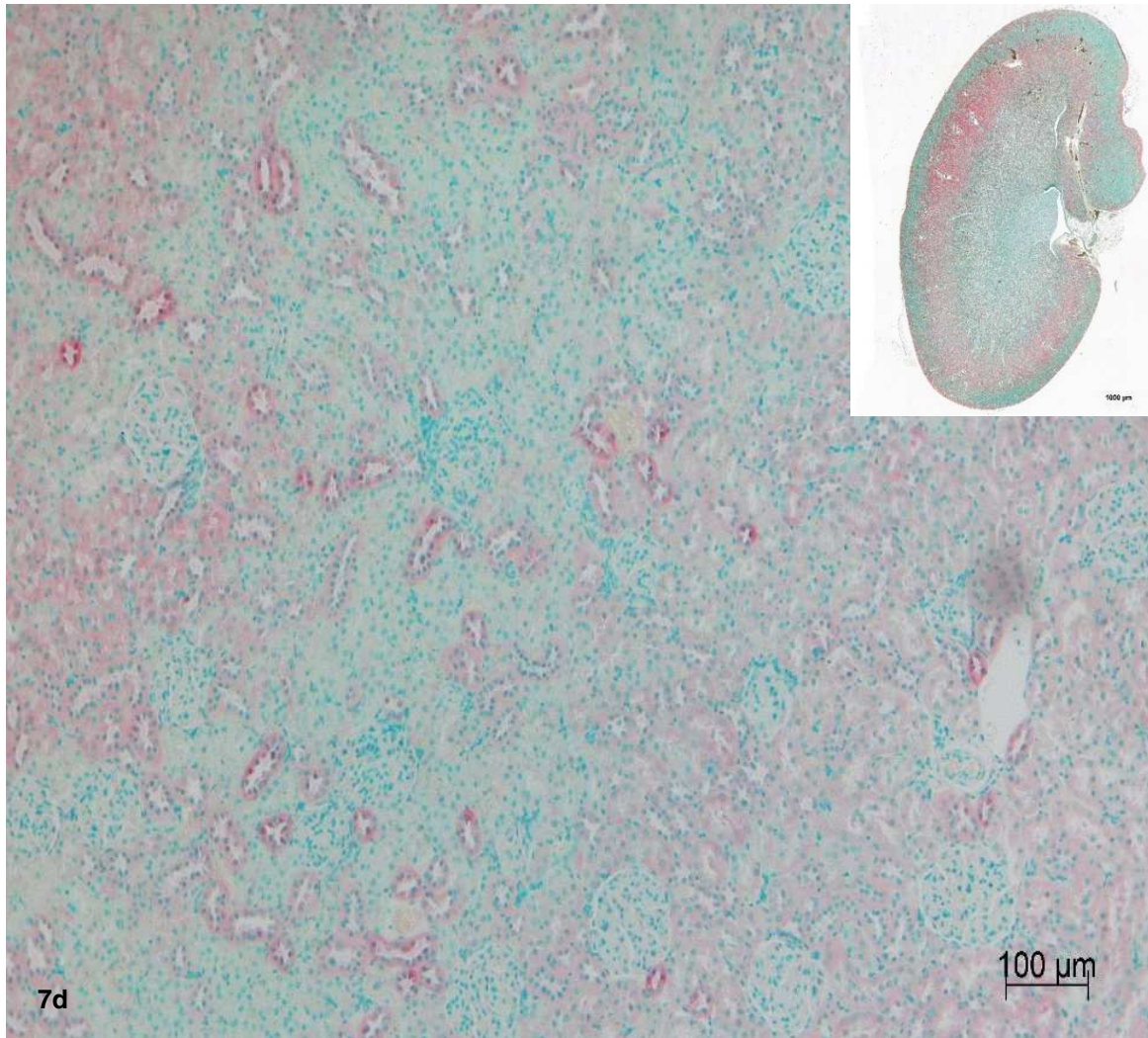


Abb. 26: exemplarische Detailaufnahme der immunhistologischen Färbung mit starkem rotem Signal im *Cortex renalis* (Zeitpunkt „sieben Tage“, 10 x, Balken 100 µm, 1:50 Verdünnung), in der rechten Ecke Darstellung der gleichen Probe in der Übersichtsaufnahme (Zeitpunkt „sieben Tage“, 2,5 x, Balken 1000 µm, 1:50 Verdünnung); Gegenfärbung mit Methylgrün

Um einen Einblick in die Flächenverteilung von Gentamicin im gesamten Nierengewebe über die Zeit zu erhalten, erfolgte eine prozentuale Berechnung der Fläche nach immunhistologischer Markierung des Gentamicins. Zu allen Zeitpunkten erfolgte eine Berechnung der gesamten gentamicinpositiven Fläche (in mm²) aus den Nierengewebsschnitten. Im Anschluss an die Flächenberechnung der gentamicinpositiven Fläche ließ sich der prozentuale Anteil der gentamicinpositiven Fläche im Nierengewebe ermitteln (Abb. 27). Der höchste nachweisbare Flächenanteil ergab sich innerhalb der ersten Woche. Während der ersten drei Untersuchungszeitpunkte „eine Stunde“ bis „ein Tag“ zeigte sich ein hoher prozentualer Anteil bis 2,52% ± 2,59% (MW ± SD) an „Tag eins“, gefolgt von einem raschen Abfall bis zum „Tag drei“. Im Anschluss folgte ein maximaler Anstieg zum Zeitpunkt „sieben Tage“, mit einer Fläche von 3,38%. Zu den nachfolgenden Analysezeitpunkten ergaben sich einheitlich niedrige Werte von 0,03% ± 0,03% (MW ± SD).

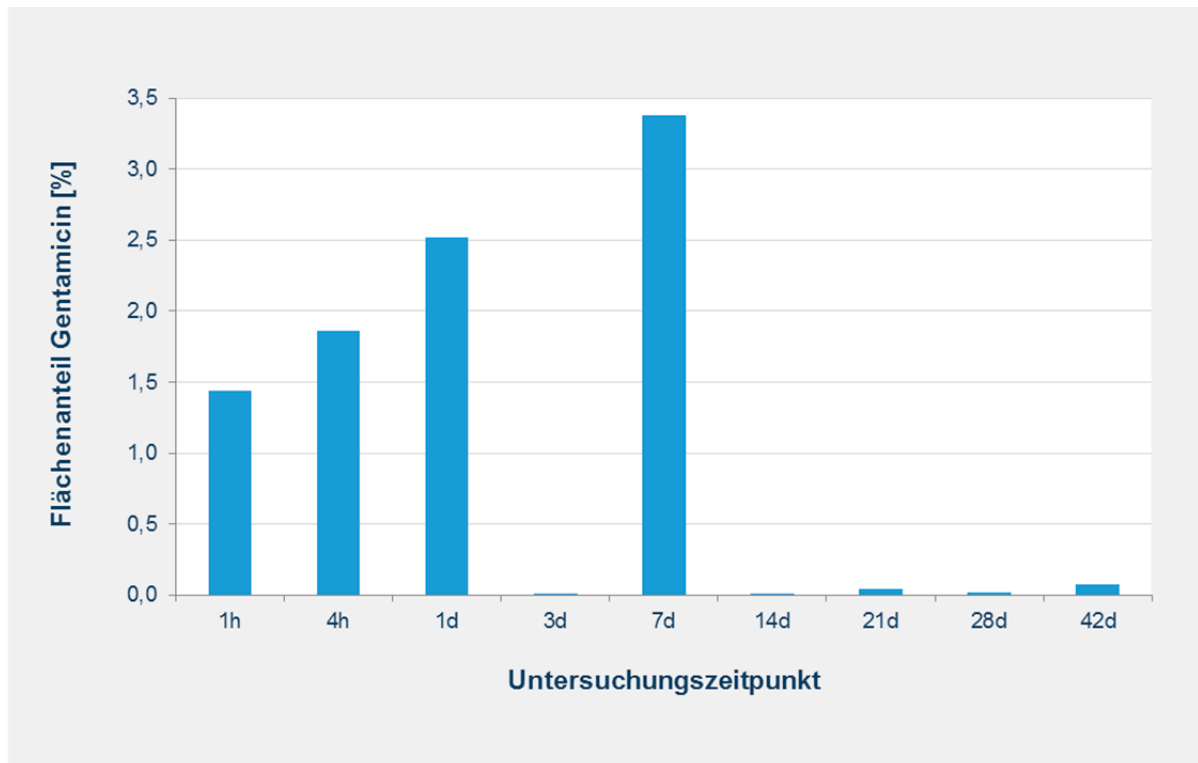


Abb. 27: ermittelter gentamicinpositiver Flächenanteil (%) in Bezug zur Gesamtnierenfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten

3.9 Bestimmung der Gentamicinkonzentration im Serum

Um mögliche systemische Gentamicinkonzentrationen im Serum nach lokaler Abgabe aus der Implantatbeschichtung ausschließen zu können, wurden die entnommenen Serumproben mittels KIMS-Test untersucht. Zu allen Zeitpunkten war Gentamicin mit einer Konzentration von $1,08 \mu\text{g/ml} \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ ($\text{MW} \pm \text{SD}$) nachweisbar. Die Serumkonzentrationen zeigten dabei über den gesamten Untersuchungszeitraum annähernd einheitliche Werte. Zu den Zeitpunkten „7 Tage“, „14 Tage“ und „21 Tage“ nach Implantation zeigten sich erhöhte Standardabweichungen (Abb. 28).

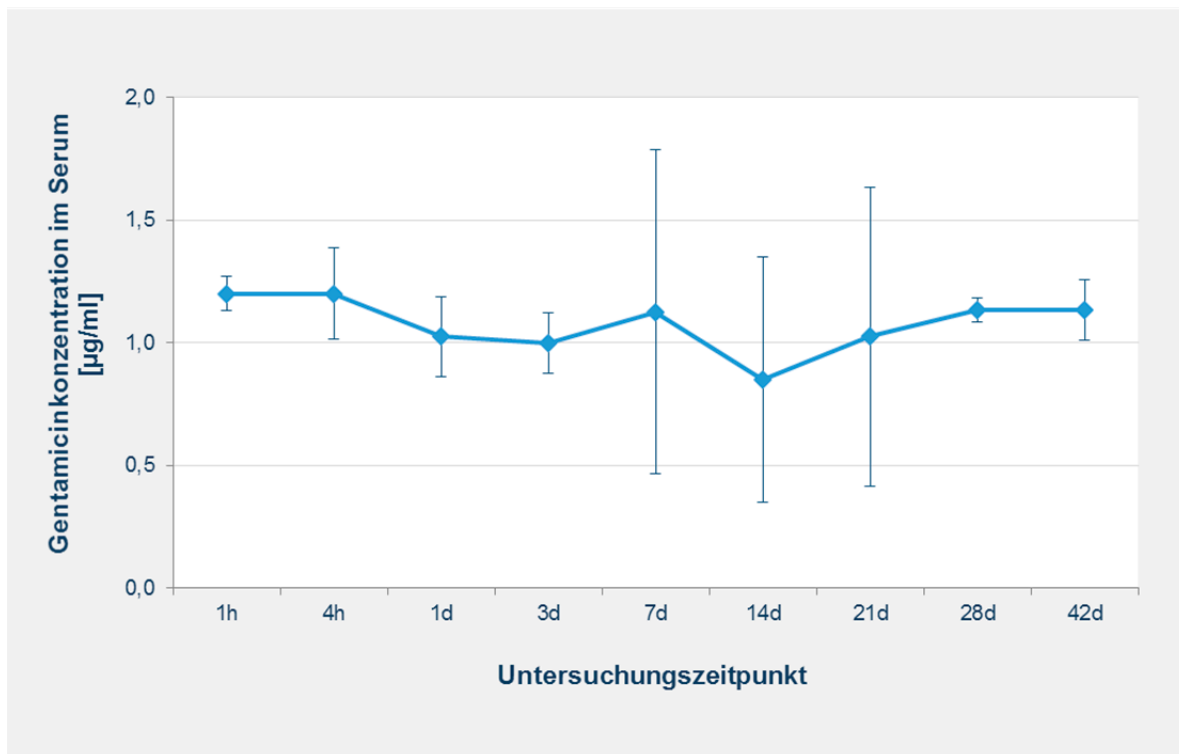


Abb. 28: ermittelte Gentamicinkonzentration im Serum ($\mu\text{g/ml}$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) zu den verschiedenen Zeitpunkten

Die gleichbleibenden Konzentrationen über den gesamten Untersuchungszeitraum gaben Anlass dazu, die Ergebnisse zu kontrollieren. Dies erfolgte durch Testung von Rattenserum aus anderen Versuchen. Diese Ratten wurden nie mit Gentamicin behandelt. Auch hier erfolgte ein positiver Nachweis von Gentamicin mit Konzentrationen von $0,69 \mu\text{g/ml} \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ ($\text{MW} \pm \text{SD}$). Eine anschließend durchgeführte Verdünnung des bereits positiv getesteten Serums und eine erneute Analyse ergaben Wirkstoffkonzentrationen umgekehrt proportional zum Grad der Verdünnung. Die Serumanalyse anderer Tierarten von Schwein, Schaf und Maus, bei denen nie eine Behandlung mit Gentamicin erfolgte, ergab keinen Nachweis von Gentamicin in den Proben. Diese Kontrollen legten eine unspezifische Reaktion des Tests nahe und es sollte mittels HPLC eine Gentamicinbestimmung erfolgen. Ein entsprechender Nachweis war jedoch erfolglos.

3.10 Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung

Alle Proben des Endosts der ersten beiden Messzeitpunkte „eine Stunde“ bis „vier Stunden“ nach Implantation zeigten eine Hemmung des Bakterienwachstums von *S. aureus* mit einer ZOI von $10,2 \text{ mm} \pm 1,0 \text{ mm}$ und $9,1 \text{ mm} \pm 1,9 \text{ mm}$ ($\text{MW} \pm \text{SD}$) (Abb. 29). Die Proben der späteren Zeitpunkte „ein Tag“ bis „42 Tage“ wiesen nur eine schwache oder gar keine

antimikrobielle Aktivität mit einer deutlich kleineren ZOI von $6,7 \text{ mm} \pm 0,7 \text{ mm}$ (MW \pm SD) auf, bis auf die Zeitpunkte „21 Tage“ und „28 Tage“ nach Implantation, in denen sich im Vergleich eine größere Inhibitionszone darstellte. Die Kontrollgruppen mit $30 \mu\text{g}$ Gentamicin zeigten eine deutliche sichtbare Bakterienhemmung mit einer ZOI von $29,1 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$ (MW \pm SD) (Abb. 30a - c). Aus den Ausschüttelproben der Implantate sowie aus den Proben der Knochen, Nieren als auch des Serums waren keine Hemmhöfe sichtbar.

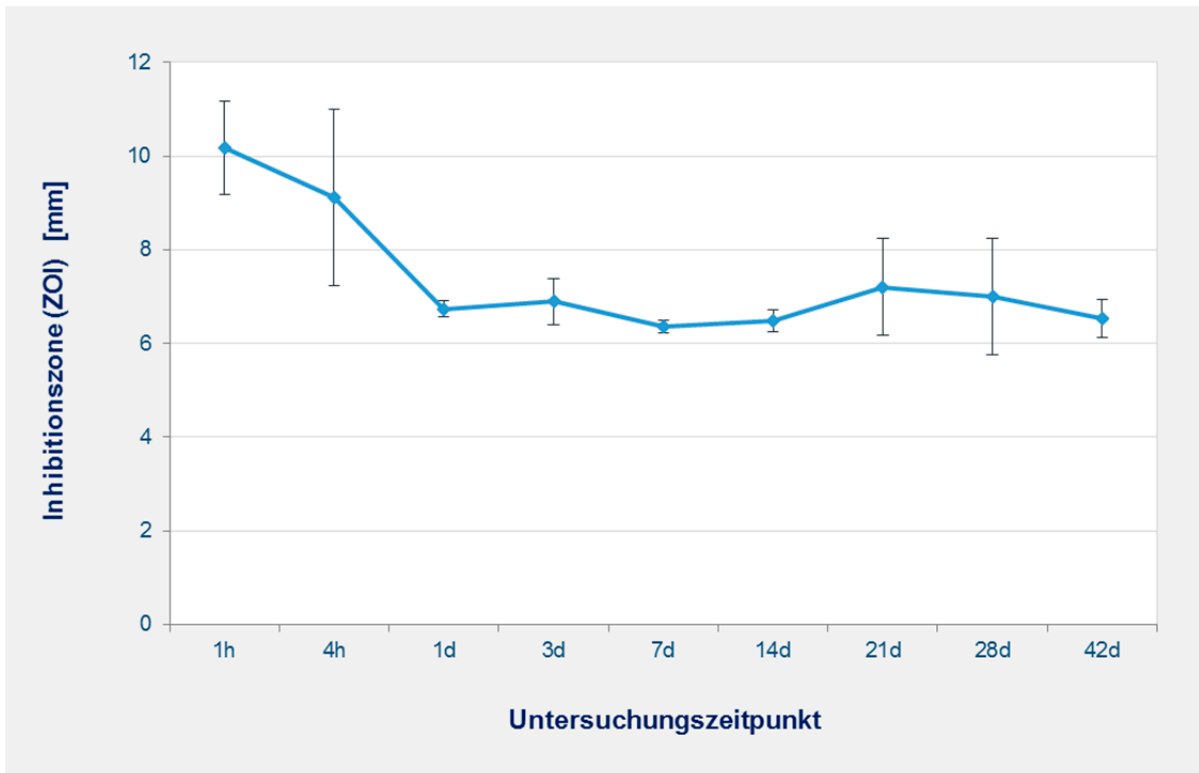


Abb. 29: Darstellung der Mittelwerte (MW \pm SD) der Inhibitionszone (ZOI) im Endostgewebe
Untersucht wurden die Eluatproben des Endosts der Untersuchungszeitpunkte „eine Stunde“ bis „42 Tage“ bezüglich der Hemmung des Keims *S. aureus*

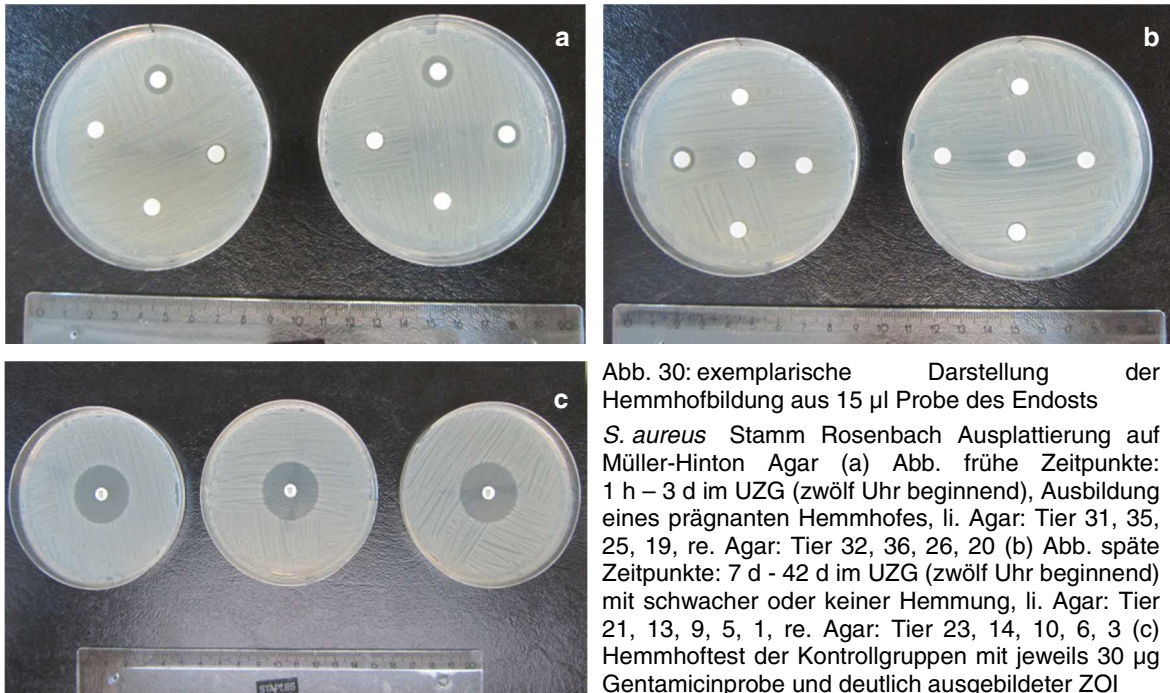


Abb. 30: exemplarische Darstellung der Hemmhofbildung aus 15 µl Probe des Endosts

S. aureus Stamm Rosenbach Ausplattierung auf Müller-Hinton Agar (a) Abb. frühe Zeitpunkte: 1 h – 3 d im UZG (zwölf Uhr beginnend), Ausbildung eines prägnanten Hemmhofes, li. Agar: Tier 31, 35, 25, 19, re. Agar: Tier 32, 36, 26, 20 (b) Abb. späte Zeitpunkte: 7 d - 42 d im UZG (zwölf Uhr beginnend) mit schwacher oder keiner Hemmung, li. Agar: Tier 21, 13, 9, 5, 1, re. Agar: Tier 23, 14, 10, 6, 3 (c) Hemmhofstest der Kontrollgruppen mit jeweils 30 µg Gentamicinprobe und deutlich ausgebildeter ZOI

3.11 Quantitative Auswertung der Gesamtgentamicinkonzentration

Die für die Studie entnommenen Proben dienten der Quantifizierung von Gentamicin. In Tab. 14 ist die Anzahl der Proben dargestellt, in denen über einen Verlauf von 42 Tagen Gentamicin nachweisbar war. Die Analyse erfolgte anhand verschiedener Testprinzipien (vgl. Tab.6). Als Grundlage für die Bestimmung der Gentamicinkonzentration in allen Proben diente die Methode KIMS. Das Detektionslimit lag bei 0,8 µg/ml. Eine weitere Analyse der Gentamicinkonzentration auf den Implantaten erfolgte mittels HPLC bei einem Detektionslimit von 0,08 µg/ml. Die Auswertung der Knochen- und Endostproben sowie der Implantate erfolgte nach Einbringen der Titankirschnerdrähte in beide Tibiae. Die Gentamicinquantifizierung erfolgte anhand einer Niere pro Tier.

Ein Konzentrationsnachweis des Wirkstoffes erfolgte bei allen Proben (Knochen, Endost, Implantat, Niere) zum Zeitpunkt „eine Stunde“ nach Implantation. Ebenfalls war in allen Proben nach vier Stunden Gentamicin nachweisbar. Außer im Knochengewebe erfolgte zum Untersuchungszeitpunkt „vier Stunden“ nach Implantation nur noch in zwei von acht Proben ein Nachweis. Im Endost und im Nierengewebe erfolgte ein Gentamicinnachweis bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 42 Tagen. In keiner der Proben mit dem Zeitpunkt „sieben Tage“ war der Wirkstoff im Endost messbar.

Nach Entnahme der Implantate gelang aus der verbliebenen Beschichtung ebenfalls ein Nachweis von Gentamicin bis zum Zeitpunkt „42 Tage“ mittels HPLC-Messung. Ein Quantifikation von Gentamicin mittels KIMS erfolgte aus nur einer Implantatbeschichtung zum Zeitpunkt „28 Tage“ nach Implantation.

Tab. 14: Anzahl der positiv auf Gentamicin getesteten Proben mit der Methode KIMS und HPLC zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten 1 h – 42 d

Untersuchungs- zeitpunkt	Knochen	Endost	Implantat		Niere
	KIMS	KIMS	KIMS	HPLC	KIMS
1 h	7/7	7/7	0/8	8/8	4/4
4 h	2/8	8/8	0/8	8/8	4/4
1 d	0/7	7/7	0/7	6/7	4/4
3 d	0/8	8/8	0/8	3/8	4/4
7 d	0/8	0/8	0/8	1/8	3/4
14 d	0/8	8/8	0/7	2/7	3/4
21 d	0/8	8/8	0/8	5/8	3/4
28 d	0/6	6/6	1/6	3/6	3/3
42 d	0/6	6/6	0/6	1/6	3/3

In Abb. 31 ist die Gesamtmenge (in μg) des nachgewiesenen Gentamicins aus allen Proben, ausgenommen der Serumproben, *in-vivo* im Vergleich zu der Gesamtmenge (in μg) des nachgewiesenen Gentamicins *in-vitro* dargestellt. Die horizontale Gerade im Diagramm stellt die Gentamicinmenge (in μg / Implantat) in der PDLLA-Beschichtung eines Titankirschnerdrahtes dar. Die Ergebnisse beziehen sich dabei auf die durchschnittliche Gesamtmenge von Gentamicin eines Implantats je Tier pro Zeitpunkt.

Initial zeigte sich in der *in-vitro* Freisetzung ein rascher Anstieg bis zum Zeitpunkt „ein Tag“. Anschließend erfolgte ein kontinuierlicher Verlauf der freigesetzten Menge Gentamicin von bis zu 50 μg über den gesamten Untersuchungszeitraum von 42 Tagen. *In-vivo* war zum Zeitpunkt „eine Stunde“ quantitativ die höchste Menge Gentamicin von 5,59 μg im Gesamtgewebe erreicht. Es schloss sich eine stetige Abnahme des Gentamicingehalts bis zum „Tag 42“ an. Die maximalen Gesamtmengen in den jeweiligen Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. Die höchste Menge im Nierengewebe fand sich nach Tag eins wieder, wohingegen im Knochengewebe nach einer Stunde das Maximum erreicht war und auf dem Implantat nach vier Stunden die höchste Restmenge Gentamicin in der Implantatbeschichtung nachweisbar war.

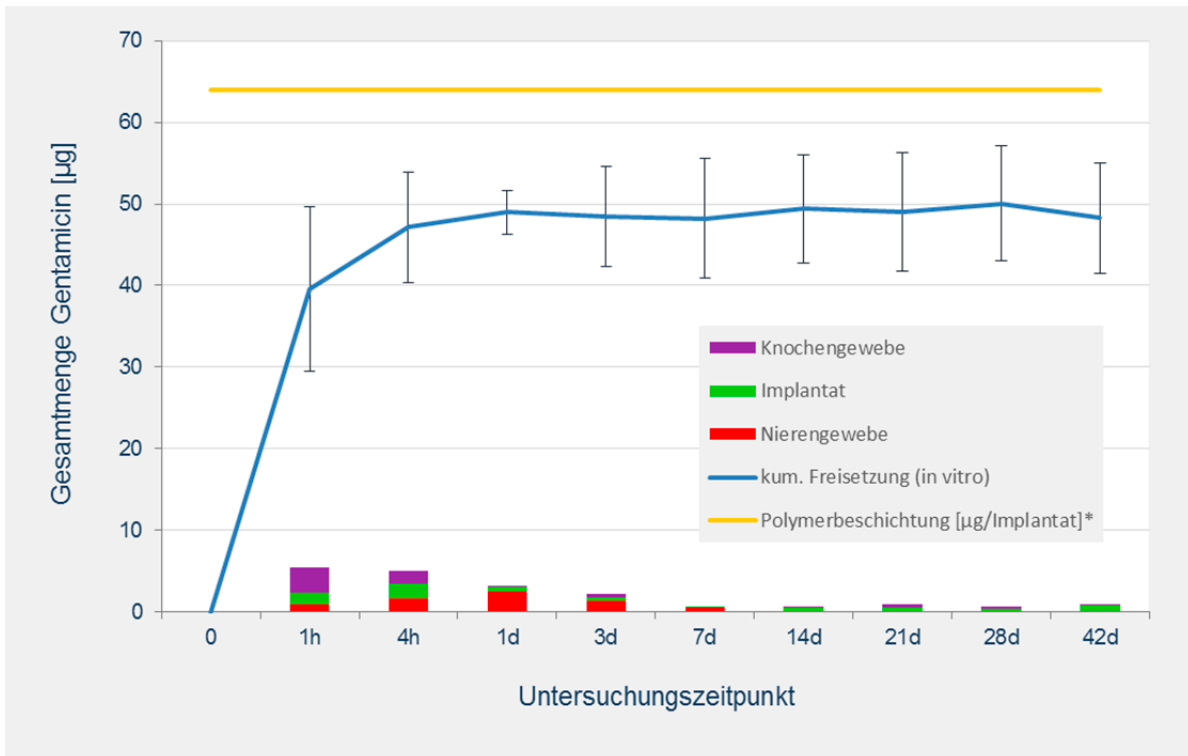


Abb. 31: quantitative Auswertung des Gesamtgentamicingehalts pro Implantat [μg] *in-vitro* ($n = 6 - 9$) und *in-vivo* ($n = 7 - 8$), (*lt. Herstellerangabe)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der *in-vitro* und *in-vivo* Freisetzung des antiinfektiven Wirkstoffes Gentamicin aus einer biodegradierbaren Polymerbeschichtung Poly(D,L-Laktid) von Titankirschnerdrähten. Ziel dieser Studie war es, das Freisetzungsverhalten, die Verteilung und die Anreicherung von Gentamicin nach Einbringen des Implantats in den Tibiamarkraum von Ratten, in das umliegende Gewebe, in den Nieren und im Serum zu überprüfen. Nach einem Untersuchungszeitraum von längstens 42 Tagen wurden die Tiere euthanasiert. Im Anschluss erfolgten histologische und histochemische, radiologische sowie mikrobiologische Untersuchungen. Dadurch konnte eine Aussage über die *in-vivo* Freisetzung des Wirkstoffes getroffen werden und eine quantitative Messung des Gentamicins auf der verbliebenden Implantatbeschichtung, im Knochen-, Endost-, und Nierengewebe erfolgen.

Die gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen der Beschichtung und dem umliegenden Gewebe können nicht in der Zellkultur oder in künstlichen Organsystemen nachgestellt werden, weswegen *in-vivo* Studien als unerlässlich gelten (Nikolakis et al., 2016; Stokes, 2015). Eine genaue Kenntnis über die Freisetzungskinetik stellt eine wichtige Grundlage für die Entwicklung und den Einsatz von gesteuerten Wirkstoffabgabesystemen dar.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Versuchstiermodell

Die Ratte gilt, neben der Maus, als eines der am häufigsten eingesetzten und weit verbreiteten Tiermodelle (BMEL, 2015; Iannaccone & Jacob, 2009). Der Vorteil im Einsatz der Ratte als Versuchstier liegt in der guten Kosten-Nutzen-Effizienz. Zudem ist ihre Körpergröße, im Vergleich zur Maus, für chirurgische Studien besser geeignet. Zusätzlich zeichnet sich die Ratte durch ihr unkompliziertes Handling, ihre geringe Aggressivität und Neophobie, eine kostengünstige Haltung sowie eine einfache Ernährung, als omnivore Spezies mit Alleinfuttermitteln aus (Reifenberg, 2016; Wagner & Kluge, 2016). Das Versuchstier „Ratte“ wurde bereits mehrfach in Studien aus den Bereichen der Frakturheilung und der Infektionsprophylaxe verwendet, wodurch ein aussagekräftiger Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Studien möglich ist (Einhorn et al., 2003; Greiner et al., 2008; Lucke et al., 2003; Lucke et al., 2005; Schmidmaier et al., 2002; Schmidmaier et al., 2003). Weiterhin diente diese Spezies schon als Versuchstier bei der intramedullären Frakturstabilisierung der Tibia nach Osteotomie mittels Titankirschnerdraht in der eigenen Arbeitsgruppe (Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, Forschungsfeld Knochenheilung, Stimulation der Heilung unter der Leitung von Prof. Britt Wildemann). Aus der daraus resultierenden umfassenden Erfahrung im Umgang mit der Spezies in den Bereichen der Anästhesie, dem routinierten

chirurgischen Eingriff, als auch in der postoperativen Gesundheitskontrolle der Tiere (Back et al., 2016; Fassbender et al., 2013; Schmidmaier et al., 2006; Wildemann et al., 2004), erfolgte die Durchführung dieser Studie an dem Tiermodell „Ratte“. Die in der muskuloskeletalen Forschung verwendeten Großtiere wie z.B. Ziege, Schaf, Hund oder Schwein sind als phylogenetisch höher entwickelt einzustufen (O'Loughlin et al., 2008; Reichert et al., 2009). Aus diesem Grund sind ihnen, sofern es keine zwingenden Argumente für ihre Verwendung gibt, Nagetiere und Kaninchen vorzuziehen. Wenn die Verwendung von Mäusen nicht aufgrund einer bestimmten Fragestellung notwendig ist, z.B. die Verwendung von genetisch veränderten Tieren, erscheint es sinnvoll eine größere Tierart zu bevorzugen. Sofern man Mäuse, auch aufgrund ihrer geringen Körpergröße, zunächst ausschließt, stehen weiterhin die Ratte oder das Kaninchen zur Auswahl. Die Literatur bestätigt, dass es sich bei Kaninchen um eine empfindlichere Spezies handelt. Dies bezieht sich beispielsweise auf dessen Umgang, aufgrund der hohen Stressempfindlichkeit der Tiere (Flecknell, 2009) und deren Anästhesie, da das Toleranz- und Asphyxiestadium eng beieinander liegen (Schall, 2014). Darüber hinaus spielen artspezifische Besonderheiten, wie die Schwierigkeiten bei der Ermittlung des Körpergewichtes, als Grundlage für die Dosierung von Analgetika und Anästhetika, eine wichtige Rolle. Diese ist aufgrund des voluminösen Verdauungstraktes und hoher Ingestamengen, einer hohen Stoffwechselrate und der Gefahr einer Hypoglykämie schwieriger zu bestimmen. Das mögliche Auftreten von Diarrhoe bzw. einer pseudomembranösen Enterokolitis stellen wichtige Faktoren dar, die mit einer erhöhten Mortalität einhergehen können und für die Auswahl einer geeigneten Tierspezies bedacht werden sollten (LaMont et al., 1979). Ratten gelten als weniger anfällig gegenüber Komplikationen in Folge einer Operation oder einer Infektion (Rissing, 1990) und weisen seltener Nebenwirkungen nach einer langfristigen systemischen antibiotischen Therapie auf (Cremieux & Carbon, 1997).

Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die Auswahl der Untersuchungszeitpunkte übereinstimmend mit den Messzeitpunkten aus vorherigen *in vitro* Studien der Arbeitsgruppe gewählt (Strobel et al., 2011a; Strobel et al., 2011c). Die Festlegung einer notwendigen Gruppengröße von $n = \text{vier}$ erfolgte anhand bisheriger Erfahrungen der Arbeitsgruppe. Bei zwei implantierten Marknägeln je Tier ergab sich eine Probengröße von acht je Untersuchungszeitpunkt. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um eine reine „Materialstudie“ ohne Krankheits- oder Frakturmodell. Eine Osteotomie wurde nicht durchgeführt. Das Implantat wurde in den Tibiamarkraum eingebracht. Der Knochen sowie das umgebende Periost blieben unversehrt, mit Ausnahme der Nageleintrittsstelle. Ebenso entstand ein nur sehr geringfügiges Weichteiltrauma, infolge der Hautinzision für den operativen Zugang. Das Einbringen von Implantaten am intakten Bewegungsapparat wird als mäßige Belastung eingestuft (Union, 2010). Die Tiere kehrten spätestens zwei bis drei Tage nach dem chirurgischen Eingriff zu einem uneingeschränkten Verhalten zurück. Von insgesamt 36 Tieren verstarben zwei Tiere im Laufe der Narkoseeinleitung für den operativen Eingriff, ein Tier aus dem Analysezeitpunkt „28 Tage“ und das zweite Tier aus dem Untersuchungszeitpunkt „42 Tage“. Die Ursache war ein Herz-Kreislaufversagen. Ein Schwenken der Tiere um die Horizontale und eine Reanimation

durch eine Herzdruckmassage waren erfolglos. Dies entspricht einer Ausfallrate von rund 6%. Studien und Datengrundlagen zur Beurteilung der Ausfallraten sind bisher unzureichend. Gründe für perioperative Sterblichkeit im Zusammenhang mit verschiedenen Anästhesieformen wurden untersucht (Heitz, 2005; Hüske, 2014). Hormonelle Stressreaktionen, beispielsweise bei der Einleitung der Narkose (Brodbelt et al., 2008) können zu einem Entgegenwirken der Anästhesie führen (Gabriel, 2010). Zudem treten bei Heimtieren, im Gegensatz zu Kleintieren, häufiger letale Anästhesiekomplikationen auf (Henke & Reinert, 2006). Ein Versagen des Herz-Kreislaufsystems zählt zu den häufigsten Ursachen perioperativer Sterblichkeit (Brodbelt et al., 2008). Daher ist der Ausfall von zwei Tieren in dieser Studie als gering anzusehen.

4.1.2 Analysemethoden zur Probenauswertung

Aufgrund analytischer Probleme wurde die Kombination verschiedener Methoden zum Nachweis von Gentamicin in den Geweben verwendet. Dies ermöglichte es, umfassende Informationen über die Gentamicinquantifizierung, die Akkumulation und Aktivität des lokal freigesetzten Wirkstoffes im Versuchszeitraum zu sammeln.

Die quantitative Bestimmung von Gentamicin in den Proben wurde im Labor Berlin standardisiert mit der Testmethode KIMS durchgeführt. Diese Methode ist jedoch nur für humane Proben validiert. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Anti-Gentamicin-Antikörper der Maus. Die Ergebnisse der Serumanalysen, insbesondere die mit der durchgeführten Verdünnung, legen den Verdacht nahe, dass es aufgrund einer nahen Verwandtschaft zwischen den Spezies „Maus“ und „Ratte“, zu analytischen Interferenzen gekommen ist. Analysen von Serumproben bei Ratten ohne Kontakt mit Gentamicin wiesen ähnlich nachweisbare Wirkstoffkonzentrationen im Serum auf. Wohingegen die Serumanalyse anderer Tierarten, ohne Behandlung mit Gentamicin, keinen Nachweis des Wirkstoffes in den Proben ergab. Diese Resultate legen nahe, dass die Methode KIMS keine validen Ergebnisse im Rattenserum ergeben. Die konstant gemessenen Serumkonzentrationen über den gesamten Untersuchungszeitraum geben ebenfalls Anlass dazu, die Methode KIMS als nicht aussagekräftig genug anzusehen. Eine genauere Detektion und Quantifizierung des Wirkstoffes, beispielsweise über ein nicht-antikörper-basiertes Nachweisverfahren für eine sensitivere, als auch spezifischere Gentamicinquantifizierung innerhalb der Gewebe und des Serums sind erforderlich, um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren. Daher wurde ein Verfahren mittels HPLC für die Quantifizierung des Gentamicins im Serum angewendet. Eine Analyse war mit dieser Methode jedoch nicht möglich, da bis zum Zeitpunkt „eine Stunde“ kein Gentamicin messbar war. Auch in den nachfolgenden Zeitpunkten war kein Nachweis möglich, da die Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/ml lagen. Mögliche Wechselwirkungen der Serumbestandteile mit der Messmethode HPLC können Ursache für einen fehlenden Nachweis von Gentamicin sein. Beispielsweise wäre eine erneute Analyse mittels HPLC, unter der Voraussetzung einer möglichen Aufreinigung der Probenmaterialien, denkbar. Weiterhin war die Etablierung des HPLC-Protokolls für das Nierengewebe nicht möglich.

Jedoch lieferte die Methode KIMS Ergebnisse und die immunhistochemische Färbung bestätigte die Akkumulation von Gentamicin in der Niere bis zum siebten Tag. Der Nachweis von Gentamicin in der verbliebenen Implantatbeschichtung nach Entnahme aus der Tibiamarkhöhle erfolgte lediglich auf einem Implantat nach 28 Tagen. Die KIMS-Methode erwies sich aufgrund einer zu geringen Sensitivität von 0,8 µg/ml als nicht sensitiv genug. Dies zeigte sich im Vergleich mit einer zusätzlichen Messung der Proben mittels HPLC-Methode, bei einem zehnfach niedrigeren Detektionslevel von 0,08 µg/ml, wodurch bei allen explantierten Drähten bis „vier Stunden“ nach Implantation ein positiver Nachweis von Gentamicin erfolgte. Anschließend reduzierte sich die Konzentration bis „Tag 42“. Auch mit der HPLC-Methode wurde zum Zeitpunkt „28 Tage“ bei derselben Probe eine hohe Gentamicinkonzentration festgestellt. Dies lässt weder auf ein Problem der Methodenaufbereitung schließen, noch auf einen Fehler in der Testdurchführung. Es gibt keinen eindeutigen Hinweis für den Grund der hohen verbliebenen Konzentration von Gentamicin in der Beschichtung im Vergleich zu den anderen Ausschüttelproben. Eine mögliche Ursache könnte in dem individuellen Degradationsprozess der Beschichtung im Markraum des Tieres sein. Eine Quantifizierung der restlichen Polymermenge in der verbliebenen Beschichtung durchzuführen, war nicht erfolgreich.

Das mikrobiologische Resultat bestätigte zudem, dass die Messergebnisse aus der Serumanalyse mit der Methode KIMS nicht aussagekräftig sind. Der Agar-Diffusionstest zeigte, dass in den gesamten Proben des Serums keine ausreichende Menge an Gentamicin vorhanden war, um ein Bakterienwachstum zu hemmen. Die Ausbildung einer ZOI erfolgt erfahrungsgemäß aus Messungen der eigenen Arbeitsgruppe ab 0,8 – 1 µg/ml Wirkstoffmenge in der Probe. Somit hätte sich mit den Werten aus der KIMS Messung eine ZOI ausbilden müssen. Es konnte ebenfalls keine Ausbildung einer ZOI in den Proben der Nieren- und Knochengewebe sowie der restlichen Implantatbeschichtung nachgewiesen und somit keine antimikrobielle Aktivität des Gentamicins dargestellt werden. Das Ausbleiben eines Hemmhofs in diesen Proben zeigte, dass nicht genügend Wirkstoffmenge vorhanden war. Dies ist zum Einen auf die hohe Flüssigkeitsmenge für die Probenaufbereitung zurückzuführen, welche das Verhältnis Gentamicin pro Milliliter und somit das Messergebnis beeinflusste. Zum Anderen resultierte die niedrige Gentamicinmenge aus der geringen Probenmenge von 15 µl, welche für den mikrobiologischen Test verwendet wurde. Die Kombination der antikörperbasierten Quantifizierung mit einem mikrobiologischen Assay bewies die Akkumulation von Gentamicin im Endost über vier Stunden in allen Proben. Die gemessenen ZOI sind ausreichend, sodass zu Beginn ein Bakterienwachstum in der unmittelbaren Implantatumgebung gehemmt und eine Biofilmbildung vermieden werden könnte. Dies wird durch die Ergebnisse in der Studie von Vester et al. (2010) gestützt. In dieser Studie wurde die Anhaftung bakterieller Keime an der Oberfläche der in dieser Arbeit verwendeten Titankirschnerdrähte über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden *in-vitro* untersucht. Eine Resistenzentwicklung wurde nicht festgestellt und eine bakterielle Besiedlung der Oberfläche durch *S. aureus* konnte reduziert werden. Die Resultate geben Hinweis auf eine

mögliche Hemmung einer Kolonisation mit Keimen auf der Beschichtung, die sich aufgrund einer kontaminierten Fraktur oder des chirurgischen Eingriffs entwickeln kann.

Die immunhistologische Markierung des Gentamicins und damit die histomorphometrische Auswertung ermöglichte die bildliche Darstellung der Wirkstoffverteilung im Nierengewebe und somit einen optischen Rückschluss auf die *in-vivo* Gentamicinverteilung. Durch den Herstellungsprozess der Schnittpräparate mussten manuell Gewebelücken und Nicht-Nierengewebe markiert werden, um in der Analyse nicht betrachtet zu werden und eine Berechnung der Gesamtnierenfläche zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine individuelle Festlegung der Farbwerte für die Bereiche, in denen Gentamicin sichtbar war und welche in die Berechnung mit einfließen sollten. Die genannten subjektiven Faktoren sollten in der Auswertung der Ergebnisse für nachfolgende Studien berücksichtigt werden, um diese optimal vergleichen zu können.

4.2 Diskussion von Ergebnissen

4.2.1 *In-vivo* Freisetzungskinetik

Entscheidend für die Beurteilung der *in-vivo* Freisetzungskinetik von Gentamicin ist die Kenntnis über das Herauslösen des Wirkstoffes aus der Beschichtung sowie dessen Verteilung und Anreicherung in den Geweben, wie Knochen und Nieren. In der Analyse wurden weiterhin die Biokompatibilität und die Degradation der Beschichtung von den Titankirschnerdrähten betrachtet.

Die Untersuchung des Knochengewebes mit direktem Kontakt zum Implantat ergab bei allen Proben für den Untersuchungszeitpunkt „eine Stunde“ einen positiven Gentamicinnachweis. Für den Messzeitpunkt „vier Stunden“ erfolgte nur noch bei zwei Tieren ein geringer positiver Nachweis. In allen nachfolgenden Zeitpunkten konnte kein Gentamicin detektiert werden. Eine weitere Analyse mittels HPLC war nicht möglich, da HPLC Messungen sehr empfindlich auf mögliche Verunreinigungen der Probe reagieren. Die untersuchten tierischen Proben entsprechend aufzureinigen, war nicht erfolgreich. Ein sofortiger Übergang des Antibiotikums in das Blutgefäßsystem und eine schnelle Verstoffwechselung könnten eine Ursache dafür sein, dass ab dem Messzeitpunkt von „vier Stunden“ kein Gentamicin mehr nachweisbar war. Dies ist vergleichbar mit dem „initial burst“ der *in-vitro* dargestellten Freisetzungskinetik (vgl. Punkt 4.2.2). Im Endost konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten ein Gentamicinnachweis erfolgen. Auffällig war jedoch eine fehlende Gentamicindetektion im Endost bei allen Tieren zum Untersuchungszeitpunkt von sieben Tagen. Eine mögliche Ursache könnte in einem Fehler in der Methodendurchführung liegen.

Bisher sind nur wenige Studien veröffentlicht, die sich mit einer *in-vivo* Analyse der Freisetzung von antibiotischen Stoffen im Knochen beschäftigen. In einer umfangreichen

Studie von Baro et al. (2002) wurde die *in-vivo* Freisetzung von Gentamicin untersucht. In dieser Studie wurden, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, die höchsten *in-vivo* Konzentrationen in den Bereichen des Knochens gemessen, die im direkten Kontakt mit dem Implantat standen. Dabei lag die nachgewiesene Wirkstoffmenge für über vier Wochen oberhalb der MHK gegenüber *S. aureus*. Im Gegensatz zu der Studie von Baro et al. waren in der vorliegenden Arbeit lediglich bis zum Zeitpunkt „vier Stunden“ im Knochen und bis zu einem Tag im Endost eine hohe Gentamicinkonzentration nachweisbar. Bei Baro et al. erfolgte der Gentamicinnachweis in den Femurknochen von Kaninchen anhand des Agar-Disc-Diffusionstest. In der vorliegenden Arbeit diente dieser ausschließlich dem Aktivitätsnachweis von Gentamicin. Die *in-vivo* getestete Beschichtungsformulierung bei Baro et al. bestand aus 80% Phosphat (25% Hydroxyapatit und 75% Tricalciumphosphat), 20% „Polylactide“ (PLA) (M (w), 30 kDa), 3,5% Gentamicinsulfat (GS) und PLA (M (w), 200 kDa). Unterschiede im zeitlichen Nachweis von Gentamicin könnten aufgrund eines unterschiedlichen Durchblutungssystems und einer individuellen Verstoffwechslung der verschiedenen Tiermodelle entstanden sein. Zudem könnten eine andere Beschichtungszusammensetzung und Nachweismethode ursächlich sein.

In der Studie von Adams et al. (1992) erfolgte die Analyse der *in-vivo* Freisetzungskinetik verschiedener Antibiotika aus Poly(Methyl-Methacrylat) - Kugeln im Knochengewebe 28 Tage nach Implantation. Die Wirkstoffquantifizierung wurde mit Hilfe eines Agar-Disc-Diffusionstest durchgeführt. Die Untersuchung der Wirkstoffkonzentration in dem umhüllenden Granulationsgewebe sowie im angrenzenden Knochengewebe erfolgte nur am Ende der Tierstudie zum Zeitpunkt „28 Tage“. Die gemessenen Konzentrationen waren unterschiedlich, je nach verwendetem Antibiotikum. Teilweise erfolgte für einige Antibiotika kein Nachweis im Knochen. Aufgrund eines anderen Trägerstoffes und der Verwendung anderer Antibiotika könnten die Wirkstoffnachweise im längeren Zeitverlauf in der Studie von Adams et al. zu erklären sein. Das würde bedeuten, dass die Art des Antibiotikums und des Trägerstoffes Einfluss auf die Freisetzungskinetik hat.

Ähnlich zu den Messungen der vorliegenden Arbeit war in der Studie von Vester et al. (2010) ebenfalls initial ein Maximum nach einer Stunde erreicht, gefolgt von einem anschließenden Abfall der nachweisbaren Gentamicinmenge im Knochengewebe bis zum Zeitpunkt „sieben Tage“. In dem *in-vivo* Teil der Studie wurde die Gentamicinkonzentration im Knochengewebe nach Einbringen beschichteter Marknägel (PDLLA plus 10% Gentamicin (w/w in PDLLA)) in die Tibia von Ratten untersucht. Die Beschichtungszusammensetzung entsprach der in dieser Arbeit verwendeten Implantate. Allerdings wurde dabei das Gentamicin quantitativ im gesamten Knochen bestimmt. Eine Differenzierung zwischen Endost und Knochengewebe erfolgte nicht. Weiterhin wurde weder die Verteilung, die Degradation der Implantatbeschichtung, noch die verbliebende Menge Gentamicin auf dem Implantat untersucht. Dennoch geben die ähnlichen Ergebnisse im Zeitverlauf Hinweis darauf, dass sich das *in-vivo* Freisetzungsverhalten von Gentamicin im Knochen gleicht und sich ein grundlegendes Muster in der Freisetzungskinetik abzeichnet. Dies wird u.a. durch die schnelle initiale Freisetzung innerhalb der ersten Stunde nach Implantation deutlich, welche sich auch in der vorliegenden Arbeit darstellt.

Hinsichtlich der klinischen Umsetzung kann mit dieser Implantatbeschichtung der Effekt einer anfänglich hohen lokalen Gewebekonzentration des Antibiotikums über einen kurzen Zeitraum erreicht werden. Das gewünschte Gentamicin-Freisetzungsprofil hängt von der Indikation des Arzneimittelabgabesystems ab. Die in dieser Arbeit verwendete Gentamicinbeschichtung ist so konzipiert, dass eine sofortige Arzneimittelfreisetzung gegeben ist, wodurch eine implantatassoziierte Infektion verhindert werden kann. Eine konstante und verlängerte Freisetzung wäre beispielsweise bei der Behandlung einer chronischen Osteomyelitis erforderlich, um die im Gewebe persistierenden Bakterien zu beseitigen. Diese langfristige Freisetzung mit einem aktiven Niveau über vier Monate wurde zum Beispiel durch den Einbau von Ciprofloxacin in osteokonduktive Pellets realisiert (Makinen et al., 2005). Jedoch zielte die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung eines solchen Systems nicht ab.

Das Wissen über das Freisetzungsprofil und die systemische Verteilung ist ein zentrales Thema für die Entwicklung und klinische Anwendung von „Drug – Delivery – Systemen“, um deren Wirksamkeit und Sicherheit zu gewährleisten. Abhängig von der verwendeten Dosis und der Applikationsform des Wirkstoffes Gentamicin können so Nebenwirkungen, wie Veränderungen des Verhaltens und Schädigung der Organe sowie Toxizität hervorgerufen werden. Bei einer Ratte ist das Auftreten einer akuten letalen Wirkung durch intravenöse Applikation bereits bei einer LD_{50} von 37 – 67 mg/kg, im Vergleich zu anderen Verabreichungsformen (i.m.: LD_{50} 200 – 890 mg/kg; oral: LD_{50} 1000 - 8000 mg/kg), gegeben. Aufgrund der geringen Wirkstoffmenge in dem verwendeten Beschichtungssystem dieser Arbeit (64 µg Gentamicinbasis pro Draht, zwei Drähte pro Ratte, etwa 420 µg / kg pro Ratte) waren keine toxischen Wirkungen sowie keine nachweisbaren Serumspiegel zu erwarten. Das aus der Beschichtung freigesetzte Gentamicin wird auf hämatogenem Weg in die Niere transportiert und dort anschließend durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Die verwendete Gentamicinmenge in der Beschichtung, wie bereits oben erwähnt, lag deutlich unterhalb einer nephrotoxischen Konzentration für Ratten (80 mg/ kg) (Suzuki et al., 1995). Daher wurden keine negativen Auswirkungen auf die Nierenfunktion oder das Nierengewebe in Folge des Wirkstoffabbaus, durch die in die Titankirschnerdrahtbeschichtung eingearbeitete Menge Gentamicin, erwartet. Zum Ausschluss einer toxischen Wirkung durch das Gentamicin wurden die Nieren mittels HE-Färbung untersucht. Eine histologische Gewebeveränderung konnte mikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Die immunhistologische Markierung des Antikörpers gegen Gentamicin im Nierengewebe wurde für diese Arbeit neu etabliert. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Die Färbung ermöglichte eine visuelle rötliche Darstellung von Gentamicin und anschließend dessen Quantifizierung im Gesamtzeitraum von 42 Tagen. Eine immunhistologische Markierung des Wirkstoffes war zu allen Messzeitpunkten möglich. Daher ist davon auszugehen, dass im gesamten Untersuchungszeitraum Gentamicin im Tier vorhanden war und über die Niere ausgeschieden wurde. Eine deutlich ausgeprägte rötliche Darstellung des Gentamicins in der Nierenrinde stellte sich zu den ersten drei

Messzeitpunkten (eine Stunde bis einen Tag) dar und lässt auf eine hohe Gentamicinkonzentration schließen. Sowohl die Konzentrationsmessung mittels KIMS, als auch die immunhistologische Färbung zeigten ebenfalls einen hohen Gentamicinnachweis zu den ersten Analysezeitpunkten und einen anschließend geringen Nachweis im Zeitverlauf. Weiterhin konnte auch im Endostgewebe zu den ersten Messzeitpunkten eine hohe Gentamicinkonzentration nachgewiesen werden. Das lässt sowohl auf eine zügige Freisetzung des Wirkstoffes aus der Beschichtung, als auch auf eine anschließende schnelle renale Ausscheidung des Wirkstoffes schließen. Zu den nachfolgenden Messzeitpunkten (drei Tage bis 42 Tage) zeigte sich in der Immunhistologie eine Abnahme der Farbintensität. Diese korreliert mit den *in-vivo* Analysen aus den anderen entnommenen Proben und der darin nachgewiesenen abnehmenden Gentamicinmenge im Zeitverlauf. Nach immunhistologischer Markierung des Gentamicins war es indirekt möglich den Flächenanteil des Gentamicins innerhalb der Niere zu ermitteln. Zu allen Zeitpunkten konnte eine Berechnung der Gesamtgentamicinfläche aus den Nierengewebsschnitten erfolgen. In allen Präparaten wurde hauptsächlich im Bereich des *Cortex renalis* eine immunhistologische Färbung nachgewiesen. In der *Medulla renalis* konnte keine oder höchstens eine sehr schwache rötliche Färbung gefunden werden. Somit war der prozentuale Flächenanteil des dargestellten Gentamicins sehr niedrig im Vergleich zur Gesamtfläche der Niere. Dies ist anatomisch durch die verhältnismäßig geringe Fläche der Nierenrinde zu erklären, in der sich der Wirkstoff hauptsächlich ansammelte. Dies bestätigt eine physiologische Akkumulation des Gentamicins durch aktiven Transport in den proximalen Tubuluszellen der Nierenrinde. Auch in der Studie von Baro et al. (2002) konnte eine Akkumulation des Wirkstoffes Gentamicin, ohne Beeinträchtigung der renalen Funktion, im Nierengewebe beobachtet werden. Trotz abnehmender Farbintensität im Zeitverlauf konnte in einem Präparat auch nach sieben Tagen eine intensive rote Markierung in der Nierenrinde nachgewiesen werden. Dies stellte sich ebenfalls in der Flächenberechnung mit einem Peak zum Zeitpunkt „sieben Tage“ dar. Auch mittels KIMS erfolgte an „Tag sieben“ ein positiver Gentamicinnachweis. Es gibt keine eindeutige Erklärung der starken rötlichen Markierung im Vergleich zu den anderen Tieren der Gruppe. Ursächlich könnte ein individuell langsamerer Abbauprozess des Wirkstoffes im Nierengewebe des Tieres im Gegensatz zu den restlichen Ratten aus der Gruppe, sein. Der Gentamicinnachweis im Nierengewebe, wie er durch die Quantifizierung und Immunhistochemie ermittelt wurde, ist als Ergebnis der physiologischen Clearance von Gentamicin über den Urin anzusehen. In der Studie von Webb et al. (2013) wurde bei Patienten mit gentamicinbeschichteten Hüftgelenksprothesen die *in-vivo* Gentamicinkonzentration postoperativ im Urin gemessen. Bis zu 71 Tagen konnte ein Nachweis von Gentamicin im Urin erfolgen. Dies bestätigt, dass die lokal freigesetzte Menge an Gentamicin aus der Beschichtung anschließend über den Urin ausgeschieden wird. Eine Untersuchung des Urins ist in dieser Arbeit nicht erfolgt. Somit konnte eine Konzentrationsbestimmung des ausgeschiedenen Gentamicins nicht erfolgen, wodurch ein Rückschluss auf die Gentamicinmenge in den analysierten Proben nicht möglich war. Für

nachfolgende Studien würde die Analyse der Gentamicinkonzentration im Harn eine sinnvolle Ergänzung bezüglich der *in-vivo* Freisetzung des Wirkstoffes darstellen.

Neben der Verträglichkeit des antibiotischen Wirkstoffes stellt die Biokompatibilität eine weitere wichtige Anforderung an das „Drug – Delivery – System“ dar, um Immunreaktionen und weitere mögliche Nebenwirkungen einzuschränken. Da das Polymer nach Degradation im Körper vollständig durch Hydrolyse abgebaut wird, können die Gefahren systemischer oder lokaler Nebenwirkungen vermindert werden und eine Persistenz potenziell schädlicher Metaboliten ausbleiben. Es ist jedoch bekannt, dass bei der Anwendung von Poly-laktiden Fremdkörperreaktionen, wie Entzündungsreaktionen und Osteolysen, auftreten können (Bostman et al., 1990; Bostman, 1992; Hutmacher et al., 1996; Laurencin et al., 1993; Weiler et al., 1996; Wildemann et al., 2005). Diese können die Integration des Implantates negativ beeinflussen (Suganuma & Alexander, 1993). In den Röntgenaufnahmen dieser Arbeit ließen sich keine makroskopisch sichtbaren destruktiven Reaktionen darstellen. Dies spricht dafür, dass die Beschichtung keinen negativen Effekt auf den Knochen ausübte und eine gute Biointegrität aufwies. Eine Studie von Fassbender et al. (2013), die die Wirkung von lokal freigesetztem Gentamicin aus der in dieser Arbeit verwendeten Polymerbeschichtung untersuchte, zeigte ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf den Knochenheilungsprozess. Damit werden die radiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Darüber hinaus bestätigen verschiedene Studienergebnisse eine hohe Biokompatibilität für die verfügbare Poly(D,L-Laktid)-Oberflächenbeschichtung (Gollwitzer et al., 2005; Schmidmaier & Raschke, 2001; Wildemann et al., 2004; Wildemann et al., 2005). Diese findet bereits in der Klinik auf dem Expert Tibianagel PROtect der Firma Synthes® Verwendung. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass sich die Gefahr von Fremdkörperreaktionen mit der Menge des in das Gewebe gelegten Polymers erhöhte (Bostman & Pihlajamaki, 2000). So könnte die sehr dünne Schichtdicke von nur zehn Mikrometern für eine gute Biokompatibilität der verwendeten Beschichtung sprechen.

Für den klinischen Einsatz ist die Stabilität der Beschichtung bei Einbringen der Implantate ein entscheidender Faktor. Die verwendete Beschichtung zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität und Robustheit aus. Diese wurden in Testungen des PDLLA-Abriebs bestätigt, in denen durchschnittlich über 96% der Polylactidbeschichtung fest an das Implantat gebunden blieben (Gollwitzer et al., 2005; Gollwitzer H., 2002; Schmidmaier et al., 2001b). Somit ist davon auszugehen, dass ein möglicher Abrieb der Beschichtung bei Einbringen des Implantates nicht ursächlich für die nachgewiesene geringe Gentamicinmenge im Knochen- und Endostgewebe sowie auf der Implantatoberfläche war. Für eine weitere Untersuchung der Degradation des Trägerstoffes PDLLA und des Wirkstoffes Gentamicin diente die bildliche Darstellung der Implantatbeschichtung mittels REM. Es wurde ein Titankirschnerdraht untersucht, der steril aus der Transportverpackung entnommen wurde. Zudem wurden Drähte aus der *in-vitro* Elution zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet (vgl. 4.2.2). Nach der Entnahme des Drahtes aus der Transportverpackung waren makroskopisch keine Unregelmäßigkeiten auf der Beschichtungsoberfläche zu erkennen. Die Titanoberfläche des originalverpackten

Implantats war jedoch im REM teilweise deutlich zu erkennen und wies auf eine Ablösung der Beschichtung hin. Da die in der *in-vitro* Elution verwendeten Titankirschnerdrähte eine rund 80%-ige Freisetzung von Gentamicin aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die im REM dargestellte Ablösung der Beschichtung zu vernachlässigen ist. Eine mögliche Ursache für die abgeblätterte Beschichtung könnte eine Beschädigung im Rahmen der Probenaufbereitung und des Transports für die bildliche Darstellung im REM gewesen sein. Weiterhin wurden Drähte nach *in-vivo* Verbleib mit anschließendem Ausschütteln elektronenmikroskopisch untersucht. Es war keine Beschichtung mehr zu erkennen, da bereits durch die Bearbeitung des Implantates für die Gentamicinquantifizierung die gesamte Beschichtung abgelöst wurde. Daher ist davon auszugehen, dass die am Implantat verbliebenen Restmengen von Gentamicin in der Ausschüttelflüssigkeit vollständig gelöst wurden und quantifiziert werden konnten.

Die gesamte Menge des eingearbeiteten Wirkstoffes aus der Beschichtung konnte nicht vollständig nachgewiesen werden (vgl. 3.11). Mögliche Ursachen könnten eine hohe initiale Verstoffwechslung des Gentamicins sein. Jedoch wurde in dieser Arbeit für eine genauere Gentamicinbestimmung die renale Exkretionsrate nicht gemessen. Weiterhin könnte die Implantatumgebung Einfluss auf das *in-vivo* Freisetzungverhalten haben, wie z.B. die Anwesenheit von endogenen Produkten, wie freie Radikale, Säureprodukte oder Enzyme, die von den am Knochenregenerationsprozess beteiligten Zellen produziert werden (Liu et al., 2000; Tracy et al., 1999). Eine Beeinträchtigung der Antibiotikaaktivität und der Knochenheilung bei der Freisetzung von sauren Abbauprodukten des PDLLA könnten auftreten. Eine damit einhergehende Verringerung des pH-Wertes, auch bedingt durch ein anderes Puffersystem, ist möglich (Jiang et al., 2002). Der Effekt einer pH-Verschiebung in der sehr frühen inflammatorischen Phase der Heilung ist bekannt und sollte bei *in-vivo* Analysen berücksichtigt werden (Kolar et al., 2010). Denkbar wäre ebenfalls, vergleichbar mit der Studie von Baro et al. (2002), dass die *in-vivo* Gentamicinfreisetzung aus der Beschichtung nicht nur auf einen stärkeren *in-vivo* Abbau des Polymers zurückzuführen ist, sondern auch durch eine intrainplantäre Vaskularisierung verstärkt wird.

4.2.2 *In-vitro* Freisetzungskinetik

Das Wissen über das Freisetzungsprofil eines antiinfektiven Stoffes aus einer Implantatbeschichtung *in-vitro*, bietet unter kontrollierten Laborbedingungen eine optimale Vergleichsmöglichkeit von Ergebnissen aus anderen *in-vitro* Studien. Weiterhin sind *in-vitro* Analysen unbeeinflusst von Wechselwirkungen im lebenden Organismus. Durch Solche Versuche ist es u.a. möglich, mit einer hohen Probenmenge innerhalb eines kurzen Zeitraumes Ergebnisse zu erhalten. *In-vitro* Studien stellen eine unerlässliche Grundlage für weiterführende *in-vivo* Studien dar. Es ist unerlässlich, die Dynamik der antibiotischen Freisetzung aus der Beschichtung zu kennen, um eine antimikrobielle Wirksamkeit zu erzielen und somit den klinischen Einsatz zu ermöglichen.

Die *in-vitro* Freisetzungskinetik der Wirksubstanz Gentamicin aus der Titankirschnerdrahtbeschichtung wurde sowohl in einer Kurzzeitelution, als auch in einer Langzeitelution untersucht. Die initiale Freisetzung zeigte einen sofortigen Anstieg innerhalb der ersten 60 Minuten. Die Langzeitelution wies ebenfalls einen initial raschen sowie nachfolgend gleichmäßigen Anstieg und eine kontinuierliche Freisetzung von annähernd 80% bis zum Untersuchungszeitpunkt "42 Tage" auf. Die Durchführung der *in-vitro* Elution erfolgte auf Grundlage des erarbeiteten Methodenprotokolls aus der eigenen Arbeitsgruppe (Strobel et al., 2011c). Die *in-vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine ähnliche Freisetzungskinetik des Wirkstoffes wie bei Strobel et al. In der genannten Studie wurde ebenso eine sofortige initiale Freisetzung von einfach PDLLA plus 10% Gentamicin (w/w in PDLLA) beschichteten Marknägeln nach vier bis 24 Stunden festgestellt. Anschließend erfolgte eine kontinuierliche und konstante Freisetzung über einen Zeitraum von fünf Wochen. Das Freisetzungsverhalten des eingearbeiteten Wirkstoffes Gentamicin wurde in weiteren Studien eingehend *in-vitro* untersucht (Gollwitzer H., 2002; Lucke et al., 2000; Strobel et al., 2011a; Strobel et al., 2011c). Auch hier wurde gezeigt, dass bereits innerhalb der ersten Minuten bis zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden ein Großteil der Beschichtung freigesetzt wurde und eine anschließend kontinuierliche Wirkstoffabgabe erfolgte.

Die Freisetzung des Wirkstoffes Gentamicin aus dem Polymer wird durch mehrere Mechanismen, wie Diffusion, Schwellung, Degradation und Erosion gesteuert (Göpferich, 1998; Siepmann & Göpferich, 2001). Die verwendete Polymermatrix in dieser Arbeit ist etwa zehn Mikrometer dünn gewesen. Daher ist anzunehmen, dass die Wirkstofffreisetzung zum großen Teil durch Diffusion erfolgt. Dies kann durch die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften des Polymers (hydrophob) und des Wirkstoffes Gentamicin (hydrophil) begünstigt werden. So erfolgt in wässriger Umgebung eine schnelle Diffusion der hydrophilen, oberflächennah liegenden und nur geringfügig eingebauten Gentamicinpartikel. Ursächlich sind die sehr kurze Diffusionsstrecke und der unmittelbare Kontakt des Wirkstoffes mit der wässrigen Umgebung. Dies zeigte sich in der schnellen initialen *in-vitro* Freisetzung des Wirkstoffes aus der Beschichtung innerhalb der ersten Stunde. Zeitgleich entstehen in der hydrophoben Matrix Poren, Mikrokanälchen- und Risse durch hydrolytische Spaltung der Polymerverbindungen. Dadurch kann ein Aufquellen und eine langsame Degradation des Polymers erzeugt werden, welche zu einer protrahierten Freisetzung des in der Tiefe inkorporierten Wirkstoffes führt. Deutlich wurde dies in der konstanten *in-vitro* Freisetzung über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die morphologische Darstellung der Beschichtungen im REM nach *in-vitro* Verbleib von einer Stunde und 98 Tagen zeigte durch den fortschreitenden Degradationsprozess auf der Titanoberfläche verschiedene Dicken und Strukturübergänge. In der Studie von Strobel et al. (2011c) ergaben sich in Abhängigkeit der verwendeten Polymerkonzentration und des eingearbeiteten Wirkstoffes Gentamicin unterschiedliche Freisetzungskinetiken über einen Zeitraum von fünf Wochen. Dickere Schichten zeigten eine längere Freisetzung des Wirkstoffes, aufgrund des unterschiedlichen Oberflächen-Material-Verhältnisses. Ursächlich war eine tiefere Einbettung der Wirkstoffpartikel. War die Menge der eingearbeiteten Partikel sehr hoch, erfolgte eine zügigere Freisetzung. Die schnelle

Freisetzung des Wirkstoffes aus der dünnen Beschichtung der verwendeten Titankirschnerdrähte der vorliegenden Arbeit stimmt überein mit den Ergebnissen der beschriebenen zügigen Freisetzung in der Studie von Strobel et al.

4.2.3 Vergleich der *in-vivo* und *in-vitro* Freisetzung

Vergleicht man die *in-vitro* und die *in-vivo* freigesetzten Gentamicinmengen (vgl. Abb. 30), wurde die maximale Menge in beiden Freisetzungsmethoden zum ersten Zeitpunkt „eine Stunde“ nach Implantation ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt konnte Gentamicin in allen analysierten Geweben und im Eluat der aufbereiteten Drähte nachgewiesen werden. Somit bestätigen die *in-vivo* Ergebnisse die *in-vitro* „initial-Burst-Freisetzung“ von Gentamicin aus der Implantatbeschichtung.

In der Studie von Koort et al. (2006) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Lösungsverhalten eines lokal freigesetzten Antibiotikums *in-vitro* und *in-vivo* ähnlich ist. Für die Untersuchung des Freisetzungspfils erfolgten *in-vitro* und *in-vivo* Analysen von zylindrischen Compositpellets, bestehend aus einer Poly(D,L-Laktid) – Matrix und dem integrierten Wirkstoff Ciprofloxacin. Es konnte eine zweiphasige Wirkstofffreisetzung sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* bestimmt werden. *In-vitro* konnte nach einer anfänglichen initialen Freisetzung innerhalb der ersten Stunden ein zweiter Peak zwischen den Zeiträumen von 100 und 150 Tagen, aufgrund des Abbaus des Polymers, nachgewiesen werden. Diese zweiphasige Freisetzung wurde im Serum nach der Implantation von hohen Mengen (1000 mg) an Ciprofloxacin beladenem PDLLA in beiden Tibiae bestätigt. In der Studie von Adams et al. (1992) war ebenfalls, wie in der vorliegenden Arbeit, jedes antibiotische *in-vivo* Freisetzungprofil mit seinem jeweiligen *in-vitro* Profil vergleichbar. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass die gemessenen Wirkstoffkonzentrationen *in-vivo* und *in-vitro* nicht direkt vergleichbar sind. Als ursächlich wurden die unterschiedlichen Mengen an Probenmaterial und Serum angeführt. *In-vitro* erfolgte die Durchführung mit einer PMMA-Kugel in einem Milliliter Serum und *in-vivo* mit fünf PMMA-Kugeln in einer unbekanntem Menge Serum, welche über die Zeit variieren kann. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich Unterschiede in der Menge der *in-vitro* und *in-vivo* nachgewiesenen Gentamicinkonzentrationen. Dies ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Bei der *in-vitro* Analyse handelt es sich um ein geschlossenes, kontrolliertes System unter Laborbedingungen mit wenigen Einflussfaktoren. Hingegen nehmen verschiedenste Faktoren, wie die unterschiedlichen analysierten Gewebe, Aufarbeitungs- und Messmethoden sowie der Wirkstoffabbau und die Wirkstoffausscheidung Einfluss auf die *in-vivo* Analyse. Eine Berechnung bezüglich des gesamten *in-vivo* freigesetzten Gentamicins war nicht möglich, da die renale Ausscheidung des Gentamicins in dieser Arbeit nicht analysiert wurde. Hinsichtlich der gering nachgewiesenen Gentamicinkonzentration, von nur sechs Mikrogramm bei einer Gesamtbeschichtungsmenge von 64 µg, könnte eine schnelle Verstoffwechslung und die kurze Halbwertszeit des antibiotischen Wirkstoffes von zwei Stunden ursächlich sein (Löscher, 2014). Weiterhin könnten eine zeitlich erhöhte *in-vivo* Degradation des Trägerstoffes PDLLA im Gegensatz zu der *in-vitro* Freisetzung sowie eine

gesteigerte Ausbildung von Gefäßnetzen in der Implantatumgebung und der Neubildung von Knochengewebe ebenfalls eine Rolle spielen (Baro et al., 2002). Die Produktion endogener Zellprodukte, wie freie Radikale oder Enzyme, von denen am Knochenregenerationsprozess beteiligten Zellen, als auch eine lokale Veränderung der Temperatur und des pH-Wertes könnten Einfluss auf die Degradation der Beschichtung *in-vivo* haben (Liu et al., 2000; Tracy et al., 1999).

4.3 Fazit

Knocheninfektionen stellen eine schwerwiegende Komplikation nach Frakturversorgung dar. Der „Expert Tibial Nail PROtect“ ergänzt die Versorgung tibialer Frakturen mit einer resorbierbaren antibiotischen Beschichtung. Diese bietet Hochrisikopatienten einen effizienten Schutz vor einer bakteriellen Besiedlung der Implantatoberfläche.

In dieser Studie erfolgte die Analyse der *in-vivo* Freisetzungskinetik von Gentamicin aus einer PDLLA-Implantatbeschichtung durch dessen Quantifizierung im umliegenden Knochengewebe, im Nierengewebe und im Serum. Zusätzlich wurde die Wirkstoffverteilung in der Niere untersucht. Durch den Nachweis von Gentamicin zu den ersten Zeitpunkten im Knochengewebe mit der Methode KIMS und im Nierengewebe mittels immunhistologischer Färbung und KIMS, konnte eine Freisetzung des Wirkstoffes *in-vivo* gezeigt werden. Eine Verteilung des Gentamicins im Serum konnte zu allen Zeitpunkten mit KIMS nachgewiesen werden. Die Aktivität des freigesetzten Gentamicins aus dem Endost wurde durch eine deutliche Hemmhofbildung zu den frühen Zeitpunkten mikrobiologisch bestätigt. Es lässt sich somit feststellen, dass ein hoher lokaler antibiotischer Schutz aufgrund der initialen Freisetzung des Wirkstoffes über den kritischen Zeitpunkt eines operativen Eingriffes hinweg gewährleistet ist. Demzufolge stellen die gentamicinbeschichteten Titankirschnerdrähte eine wichtige Komponente im Sinne der perioperativen Antibiose dar. Somit könnte durch diese frühe Gentamicinaktivität in der direkten Implantatumgebung eine bakterielle Oberflächenbesiedlung gehemmt, die Ausbildung eines Biofilmes verhindert und ein langfristiger Erfolg im Sinne einer Heilung ermöglicht werden. Dadurch könnte eine Infektprophylaxe erzielt und das Auftreten von systemischen Nebenwirkungen vermindert werden (Campoccia et al., 2010). Bei systemischer Wirkstoffapplikation besteht aufgrund einer gestörter Vaskularisierung des Knochengewebes das Risiko, dass der Wirkort möglicherweise nicht erreicht werden kann (Blaha, 1993; Gristina & Costerton, 1985; Gristina et al., 1985). Die lokale antiinfektive Beschichtung stellt eine sinnvolle und hoch relevante Ergänzung zur systemischen Therapie dar und kann dazu beitragen sowohl prophylaktisch, als auch therapeutisch, Komplikationen zu verhindern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation tragen zum Verständnis der Freisetzungskinetik des in die Polymerbeschichtung eingearbeiteten Wirkstoffes Gentamicin im Organismus bei und sollen der weiteren Forschung der lokalen Therapie implantatassoziiierter Infektionen dienen.

Im Zusammenhang mit bisherigen Studien (Fuchs et al., 2011; Metsemakers et al., 2015; Raschke et al., 2010) und der klinischen Zulassung des intramedullären Nagels in Kombination mit einer antibiotischen Beschichtung, erweitert diese Arbeit das Wissen zur lokalen Infektprophylaxe. Klinische Studien müssen nun die Wirksamkeit, Verträglichkeit und Effektivität zeigen, wodurch auch selten auftretende Nebenwirkungen oder Interaktionen mit anderen Medikamenten erfasst werden können.

5 Zusammenfassung

***In - vivo* Quantifikation der Gentamicinfreisetzung aus einer Implantatbeschichtung im Rattenmodell**

Die intramedulläre Osteosynthese der Tibia mit einem Marknagel ist eine häufig angewandte Methode zur Frakturstabilisierung bei unfallchirurgischen Operationen. Jedes Material, welches in den Körper implantiert wird, stellt jedoch ein erhöhtes Risiko für eine bakterielle Oberflächenbesiedlung dar (Gristina et al., 1988). Dies begünstigt die Entstehung von tiefen Wundinfektionen (Jansen & Peters, 1993). Implantatassoziierte Infektionen gehören noch immer zu den schwerwiegendsten Komplikationen bei der Frakturversorgung. Mithilfe einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung lassen sich Wirkstoffe zur kontrollierten Freigabe in einen polymeren Trägerstoff einarbeiten (Lucke et al., 2003). Das Implantat kann dadurch als sogenanntes „Drug-Delivery-System“ fungieren (Fuchs et al., 2011). Mit Hilfe eines solchen Systems kann eine lokale antibiotische Wirkung im Frakturgebiet erzielt werden, wodurch das Risiko einer bakteriellen Kolonisation reduziert wird (Lucke et al., 2003). Darüber hinaus lassen sich mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen einer systemischen antibiotischen Applikation durch eine lokale antibiotische Therapie einschränken.

Die vorliegende Arbeit umfasst eine detaillierte *in-vitro* und *in-vivo* Analyse der Wirkstofffreisetzung bzw. –anreicherung des in die Polymerbeschichtung Poly(D,L-Laktid) eines Titankirschnerdrahtes eingearbeiteten antibiotischen Wirkstoffs Gentamicin. Für die *in-vivo* Studie wurden gentamicinbeschichtete Titankirschnerdrähte in den Tibiamarkraum von Ratten implantiert und nach verschiedenen Zeitpunkten, über eine Dauer von 42 Tagen, entnommen. Zur Darstellung der *in-vivo* Freisetzungskinetik erfolgte eine Quantifizierung der Gentamicinkonzentration auf dem Implantat, im Knochen, im Endost, in der Niere sowie im Serum der Ratten. Weiterhin erfolgten röntgenologische, histologische und immunhistologische Analysen, die es ermöglichten Kenntnis über die Verteilung und Anreicherung von Gentamicin in den oben genannten Geweben zu erlangen.

Die Freisetzungskinetik des lokal verabreichten antibiotischen Wirkstoffs Gentamicin zeigte *in-vitro* und *in-vivo* einen ähnlichen Verlauf. Sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* erfolgte ein initialer Anstieg der Gentamicinfreisetzung. Zum Untersuchungszeitpunkt „eine Stunde“ nach Implantation der Titankirschnerdrähte konnten die höchsten Gentamicinkonzentrationen in allen analysierten Geweben und auf den Titankirschnerdrähten ermittelt werden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum von einer Stunde bis 42 Tage konnte der Wirkstoff Gentamicin im Endost nachgewiesen werden, wobei bis zum Zeitpunkt „vier Stunden“ nach Implantation der Titankirschnerdrähte eine antimikrobiell wirksame Gentamicinkonzentration erreicht wurde. Die radiologische Untersuchung der Tibia zeigte keine Anzeichen einer destruktiven Veränderung des Knochens durch das Implantat und dessen Beschichtung. Dies weist auf eine gute Biointegrität von Implantat und Beschichtung hin. Die immunhistochemische Färbung mit

der Avidin- Biotin- Complex- Methode zeigte eine Akkumulation des Gentamicins im Bereich der Nierenrinde, was vermutlich auf die renale Elimination des Wirkstoffes zurückzuführen ist. Das zum Ausschluss einer Toxizität des aus der Polymerbeschichtung freigesetzten Gentamicins histologisch untersuchte Nierengewebe, zeigte keine Anzeichen entzündlicher oder nekrotischer Prozesse. Da die renale Exkretionsrate im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt wurde, erfolgte keine Berechnung der absoluten *in-vivo* freigesetzten Gentamicinkonzentration. Die Kombination der verschiedenen Methoden zur Quantifizierung und Darstellung von Gentamicin in den Geweben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, erlauben es, Informationen über die Akkumulation und die Aktivität des lokal freigesetzten Antibiotikums über den gesamten Untersuchungszeitraum zu sammeln. Aufgrund der beschriebenen Gefahr der Ausbildung einer bakteriellen Infektion infolge einer Tibiafraktur, als auch nach Frakturstabilisierung, ist eine schnellstmögliche lokale antibiotische Aktivität notwendig.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch den Einsatz von Poly(D,L- Laktid) beschichteten Titankirschnerdrähten, mit dem inkorporierten Wirkstoff Gentamicin, in den ersten vier Stunden postoperativ antimikrobiell wirksame Gentamicinkonzentrationen im Operationsgebiet erreicht werden können. Ferner wurden radiologisch sowie histologisch keine Anzeichen unerwünschter Arzneimittelwirkungen des Gentamicins in den untersuchten Geweben nachgewiesen. Mit Poly(D,L- Laktid) und Gentamicin beschichtete Osteosynthesematerialien scheinen somit für eine perioperative Antibiotikaphylaxe, gegebenenfalls ergänzend zu einer systemischen Antibiotikatherapie, geeignet zu sein.

6 Summary

***In-vivo* quantification of gentamicin released from an implant coating**

The intramedullary osteosynthesis of the tibia with a mark nail is a frequently used method for the stabilization of fractures in accident surgery. However, any material implanted in the body presents an increased risk of bacterial surface colonization (Gristina et al., 1988). This promotes the development of deep wound infections (Jansen & Peters, 1993). Implant-associated infections are still one of the most serious complications in fracture care. Using a biodegradable implant coating, active substances can be incorporated into a polymer carrier material for controlled release (Wildemann et al., 2004). The implant can thus function as a so called "drug delivery system" (Fuchs et al., 2011). By means of these systems, a local antimicrobial effect in the fracture area can be achieved, thus reducing the risk of bacterial colonization (Lucke et al., 2003). In addition, adverse drug effects of a systemic drug administration can be limited by using a local antibiotic therapy.

The present work comprises detailed *in-vitro* and *in-vivo* analysis of the drug release and enrichment of the antibiotic agent gentamicin incorporated into the polymer coating poly(D, L- lactide). In the *in-vivo* study, gentamicin coated titanium wires were implanted in the tibiae of rats and removed at various time points for a period up to 42 days post implantation. For investigation of the *in-vivo* release kinetics, the gentamicin concentration was quantified on the explanted wires, in the bone, in the endosteum, in the kidney and in the serum of the rats. Furthermore, radiographic, histological and immunohistological analyses were performed, enabling to gain further information about the distribution and accumulation of gentamicin in the above mentioned tissues. The release kinetics of the locally administered antimicrobial agent gentamicin in the *in-vitro* and *in-vivo* studies were comparable. *In-vitro* as well as *in-vivo*, an initial increase in the release of gentamicin could be observed. The highest gentamicin concentrations could be measured at the time point "one hour" after implantation of the titanium wires in all analysed tissues and on the titanium wires. During the entire period from one hour to 42 days post implantation, the agent gentamicin could be detected in the endosteum. At the time point "four hours" after implantation of the titanium wires, an antimicrobial effective gentamicin concentration could be detected. No signs of destructive alterations in the bone tissue due to the implant or its coating could be observed by means of radiological investigation of the tibia, indicating a good bio-integrity of implant and polymer coating. Immunohistochemical staining using the avidin- biotin complex method revealed an accumulation of gentamicin in the area of the renal cortex, presumably due to the renal elimination of the drug. The histological investigation of the kidney tissue, performed to exclude a toxic effect of the released gentamicin, did not show any signs of inflammatory or necrotic processes. Since the renal excretion rate has not been determined in the present work, the absolute amount of the *in-vivo* released gentamicin could not be calculated.

The combination of the different methods for the quantification and visualization of gentamicin in the tissues used in this work, allows to gain information about the accumulation and the activity of the locally released antimicrobial agent during the entire study period. Due to the risk of bacterial infection in open tibia fractures and following fracture stabilization, a local antibiotic activity as soon as possible is necessary. The results of this study show that the use of poly(D, L-lactide) coated titanium wires with the incorporated agent gentamicin enables the establishment of antimicrobial effective gentamicin concentrations at the operation site within the first four hours after implantation. Furthermore, no signs of adverse effects of the gentamicin in the examined tissues could be observed by means of the applied radiological and histological methods. Poly (D,L-actide) and gentamicin coated osteosynthesis materials may thus be suitable for perioperative antibiotic prophylaxis, if necessary in addition to a systemic antibiotic therapy.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: AO Klassifikation der Tibiaschaftfraktur.....	2
Abb. 2: Schematische Biofilmbildung auf der Oberfläche von chirurgischen Implantaten	8
Abb. 3: Darstellung eines Titankirschnerdrahtes nach der Entnahme aus der Transportverpackung.	16
Abb. 4: chirurgische Implantation des Titankirschnerdrahtes in die Tibia.....	19
Abb. 5: schematische Darstellung der Position des Titankirschnerdrahtes im Tibiamarkraum	21
Abb. 6: Freilegung des Implantats mittels Diamantscheibentrenner	22
Abb. 7: Ausschüttelvorgang der Marknägel unter der Verwendung von Butylacetat und HCl mit deutlicher Ausbildung zweier Phasen für die Gentamicinbestimmung	24
Abb. 8: Messprinzip KIMS	26
Abb. 9: initiale Elution <i>in-vitro</i> bis 60 Minuten	34
Abb. 10: Langzeitelution <i>in-vitro</i> bis 42 Tage.....	35
Abb. 11: exemplarische Darstellung der Röntgenaufnahmen der jeweils rechten Tibiae in der laterolateralen Ebene.....	37
Abb. 12: Gentamicinkonzentration im Endost ($\mu\text{g/g}$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) zu den verschiedenen Zeitpunkten	38
Abb. 13: Gentamicinkonzentrationmessung via HPLC auf den Implantaten ($\mu\text{g/ml}$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) nach Entnahme aus der Tibia und anschließendem Ausschütteln zu den verschiedenen Zeitpunkten	39
Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der beschichteten Spitze eines sterilen Implantats (1 mm \emptyset) nach Produktion	40

Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Implantate (1 mm Ø) nach Elution „eine Stunde“ bis „98 Tage“	41
Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Implantatspitze (1 mm Ø) nach <i>in-vivo</i> Verbleib „42 Tage“ und anschließendem Ausschütteln.....	42
Abb. 17: Ermittelte Gentamicinkonzentration einer Niere ($\mu\text{g/g}$; MW \pm SD) zu den verschiedenen Zeitpunkten	43
Abb. 18: exemplarische histologische Darstellung des Nierenparenchyms im Bereich des <i>Cortex renalis</i> im Zeitverlauf (HE-Färbung)	44
Abb. 19: Niere im Parasagittalschnitt ohne Behandlung mit Gentamicin	45
Abb. 20: Darstellung des Nierenparenchyms im Bereich des <i>Cortex renalis</i> nach immunhistologischer Markierung im Vergleich mit und ohne Gentamicinbehandlung	45
Abb. 21: Darstellung der Gentamicinsignalstärke im <i>Cortex renalis</i> nach immunhistologischer Markierung.....	46
Abb. 22: immunhistologische Markierung von Gentamicin im <i>Cortex renalis</i> im Zeitverlauf	47
Abb. 23: Detailaufnahme der immunhistologischen Markierung von Gentamicin im Nierenparenchym im Bereich des <i>Cortex renalis</i>	48
Abb. 24: exemplarische Darstellung des Nierenparenchyms nach immunhistologischer Färbung zu den Zeitpunkten mit starkem rotem Signal	49
Abb. 25: exemplarische Darstellung des Nierenparenchyms nach immunhistologischer Färbung zu den Zeitpunkten mit schwachem rotem Signal.....	50
Abb. 26: exemplarische Detailaufnahme der immunhistologischen Färbung mit starkem rotem Signal im <i>Cortex renalis</i>	51
Abb. 27: ermittelter gentamicinpositiver Flächenanteil (%) in Bezug zur Gesamtnierenfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten	52

Abb. 28: ermittelte Gentamicinkonzentration im Serum ($\mu\text{g/ml}$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) zu den
verschiedenen Zeitpunkten53

Abb. 29: Darstellung der Mittelwerte ($\text{MW} \pm \text{SD}$) der Inhibitionszone (ZOI) im
Endostgewebe54

Abb. 30: exemplarische Darstellung der Hemmhofbildung aus 15 μl Probe des
Endosts.....55

Abb. 31: quantitative Auswertung des Gesamtgentamicingehalts57

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation des Weichteilschadens offener Frakturen nach Anderson und Gustilo (Gustilo & Anderson, 1976)	3
Tab. 2: Klassifikation des Weichteilschadens geschlossener und offener Frakturen nach Tscherne und Oestern (Tscherne, 1984).....	4
Tab. 3: Übersicht zu den Messzeitpunkten und der Anzahl der verwendeten Drähte für die <i>in-vitro</i> Elution (10 min – 42 d).....	17
Tab. 4: Übersicht zu den Untersuchungszeitpunkten für die <i>in-vivo</i> Analyse.....	20
Tab. 5: Schema Entwässerungsautomat.....	25
Tab. 6: Übersicht für die Auswertungsmethoden der entnommenen Proben.....	25
Tab. 7: verwendete Marknägels für die elektronenmikroskopische Darstellung der Beschichtung aus der der <i>in- vitro</i> und <i>in-vivo</i> Analyse	28
Tab. 8: Färbeprotokoll Hämotoxylin – Eosin – Färbung.....	28
Tab. 9: Schema Immunhistologische Färbung	30
Tab. 10: histologischer Score zur Beurteilung von Strukturveränderungen im Nierengewebe.....	31
Tab. 11: Untersuchungsschema für die Beurteilung des Knochen- und Weichteilgewebes	32
Tab. 12: Übersicht zu den <i>in-vivo</i> Untersuchungszeitpunkten und der dazugehörigen Anzahl der Versuchstiere, Tibiaeproben und Implantaten	36
Tab. 13: Quantifizierung von Gentamicin [$\mu\text{g/g}$] im Knochengewebe	38
Tab. 14: Anzahl der positiv auf Gentamicin getesteten Proben mit der Methode KIMS und HPLC zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.....	56

9 Literaturverzeichnis

- ABDELGHANY, S. M., QUINN, D. J., INGRAM, R. J., GILMORE, B. F., DONNELLY, R. F., TAGGART, C. C. & SCOTT, C. J. (2012) Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine*, 7, 4053-4063.
- ADAMS, K., COUCH, L., CIERNY, G., CALHOUN, J. & MADER, J. T. (1992) In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clin Orthop Relat Res*(278), 244-252.
- AKTORIES K., F. U., HOFMANN F. B., STARKE K. (2013) Kapitel 34 - Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* München: Urban & Fischer Verlag 745-882.
- AL-ARABI, Y. B., NADER, M., HAMIDIAN-JAHROMI, A. R. & WOODS, D. A. (2007) The effect of the timing of antibiotics and surgical treatment on infection rates in open long-bone fractures: a 9-year prospective study from a district general hospital. *Injury*, 38(8), 900-905.
- ANWAR, H., DASGUPTA, M. K. & COSTERTON, J. W. (1990) Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(11), 2043-2046.
- AO FOUNDATION (2010) Mueller AO Classification Of Fractures - Long Bones. Dübendorf, Switzerland.
- AYLIFFE, G. A. (1991) Role of the environment of the operating suite in surgical wound infection. *Rev Infect Dis*, 13 Suppl 10, S800-804.
- BACK, D. A., BORMANN, N., CALAFI, A., ZECH, J., GARBE, L. A., MULLER, M., WILLY, C., SCHMIDMAIER, G. & WILDEMANN, B. (2016) Testing of antibiotic releasing implant coatings to fight bacteria in combat-associated osteomyelitis - an in-vitro study. *Int Orthop*.
- BARO, M., SANCHEZ, E., DELGADO, A., PERERA, A. & EVORA, C. (2002) In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J Control Release*, 83(3), 353-364.
- BECK, A., KINZL, L. & BISCHOFF, M. (1999) Antibiotic prophylaxis and therapy in trauma surgery. *Unfallchirurg*, 102(12), 955-966.
- BERNARD, L., HOFFMEYER, P., ASSAL, M., VAUDAUX, P., SCHRENZEL, J. & LEW, D. (2004) Trends in the treatment of orthopaedic prosthetic infections. *J Antimicrob Chemother*, 53(2), 127-129.
- BHANDARI, M., GUYATT, G. H., SWIONTKOWSKI, M. F. & SCHEMITSCH, E. H. (2001) Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *J Bone Joint Surg Br*, 83(1), 62-68.
- BHANDARI, M., GUYATT, G. H., TONG, D., ADILI, A. & SHAUGHNESSY, S. G. (2000) Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis. *J Orthop Trauma*, 14(1), 2-9.
- BLAHA, J. C., JH; NELSON, CL; HENRY, SL; SELIGSON, D; ESTERHAI, JLL; ET AL. (1993) Comparison of the Clinical Efficacy and Tolerance of Gentamicin PMMA Beads on Surgical Wire Versus Combined and Systemic Therapy for Osteomyelitis *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 295, 8-12.
- BLUNSTON, M. A., YONOVITZ, A., WOODAHL, E. L. & SMOLENSKY, M. H. (2015) Gentamicin-induced ototoxicity and nephrotoxicity vary with circadian time of treatment and entail separate mechanisms. *Chronobiol Int*, 1-10.
- BMEL (2015). "Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2015." Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, from http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docId=8596776, Retrieved 27.12., 2016.

- BOSTMAN, O., HIRVENSAALO, E., MAKINEN, J. & ROKKANEN, P. (1990) Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br*, 72(4), 592-596.
- BOSTMAN, O. M. (1992) Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of polyglycolide in ankle fractures. *Clin Orthop Relat Res*(278), 193-199.
- BOSTMAN, O. M. & PIHLAJAMAKI, H. K. (2000) Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop Relat Res*(371), 216-227.
- BRODBELT, D. C., BLISSITT, K. J., HAMMOND, R. A., NEATH, P. J., YOUNG, L. E., PFEIFFER, D. U. & WOOD, J. L. N. (2008) The risk of death: the Confidential Enquiry into Perioperative Small Animal Fatalities. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 35(5), 365-373.
- BROWN, M. R., COLLIER, P. J. & GILBERT, P. (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(9), 1623-1628.
- CALHOUN, J. H., MANRING, M. M. & SHIRTLIFF, M. (2009) Osteomyelitis of the long bones. *Semin Plast Surg*, 23(2), 59-72.
- CAMPOCCIA, D., MONTANARO, L., SPEZIALE, P. & ARCIOLA, C. R. (2010) Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*, 31(25), 6363-6377.
- CASTRO, C., SÁNCHEZ, E., DELGADO, A., SORIANO, I., NÚÑEZ, P., BARO, M., PERERA, A. & ÉVORA, C. (2003) Ciprofloxacin implants for bone infection. In vitro–in vivo characterization. *Journal of Controlled Release*, 93(3), 341-354.
- CIERNY, G., 3RD, MADER, J. T. & PENNING, J. J. (2003) A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*(414), 7-24.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-745.
- COURT-BROWN, C. M. & MCBIRNIE, J. (1995) The epidemiology of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br*, 77(3), 417-421.
- COURT-BROWN, C. M., RIMMER, S., PRAKASH, U. & MCQUEEN, M. M. (1998) The epidemiology of open long bone fractures. *Injury*, 29(7), 529-534.
- CRAIG, J., FUCHS, T., JENKS, M., FLEETWOOD, K., FRANZ, D., IFF, J. & RASCHKE, M. (2014) Systematic review and meta-analysis of the additional benefit of local prophylactic antibiotic therapy for infection rates in open tibia fractures treated with intramedullary nailing. *Int Orthop*, 38(5), 1025-1030.
- CREMIEUX, A. C. & CARBON, C. (1997) Experimental models of bone and prosthetic joint infections. *Clin Infect Dis*, 25(6), 1295-1302.
- CROSS A. T. (2001) Gerhard Küntscher: A surgical giant. *AO Dialogue*(2/2001).
- CUI, J., BAI, X. Y., SUN, X., CAI, G., HONG, Q., DING, R. & CHEN, X. (2015) Rapamycin protects against gentamicin-induced acute kidney injury via autophagy in mini-pig models. *Sci Rep*, 5, 11256.
- CUTRIGHT, D. E., PEREZ, B., BEASLEY, J. D., 3RD, LARSON, W. J. & POSEY, W. R. (1974) Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 37(1), 142-152.
- DAROUCHE, R. O. (2003) Antimicrobial approaches for preventing infections associated with surgical implants. *Clin Infect Dis*, 36(10), 1284-1289.

- DAROUICHE, R. O. (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*, 350(14), 1422-1429.
- DAROUICHE, R. O. (2007) Antimicrobial coating of devices for prevention of infection: principles and protection. *Int J Artif Organs*, 30(9), 820-827.
- DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W. & GREENBERG, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- DAVIS, D. (2007). "Biofilm." D. Monroe - Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms, from <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biofilm.jpg>, 02.07.2017.
- DIEFENBECK, M., MUCKLEY, T. & HOFMANN, G. O. (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury*, 37 Suppl 2, S95-104.
- DONLAN, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 167-193.
- EINHORN, T. A., MAJESKA, R. J., MOHAIDEEN, A., KAGEL, E. M., BOUXSEIN, M. L., TUREK, T. J. & WOZNEY, J. M. (2003) A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-a(8), 1425-1435.
- FASSBENDER, M., MINKWITZ, S., KRONBACH, Z., STROBEL, C., KADOW-ROMACKER, A., SCHMIDMAIER, G. & WILDEMANN, B. (2013) Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone*, 55(2), 298-304.
- FLECKNELL, P. A. (2009) Chapter 6 - Anaesthesia of Common Laboratory Species: Special Considerations, *Laboratory Animal Anaesthesia (Third Edition)*. San Diego: Academic Press, 181-241.
- FLEMMING, H. C., NEU, T. R. & WOZNIAK, D. J. (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*, 189(22), 7945-7947.
- FRAIMOW, H. S. (2009) Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg*, 23(2), 90-99.
- FRIEDRICH, P. L. (1898) Die Aseptische Versorgung frischer Wunden unter Mitteilung von Tierversuchen über die Auskeimzeit von Infektionserregern in frischen Wunden. *Klin. Chir.*, 57, 288-310.
- FUCHS, T., STANGE, R., SCHMIDMAIER, G. & RASCHKE, M. J. (2011) The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 131(10), 1419-1425.
- GABRIEL, S. (2010) Schmerztherapie beim Heimtier. *Kompendium Kleintiere*, 1:37-41.
- GARVIN, K. L., MIYANO, J. A., ROBINSON, D., GIGER, D., NOVAK, J. & RADIO, S. (1994) Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg Am*, 76(10), 1500-1506.
- GOLLWITZER, H. (2003) Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 585-591.
- GOLLWITZER, H., THOMAS, P., DIEHL, P., STEINHAUSER, E., SUMMER, B., BARNSTORF, S., GERDESMEYER, L., MITTELMEIER, W. & STEMBERGER, A. (2005) Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. *J Orthop Res*, 23(4), 802-809.

- GOLLWITZER H. (2002) Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate. Mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie.
- GÖPFERICH, A. (1998) Bioresorbable Polymers as Drug Delivery Systems, in WALENKAMP, G. (ed), *Biomaterials in Surgery*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 121-127.
- GOSSELIN, R. A., ROBERTS, I. & GILLESPIE, W. J. (2004) Antibiotics for preventing infection in open limb fractures. *Cochrane Database Syst Rev*(1), Cd003764.
- GREINER, S. H., WILDEMANN, B., BACK, D. A., ALIDOUST, M., SCHWABE, P., HAAS, N. P. & SCHMIDMAIER, G. (2008) Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. *Acta Orthop*, 79(5), 717-725.
- GRISTINA, A. G. (1987a) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237(4822), 1588-1595.
- GRISTINA, A. G. (1987b) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.
- GRISTINA, A. G. (1994) Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop Relat Res*(298), 106-118.
- GRISTINA, A. G. & COSTERTON, J. W. (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am*, 67(2), 264-273.
- GRISTINA, A. G., NAYLOR, P. & MYRVIK, Q. (1988) Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol*, 14(3-4), 205-224.
- GRISTINA, A. G., OGA, M., WEBB, L. X. & HOBGOOD, C. D. (1985) Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science*, 228(4702), 990-993.
- GUSTILO, R. B. & ANDERSON, J. T. (1976) Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am*, 58(4), 453-458.
- GUSTILO, R. B., MENDOZA, R. M. & WILLIAMS, D. N. (1984) Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma*, 24(8), 742-746.
- GUSTILO, R. B., MERKOW, R. L. & TEMPLEMAN, D. (1990) The management of open fractures. *J Bone Joint Surg Am*, 72(2), 299-304.
- HANNIGAN, G. D., PULOS, N., GRICE, E. A. & MEHTA, S. (2015) Current Concepts and Ongoing Research in the Prevention and Treatment of Open Fracture Infections. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(1), 59-74.
- HANSEN, M., MEHLER, D., VOLTMER, W. & ROMMENS, P. M. (2002) [The extraarticular proximal tibial fractures]. *Unfallchirurg*, 105(10), 858-872.
- HANSIS, M. & ARENS, S. (1996) Prophylactic and therapeutic use of antibiotics in trauma surgery. *Unfallchirurg*, 99(5), 316-322.
- HANSIS, M. L. (2000) Aktuelle Entwicklungen in der Unfallchirurgie.
- HEITZ, A. (2005) Zum Einfluss der vollständigen Antagonisierung der Anästhesie mit Medetomidin/Midazolam/Fentanyl auf die Hämodynamik, die Atmung und den Glukosestoffwechsel von Ratten im VolumenmangelschockInstitut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- HENKE, J. & REINERT, J. (2006) Anwendung von Medetomidin in der Heimtierpraxis. *Fachpraxis* Nr. 50, 12-19.

- HETRICK, E. M. & SCHOENFISCH, M. H. (2006) Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev*, 35(9), 780-789.
- HETTFFLEISCH, J. & SCHOTTLE, H. (1993) [Local preventive antibiotic treatment in intramedullary nailing with gentamycin impregnated biomaterials]. *Aktuelle Traumatol*, 23(2), 68-71.
- HOENIG, M., GAO, F., KINDER, J., ZHANG, L. Q., COLLINGE, C. & MERK, B. R. (2010) Extra-articular distal tibia fractures: a mechanical evaluation of 4 different treatment methods. *J Orthop Trauma*, 24(1), 30-35.
- HOFMANN, A., DIETZ, S. O., PAIRON, P. & ROMMENS, P. M. (2015) The role of intramedullary nailing in treatment of open fractures. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 41(1), 39-47.
- HÜSKE, C. (2014) *Refinement von Injektionsanästhesien bei Sprague-Dawley-Ratten - eine Vergleichsstudie verschiedener Anästhetika*Inaugural-Dissertation. Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
- HUTMACHER, D., HURZELER, M. B. & SCHLIEPHAKE, H. (1996) A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11(5), 667-678.
- IANNACCONE, P. M. & JACOB, H. J. (2009) Rats! *Dis Model Mech*, 2(5-6), 206-210.
- INSTITUT FÜR VETERINÄRPHARMAKOLOGIE UND -TOXIKOLOGIE (2015). Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, from www.vetpharm.uzh.ch/wir/00000140/3663__F.htm, Retrieved 12.04., 2016.
- JANSEN, B. & PETERS, G. (1993) Foreign body associated infection. *J Antimicrob Chemother*, 32 Suppl A, 69-75.
- JIANG, G., WOO, B. H., KANG, F., SINGH, J. & DELUCA, P. P. (2002) Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release*, 79(1-3), 137-145.
- JOHNSON, G. M., LEE, D. A., REGELMANN, W. E., GRAY, E. D., PETERS, G. & QUIE, P. G. (1986) Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect Immun*, 54(1), 13-20.
- JUUTILAINEN, T., PATIALA, H., RUUSKANEN, M. & ROKKANEN, P. (1997) Comparison of costs in ankle fractures treated with absorbable or metallic fixation devices. *Arch Orthop Trauma Surg*, 116(4), 204-208.
- KABRA, P. M., BHATNAGAR, P. K. & NELSON, M. A. (1983) Liquid chromatographic determination of gentamicin in serum with spectrophotometric detection. *J Anal Toxicol*, 7(6), 283-285.
- KÄLICHE, T., SCHIERHOLZ, J., SCHLEGEL, U., FRANGEN, T. M., KÖLLER, M., PRINTZEN, G., SEYBOLD, D., KLÖCKNER, S., MUHR, G. & ARENS, S. (2006) Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: An in vitro and in vivo study. *Journal of Orthopaedic Research*, 24(8), 1622-1640.
- KHALILI, H., BAIRAMI, S. & KARGAR, M. (2013) Antibiotics induced acute kidney injury: incidence, risk factors, onset time and outcome. *Acta Med Iran*, 51(12), 871-878.
- KHATOD, M., BOTTE, M. J., HOYT, D. B., MEYER, R. S., SMITH, J. M. & AKESON, W. H. (2003) Outcomes in open tibia fractures: relationship between delay in treatment and infection. *J Trauma*, 55(5), 949-954.
- KINDSFATER, K. & JONASSEN, E. A. (1995) Osteomyelitis in grade II and III open tibia fractures with late debridement. *J Orthop Trauma*, 9(2), 121-127.

- KINIK, H. & KARADUMAN, M. (2008) Cierny-Mader Type III chronic osteomyelitis: the results of patients treated with debridement, irrigation, vancomycin beads and systemic antibiotics. *Int Orthop*, 32(4), 551-558.
- KOORT, J. K., SUOKAS, E., VEIRANTO, M., MAKINEN, T. J., JALAVA, J., TORMALA, P. & ARO, H. T. (2006) In vitro and in vivo testing of bioabsorbable antibiotic containing bone filler for osteomyelitis treatment. *J Biomed Mater Res A*, 78(3), 532-540.
- KRASKO, M. Y., GOLENSER, J., NYSKA, A., NYSKA, M., BRIN, Y. S. & DOMB, A. J. (2007) Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *J Control Release*, 117(1), 90-96.
- KUMTA, S. M., SPINNER, R. & LEUNG, P. C. (1992) Absorbable intramedullary implants for hand fractures. Animal experiments and clinical trial. *J Bone Joint Surg Br*, 74(4), 563-566.
- LAMONT, J. T., SONNENBLICK, E. B. & ROTHMAN, S. (1979) Role of clostridial toxin in the pathogenesis of clindamycin colitis in rabbits. *Gastroenterology*, 76(2), 356-361.
- LAURENCIN, C. T., GERHART, T., WITSCHGER, P., SATCHER, R., DOMB, A., ROSENBERG, A. E., HANFF, P., EDSBERG, L., HAYES, W. & LANGER, R. (1993) Bioerodible polyanhydrides for antibiotic drug delivery: in vivo osteomyelitis treatment in a rat model system. *J Orthop Res*, 11(2), 256-262.
- LAUTENSCHLAGER, S., HERZOG, C. & ZIMMERLI, W. (1993) Course and outcome of bacteremia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. *Clin Infect Dis*, 16(4), 567-573.
- LAZZARINI, L., MADER, J. T. & CALHOUN, J. H. (2004) Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am*, 86-a(10), 2305-2318.
- LINDSAY, W., BIGSBY, E. & BANNISTER, G. (2011) Prevention of infection in orthopaedic joint replacement. *J Perioper Pract*, 21(6), 206-209.
- LIU, H., ZHAO, Y., ZHAO, D., GONG, T., WU, Y., HAN, H., XU, T., PESCHEL, A., HAN, S. & QU, D. (2015) Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. *Emerg Microbes Infect*, 4(1), e1.
- LIU, L., LI, S., GARREAU, H. & VERT, M. (2000) Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) blend films. *Biomacromolecules*, 1(3), 350-359.
- LÖSCHER, W. R., A.; POTSCHKA, H. (2014) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Translated from Deutsch by, 9. Auflage. Stuttgart: Enke bei Thieme (Verlag).
- LOWY, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8), 520-532.
- LUCKE, M., SCHMIDMAIER, G., GOLLWITZER, H. & RASCHKE, M. (2000) Entwicklung einer biodegradierbaren und antibiotisch wirksamen Beschichtung von Implantaten. *Der Unfallchirurg*. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. Abstracts., 362-363.
- LUCKE, M., SCHMIDMAIER, G., SADONI, S., WILDEMANN, B., SCHILLER, R., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2003) Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*, 32(5), 521-531.
- LUCKE, M., WILDEMANN, B., SADONI, S., SURKE, C., SCHILLER, R., STEMBERGER, A., RASCHKE, M., HAAS, N. P. & SCHMIDMAIER, G. (2005) Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*, 36(5), 770-778.
- MADER, J. T., NORDEN, C., NELSON, J. D. & CALANDRA, G. B. (1992) Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of osteomyelitis in adults. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. *Clin Infect Dis*, 15 Suppl 1, S155-161.

- MAKINEN, T. J., VEIRANTO, M., LANKINEN, P., MORITZ, N., JALAVA, J., TORMALA, P. & ARO, H. T. (2005) In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J Antimicrob Chemother*, 56(6), 1063-1068.
- MÄRDIAN, S., SCHWABE, P. & SCHASER, K. D. (2015) Tibiaschaftfrakturen. *Z Orthop Unfall*, 153(1), 99-117; quiz 118-119.
- MARRIE, T. J. & COSTERTON, J. W. (1985) Mode of growth of bacterial pathogens in chronic polymicrobial human osteomyelitis. *J Clin Microbiol*, 22(6), 924-933.
- MAYR, E. (2002) Unterschenkelfrakturen. *Der Chirurg*, 73(6), 642-663.
- MCHUGH, S. M., COLLINS, C. J., CORRIGAN, M. A., HILL, A. D. & HUMPHREYS, H. (2011) The role of topical antibiotics used as prophylaxis in surgical site infection prevention. *J Antimicrob Chemother*, 66(4), 693-701.
- METSEMAKERS, W. J., REUL, M. & NIJS, S. (2015) The use of gentamicin-coated nails in complex open tibia fracture and revision cases: A retrospective analysis of a single centre case series and review of the literature. *Injury*.
- MIDDLETON, J. C. & TIPTON, A. J. (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21(23), 2335-2346.
- MONTALI, A. (2006) Antibacterial coating systems. *Injury*, 37 Suppl 2, S81-86.
- MOUZOPOULOS, G., KANAKARIS, N. K., KONTAKIS, G., OBAKPOVWE, O., TOWNSEND, R. & GIANNOUDIS, P. V. (2011) Management of bone infections in adults: the surgeon's and microbiologist's perspectives. *Injury*, 42 Suppl 5, S18-23.
- NELSON, C. L., HICKMON, S. G. & SKINNER, R. A. (1997) Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin beads. *J Orthop Res*, 15(2), 249-255.
- NIKOLAKIS, G., ZOSCHKE, C., MAKRANTONAKI, E., HAUSMANN, C., SCHAFFER-KORTING, M. & ZOUBOULIS, C. C. (2016) [Experimental models of human skin aging]. *Hautarzt*, 67(2), 93-98.
- NORDEN, C. W. (1991) Antibiotic prophylaxis in orthopedic surgery. *Rev Infect Dis*, 13 Suppl 10, S842-846.
- O'LOUGHLIN, P. F., MORR, S., BOGUNOVIC, L., KIM, A. D., PARK, B. & LANE, J. M. (2008) Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1, 79-84.
- OCHSNER, P. E., BAUMGART, F. & KOHLER, G. (1998) Heat-induced segmental necrosis after reaming of one humeral and two tibial fractures with a narrow medullary canal. *Injury*, 29 Suppl 2, B1-10.
- OLSON, M. E., CERI, H., MORCK, D. W., BURET, A. G. & READ, R. R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 66(2), 86-92.
- OSTERMANN, P. A., SELIGSON, D. & HENRY, S. L. (1995) Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone Joint Surg Br*, 77(1), 93-97.
- PAPAKOSTIDIS, C., KANAKARIS, N. K., PRETEL, J., FAOUR, O., MORELL, D. J. & GIANNOUDIS, P. V. (2011) Prevalence of complications of open tibial shaft fractures stratified as per the Gustilo-Anderson classification. *Injury*, 42(12), 1408-1415.
- PATZAKIS, M. J., WILKINS, J. & MOORE, T. M. (1983) Considerations in reducing the infection rate in open tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res*(178), 36-41.
- PETRISOR, B., ANDERSON, S. & COURT-BROWN, C. M. (2005) Infection after reamed intramedullary nailing of the tibia: a case series review. *J Orthop Trauma*, 19(7), 437-441.

- PITT, C. G., GRATZL, M. M., KIMMEL, G. L., SURLES, J. & SCHINDLER, A. (1981) Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials*, 2(4), 215-220.
- POELSTRA, K. A., BAREKZI, N. A., REDISKE, A. M., FELTS, A. G., SLUNT, J. B. & GRAINGER, D. W. (2002) Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J Biomed Mater Res*, 60(1), 206-215.
- RANDJELOVIC, P., VELJKOVIC, S., STOJILJKOVIC, N., JANKOVIC-VELICKOVIC, L., SOKOLOVIC, D., STOILJKOVIC, M. & ILIC, I. (2012) Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *ScientificWorldJournal*, 2012, 390613.
- RASCHKE, M., VORDEMVENNE, T. & FUCHS, T. (2010) Limb salvage or amputation? The use of a gentamicin coated nail in a severe, grade IIIc tibia fracture. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 36(6), 605-608.
- REICHERT, J. C., SAIFZADEH, S., WULLSCHLEGER, M. E., EPARI, D. R., SCHUTZ, M. A., DUDA, G. N., SCHELL, H., VAN GRIENSVEN, M., REDL, H. & HUTMACHER, D. W. (2009) The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*, 30(12), 2149-2163.
- REIFENBERG, D. M. V. K. (2016) *Pflege und Haltung der wichtigsten Versuchstierarten*. Mainz: MAINZ, J. G.-U.
- RISSING, J. P. (1990) Animal models of osteomyelitis. Knowledge, hypothesis, and speculation. *Infect Dis Clin North Am*, 4(3), 377-390.
- ROBSON, M. C., DUKE, W. F. & KRIZEK, T. J. (1973) Rapid bacterial screening in the treatment of civilian wounds. *J Surg Res*, 14(5), 426-430.
- RUPP, M. E. & ARCHER, G. L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*, 19(2), 231-243; quiz 244-235.
- SASMOR, M. T., MORAIN, W. D., BALESTRERO, L. M. & CAMP, B. J. (1993) Investigation of a biodegradable, implantable antibiotic delivery system on rate of wound infection. *Ann Plast Surg*, 30(6), 525-530.
- SCHALL, H. (2014) *Krankheiten der Heimtiere, 8. Auflage* Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Company KG.
- SCHMIDMAIER, G., LUCKE, M., WILDEMANN, B., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*, 37 Suppl 2, S105-112.
- SCHMIDMAIER, G. & RASCHKE, M. (2001) Das Implantat als Arzneistoffträger: Lokal induzierte Knochenheilung. *Biomaterialien*, 2 106.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., BAIL, H., LUCKE, M., FUCHS, T., STEMBERGER, A., FLYVBJERG, A., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2001a) Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*, 28(4), 341-350.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., CROMME, F., KANDZIORA, F., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2002) Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*, 30(6), 816-822.

- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., GABELEIN, T., HEEGER, J., KANDZIORA, F., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2003) Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. *Acta Orthop Scand*, 74(5), 604-610.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., STEMBERGER, A., HAAS, N. P. & RASCHKE, M. (2001b) Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*, 58(4), 449-455.
- SCHUSCHKE, T., WESTPHAL, T. & PIATEK, S. (2002) Therapeutisches Management bei offenen Frakturen. *Hartmann Wundforum*, 04(Ausgabe 4/2002), 7.
- SIEPMANN, J. & GÖPFERICH, A. (2001) Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2-3), 229-247.
- SINGH, J., RAMBANI, R., HASHIM, Z., RAMAN, R. & SHARMA, H. K. (2012) The relationship between time to surgical debridement and incidence of infection in grade III open fractures. *Strategies Trauma Limb Reconstr*, 7(1), 33-37.
- SPENCER, J., SMITH, A. & WOODS, D. (2004) The effect of time delay on infection in open long-bone fractures: a 5-year prospective audit from a district general hospital. *Ann R Coll Surg Engl*, 86(2), 108-112.
- STEWART, P. S. (1996) Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(11), 2517-2522.
- STEWART, P. S. & COSTERTON, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135-138.
- STOKES, W. S. (2015) Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: The way forward. *Hum Exp Toxicol*, 34(12), 1297-1303.
- STROBEL, C., BORMANN, N., KADOW-ROMACKER, A., SCHMIDMAIER, G. & WILDEMANN, B. (2011a) Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants. *J Control Release*, 156(1), 37-45.
- STROBEL, C., KADOW-ROMACKER, A., WITASCHECK, T., SCHMIDMAIER, G. & WILDEMANN, B. (2011b) Evaluation of process parameter of an automated dip-coating. *Materials Letters*, 65(23-24), 3621-3624.
- STROBEL, C., SCHMIDMAIER, G. & WILDEMANN, B. (2011c) Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer. *Int J Artif Organs*, 34(3), 304-316.
- SUGANUMA, J. & ALEXANDER, H. (1993) Biological response of intramedullary bone to Poly-L-lactic acid. *J Applied Biomaterials*, 4:13-27.
- SUTHERLAND, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(Pt 1), 3-9.
- SUZUKI, S., TAKAMURA, S., YOSHIDA, J., SHINZAWA, Y., NIWA, O. & TAMATANI, R. (1995) Comparison of gentamicin nephrotoxicity between rats and mice. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 112(1), 15-28.
- TANGE, R. A., DRESCHLER, W. A., PRINS, J. M., BULLER, H. R., KUIJPER, E. J. & SPEELMAN, P. (1995) Ototoxicity and nephrotoxicity of gentamicin vs netilmicin in patients with serious infections. A randomized clinical trial. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 20(2), 118-123.
- THOMA K., S. B. (1991) *Biodegradierbare Polymere als Retardierungsprinzip für Arzneistoffe*. Translated from 0031-7144 by, 46. Eschborn, ALLEMAGNE: Govi.

- TRACY, M. A., WARD, K. L., FIROUZABADIAN, L., WANG, Y., DONG, N., QIAN, R. & ZHANG, Y. (1999) Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials*, 20(11), 1057-1062.
- TRAMPUZ, A. & ZIMMERLI, W. (2006) Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, 37 Suppl 2, S59-66.
- TSCHERNE, H. (1984) The Management of Open Fractures, in TSCHERNE, H. & GOTZEN, L. (eds), *Fractures with Soft Tissue Injuries*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 10-32.
- TUCHSCHERR, L., KREIS, C. A., HOERR, V., FLINT, L., HACHMEISTER, M., GERACI, J., BREMER-STRECK, S., KIEHNTOPF, M., MEDINA, E., KRIBUS, M., RASCHKE, M., PLETZ, M., PETERS, G. & LOFFLER, B. (2015) Staphylococcus aureus develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother*.
- UCKAY, I., HOFFMEYER, P., LEW, D. & PITTET, D. (2013) Prevention of surgical site infections in orthopaedic surgery and bone trauma: state-of-the-art update. *J Hosp Infect*, 84(1), 5-12.
- Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2010) 2010/63/EU, Chapter
- VESTER, H., WILDEMANN, B., SCHMIDMAIER, G., STOCKLE, U. & LUCKE, M. (2010) Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants: In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury*, 41(10), 1053-1059.
- WAGNER, H. & KLUGE, R. (2016) Fütterungskonzepte und –methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch -Ratte- Marburg.
- WEBB, J. C., GBEJUADE, H., LOVERING, A. & SPENCER, R. (2013) Characterisation of in vivo release of gentamicin from polymethyl methacrylate cement using a novel method. *Int Orthop*, 37(10), 2031-2036.
- WEILER, A., HELLING, H. J., KIRCH, U., ZIRBES, T. K. & REHM, K. E. (1996) Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation: experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br*, 78(3), 369-376.
- WEISS, R. J., MONTGOMERY, S. M., EHLIN, A., AL DABBAGH, Z., STARK, A. & JANSSON, K. A. (2008) Decreasing incidence of tibial shaft fractures between 1998 and 2004: information based on 10,627 Swedish inpatients. *Acta Orthop*, 79(4), 526-533.
- WIDMER, A. F., WIESTNER, A., FREI, R. & ZIMMERLI, W. (1991) Killing of nongrowing and adherent Escherichia coli determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(4), 741-746.
- WILDEMANN, B., BAMDAD, P., HOLMER, C., HAAS, N. P., RASCHKE, M. & SCHMIDMAIER, G. (2004) Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone*, 34(5), 862-868.
- WILDEMANN, B., SANDER, A., SCHWABE, P., LUCKE, M., STOCKLE, U., RASCHKE, M., HAAS, N. P. & SCHMIDMAIER, G. (2005) Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials*, 26(18), 4035-4040.
- WILLIAMS, I., VENABLES, W. A., LLOYD, D., PAUL, F. & CRITCHLEY, I. (1997) The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in Staphylococcus aureus. *Microbiology*, 143 (Pt 7), 2407-2413.
- WIRTH, C. J. M. W. K., D.; POHLEMANN T. (2013) *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. Translated from Deutsch by, 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart u.a.: Georg Thieme Verlag.

- YOSHIZAWA, S., FOURMY, D. & PUGLISI, J. D. (1998) Structural origins of gentamicin antibiotic action. *Embo j*, 17(22), 6437-6448.
- ZIMMERLI, W., TRAMPUZ, A. & OCHSNER, P. E. (2004) Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, 351(16), 1645-1654.

10 Anhang: Materialien- und Geräteliste

AB-Komplex

(AK-5000 Alkalin-Phosphatase-Standard-Kit, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Dtl.)

Antikörperversdünnungsmedium

(Dako Antibody Diluent, S3022, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Dtl.)

Antisedan®

(Atipamezol, Orion Pharma GmbH, Hamburg, Dtl.)

AxioVision

(Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.)

Bepanthen®

Augen- und Nasensalbe (Dexpanthenol, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland)

Bildwandler

(N44 100/120Hz, Siemens AG, München, Dtl.)

Biotinlierter Zweitantikörper

(Biotinylated Anti rabbit IgG BA-1000, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Dtl.)

Brutschrank

(Heracell, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Dtl.)

Butylacetat

(Essigsäure-n-butylester, ≥ 99%, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Dtl.)

C-Bogen

(Siremobil Iso-C, Siemens AG, München, Dtl.)

Chromogenpuffer

(TRIZMA Hydrochloride / Base, Sigma-Aldrich Co. LLC, Dtl., NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.)

Desinfektionsflüssigkeit

(Decosept, Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld Dtl.)

Dewaregefäß

(KG Isotherm, Karlsruher Glastechnisches Werk – Schieder GmbH, Karlsruhe, Dtl.)

Durchlichtmikroskop

(Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.)

Elektrisch betriebene Diamattrennscheibe

(Feinbohrschleifer 50/E, Proxxon GmbH, Föhren Dtl.)

EDTA-Röhrchen

(BD Vautainer® EDTA-Röhrchen, SST™ II Advance, BD Plymouth, UK)

Einwegrasierer

(Einweg-Rasierer von Wilkinson, Typ 182 H, Wilkinson Sword GmbH Solingen, Dtl.)

Elektronenmikroskop

(REM, DSM 982 Gemini, Zeiss, Dtl.)

Entwässerungsautomat

(TP1020, Program 3, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

Eosin - Färbelösung

(Chroma, Waldeck GmbH, Münster, Dtl., konz. 2%, 1:10 verdünnt mit Aqua dest.)

Erlenmeyerkolben mit Schliff 100 ml

(Duran 100ml, Lenz Laborglasinstrumente, NS 29/32, Wertheim, Dtl.)

Falcon Tubes

(15ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube, BD Falcon, New Jersey, USA)

Feinwaage Implantate

(Precisa XR 205sM-DR, Th. Geyer, Renningen-Hamburg-Berlin, Dtl.)

Fettstift

(S 2002, Dako Deutschland GmbH, hamburg, Dtl.)

Fixierlösung Formaldehyd-Alkohol-Lösung

(Zusammensetzung: 324 ml Formaldehyd 34%; 540 ml Äthylalkohol 100%; 130 ml 0,1 molar Natrium - Barbitalpuffer, pH 7,4; Glukose 6 g)

Futter

(sniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)

Gentamicin-Antikörper

(orb10384, rabbit, polyclonal, Biorbyt Limited, Cambridge)

Gentamicinsulfatpulver: Lot: 14983

(Stratec Medical Oberdorf, Schweiz)

Gold

(MED 020, Bal-Tec, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

Hämatoxylin - Färbelösung

(Mayers Hämalaulösung, Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.)

HCl 0,001 M

(Salzsäure für 1000 ml, c(HCl) = 1 Mol/l (1 N) Titrisol®, Merck kGaA, Darmstadt, Dtl.)

Inkubator

(Heracell, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Dtl.)

ImageJ 1.47

(Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Isopropanol

(2-Propanol, ROTISOLV®, ≥99,95%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Dtl.)

Jodlösung

(Braunol, B. Barun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.)

Kamera AxioCam MRc5 und Softwareprogramm Axio Vision 4.0

(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dtl.)

Kanüle

(Sterican Kanülen 30G 0,30x12 mm, B. Braun Melsungen AG)

Kassetten

(Tissue-Tek® III-Kassetten, Fa. Sakura, Gießen, Dtl.)

KIMS

(Roche/Hitachi® cobas c System, Basel, Schweiz)

Kühlplatte

(Leica EG 1130, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

Magnetrührer

(Yellow Line, Yellow MAG HS 7, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Dtl.)

Makrolon-Versuchstierkäfig gemäß des Eurostandards Typ IV

(Fa. E. Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel/ Deutschland)

Marknägel

(Titankirchnerdrähte, ø 1 mm, PDLLA und Gentamicinsulfat, Stratec Medical Oberdorf, Schweiz)

Methylgrün nach Vector

(Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Dtl.)

Mikroskop

(DM R Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar, Dtl.)

MS-Excel®

(Fa. Microsoft, Seattle, USA).

Müller-Hinton-Agar II Fertigplatten

(BD Diagnostic, Becton, Dickinson and Company 254032 (SRM # 612862), New Jersey, USA)

Nahtmaterial

(Vicryl 5-0, Polyglactin 910, Ethicon GmbH, Norderstedt, Dtl)

Narkosegerät

(Fritz Stephan GmbH, Gackenbach, Dtl.)

Natriumchloridlösung 0,9%

(isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Dtl.)

Normalserum

(S-100, Normal Goat Serum, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Dtl.)

Paraffin

(MC Cormick Scientific, Paraplast Plus®, Tissue Embedding Medium, Leica Biosystems, Richmond, USA)

Paraffinspender

(Typ 47311, Medax GmbH & Co AG, Nunningen, Schweiz)

Paraffinstrecktisch

(Leica HI 1220, Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

PBS-Puffer

((10x), pH 7,2, Waldeck GmbH & Co Kg, Münster, Dtl.)

Pflasterspray

(Band-Aid™, Ethicon GmbH, Norderstedt, Dtl.)

Phtaldialdehyde Reagent

(Lot # SLBD6295V, Sigma/Aldrich, USA)

Poly(D,L-Laktid)

(PDLLA, Resomer 203, 30 kDa Boehringer Ingelheim, Dtl.)

Röntgenauswertungsgerät

(Kodak Direct View Elite CR System, Rochester, USA)

Röntgenrät

(Faxitron X-Ray, MX-20 Lab Radigraphs, Wheeling, Illinois, USA)

Röntgenkassette

(Kodak Direct View CR Cassette, Rochester, USA)

Rompun® 2%

(Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Dtl.)

Rotationsmikrotom

(Leica RM 2125, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

Scharfer Löffel nach Volkmann

(Löffelgröße 3 mm)

Schüttler für Implantat und Histologie - Proben

(C.Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn, Dtl.)

Schüttler für Knochen - Proben

(Heidolph, Duoma 1030, Schwabach, Dtl.)

Serum-Röhrchen

(BD Vautainer® Serumröhrchen, SST™ II Advance, BD Plymouth, UK)

Skalpell No. 15

(Einmalskalpell, Feather Safety Razor Co. Ltd., Medical Division, Osaka, Japan)

Sterile Gummihandschuhe

(Gammex PF Ansell UK Ltd., Tamworth, Staffordshire, UK)

Steriles Operationsbesteck

(bestehend aus Kirschnerdrähten Stahl: \varnothing 0,8 und 1,0 mm), Präparierschere, Pinzette anatomisch und chirurgisch, Nadelhalter und Kneifzange)

Steriles Tuch

(Foliodrape Hartmann AG, Heidenheim, Dtl.)

Substratlösung

(Substrate Kit SK-5100, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Dtl.)

Tecan Spektrometer

(Infinite® F200 PRO, Tecan Trading AG, Schweiz)

Temgesic®

(Buprenorphin; 0,05 mg/kg, Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA)

Testplättchen, Blank

(Oxoid Deutschland GmbH (Part of Thermo Fisher Scientific), CT0998B, Wesel, Dtl.)

Tramal®

(Tramadolhydrochlorid; 25 mg/L, Grünenthal Ges. m. b. H, Österreich)

Ultra Turrax

(IKA®-Werke GmbH & Co. KG, T10 Basic, Dispergierwerk S 10 N – 10 G – ST, Homogenizer Workcenter, Staufen, Dtl.)

Ursotamin®

(Ketaminhydrochlorid, Serumwerk Bernburg, Dtl.)

Ultraschallbad

(Bandelin Sonorex GmbH & Co. KG, RK 100, Berlin, Dtl.)

Vitroclud

(Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland)

Vortexer

(IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Vortex 3, Staufen, Dtl.)

Waage für Endost/Knochen

(CP 153, Sartorius AG Göttingen, Dtl.)

Waage für die Tiere; Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106

(Sartorius AG Göttingen, Dtl.)

Wasserbad

(GFL® GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtl.)

Wasserbad für Histologie

(Leica HI 1210, Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Dtl.)

Xylol

(J.T. Baker, Xylene, Deventer, Niederlande)

Zentrifuge für Blutproben

(Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Dtl.)

Zentrifuge für Endost/Knochen/Nieren - Proben

(Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Dtl.)

11 Publikation

Teile dieser Promotionsarbeit wurden in dem folgenden Artikel publiziert.

Sophie Nast, Mirja Fassbender, Nicole Bormann, Simon Beck, Andrea Montali, Martin Lucke, Gerhard Schmidmaier, Britt Wildemann

In vivo quantification of gentamicin released from an implant coating

J Biomater Appl. 2016, 31(1): 45-54

12 Danksagung

Ich möchte Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer für die Betreuung und die Durchsicht meiner Doktorarbeit als Erstgutachter danken.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann für die Möglichkeit, dass ich diese Dissertationsarbeit in ihrer Arbeitsgruppe erstellen durfte. Stets stand sie in allen Phasen dieser Arbeit hinter mir und ermöglichte es mir durch ihre erfahrenen und wegweisenden Ideen, als auch durch ihre konstruktiven Anregungen sowie ihr entgegengebrachtes Vertrauen diese Arbeit zu beenden. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Univ.-Prof. Dr. Peter Böttcher gilt mein Dank für die Durchsicht und Bewertung meiner Arbeit.

Herzlichen bedanken möchte ich mich bei Dr. med. vet. Mirja Faßbender für die Organisation und Durchführung der Operationen und ihre fachkundige Hilfe bei allen tiermedizinischen Belangen. Ich danke ihr für ihre Hilfsbereitschaft und hervorragende Betreuung bei den praktischen und schriftlichen Arbeiten zu dieser Dissertation, ihre wertvollen inhaltlichen Anmerkungen und dass sie keine Frage oder Bitte unbeantwortet ließ.

Auch möchte ich mich bei dem gesamten Team der AG Wildemann für die herzliche Aufnahme und die andauernde Unterstützung während des Entstehens dieser Arbeit bedanken. Für eine tatkräftige wissenschaftliche Hilfestellung, ein kommunikatives Arbeitsklima und eine tolle Zusammenarbeit möchte ich mich speziell bei Dr. rer. medic. Franka Klatte-Schulz, Dr. Ing. Susann Minkwitz und Dipl.-Ing. Biotech. Nicole Bormann bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei Zienab Kronbach für ihre uneingeschränkte und praktische Hilfe während der Operationen und im Labor bedanken, als auch für den Austausch wissenschaftlicher Ideen und für die vielen aufheiternden Stunden.

Bei Dr. Ing. Philipp Damm möchte ich mich bedanken, da er den Stein ins Rollen gebracht hat und sich somit die Möglichkeit für mich ergab am Julius Wolff Institut zu promovieren. Auch möchte ich ihm für seine wertvolle Unterstützung im Büro, die allzeit aufmunternden Worte und die entspannte Arbeitsatmosphäre danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Julius Wolff Institutes, des BCRT und der tierexperimentellen Einrichtung, die mich auf diesem intensiven Weg fachlich begleitet haben. Insbesondere danke ich Gabriela Korus für ihre herzliche Art, die immer für eine angenehme Stimmung im Labor sorgte. Auch danke ich ihr für die stets geduldige Bereitschaft mich tatkräftig bei der Anfertigung der immunhistologischen Färbungen zu unterstützen. Ebenfalls danke ich Mario Thiele für die Betreuung und die Hilfe bei der Bildanalyse.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Holger Baumgraß und Sibylle Nast, die mich in allen Lebenslagen moralisch unterstützten und immer an mich geglaubt haben. Sie gaben mir großen Halt, Sicherheit und Vertrauen und haben so in großem Maße zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke aus tiefstem Herzen meinem Partner Sebastian Noack, der mich in allen stressigen und arbeitsreichen Phasen unterstützt hat und mir durch seine großartige Hilfe, große Geduld und seine unermüdliche Fürsorge und sein Verständnis Tag und Nacht zur Seite stand.

Weiterhin danke ich meiner ganzen Familie und all meinen Freunden, die mich die gesamte Zeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Geschwistern Anne und Max Baumgraß, die mich immer wieder motivierten und mir durch ihre zahlreichen Tipps die Anfertigung der Arbeit erleichterten.

Außerdem möchte ich mich besonders bei meinen Freundinnen Vivien Pillasch, Stefanie Müller und Sarah Thiele für den fachlichen Austausch, ihren Optimismus und ihre unerschütterliche Zuversicht bedanken, die nicht zuletzt die Fertigstellung dieser Arbeit möglich gemacht haben.

13 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 25.11.2019

Sophie Nast



9 783967 290455
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-045-5