

Aus dem Julius Wolff Institut für
Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Experimentelle Untersuchung einer biodegradierbaren und
antibiotikahaltigen Beschichtung von Titanplättchen auf das
Adhäsionsverhalten von *Staphylococcus aureus*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Axel Baumgartner

aus Bad Oldesloe

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	5
Abstract	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1 Historische Vorbemerkungen	11
1.2 Definition der Osteomyelitis	12
1.3 Ätiologie und Pathogenese der Osteomyelitis	12
1.4 Implantatassoziierte Infektionen in der Chirurgie des Bewegungsapparates	13
1.4.1 Häufigkeit	13
1.4.2 Erregerspektrum	14
1.4.3 Pathogenese	14
1.4.3.1 Fremdkörperreaktionen	16
1.4.3.2 Der bakterielle Biofilm.....	18
1.4.4 Therapie und Prophylaxe	19
1.5 Beschichtung mit biodegradierbaren Substanzen – das Polymer Poly- Laktid	20
1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Versuchskeim	22
2.2 Implantate	22
2.3 Beschichtung und Beschichtungstechnik	23
2.4 Versuchsgruppen und Versuchsaufbau	23
2.5 Mikrobiologische Analyse und Quantifizierung adhärrierender Bakterien auf der Oberfläche unterschiedlich beschichteter Plättchen	25
2.5.1 Materialliste	25

2.5.2	Herstellung der Keimsuspension	27
2.5.3	Quantifizierung der Keime in der Ausgangssuspension	28
2.5.4	Inkubation der Plättchen in den Bakteriensuspensionen	29
2.5.5	Aufbereitung der Plättchen nach Inkubation	30
2.5.6	Quantifizierung adhärenter Bakterien auf den Implantatoberflächen.....	30
2.6	Fluoreszenzmikroskopische Analyse und Quantifizierung	31
2.6.1	Materialliste	31
2.6.2	Zubereitung und Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffs	32
2.6.3	Quantifizierung der Keime auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.....	32
2.7	Rasterelektronenmikroskopische Analyse	33
2.7.1	Materialliste	33
2.7.2	Vorbereitung der Plättchen für die Elektronenmikroskopie	33
2.7.3	Analyse der Plättchenoberfläche	34
2.8	Statistische Auswertung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Mikrobiologische Auswertung.....	35
3.1.1	Ausgangskonzentrationen der Bakterien in den verwendeten Nährlösungen.....	35
3.1.2	Konzentration der Bakterien in der Nährlösung zu den Entnahmezeitpunkten	35
3.1.3	Quantifizierung der adhärenenten Keime auf den Plättchenoberflächen.....	36
3.1.4	Antibiogramm	38
3.2	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	39
3.2.1	Oberflächeneigenschaften der Plättchen vor Inkubation	39
3.2.2	Oberflächeneigenschaften der Plättchen nach Inkubation in steriler Nährlösung.....	40
3.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen	42

3.2.4	Quantitative Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen	45
3.3	Rasterelektronenmikroskopische Auswertung	47
3.3.1	Oberflächeneigenschaften der unbeschichteten Titanplättchen nach Inkubation in steriler Nährlösung.....	47
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen	48
4.	Diskussion	53
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	53
4.1.1	Mikrobiologische Analyse.....	53
4.1.2	Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse.....	55
4.2	Diskussion der Methoden	58
4.2.1	Keim und Antibiotikum – Probleme <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	58
4.2.2	Freisetzungskinetik und das „Onion“-Prinzip	61
4.3	Limitierung der Untersuchung und Ausblick.....	62
5.	Literaturverzeichnis	64
6.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	72
Anhang	74
Danksagung	74
Lebenslauf	75
Publikationen	78
Eidesstattliche Versicherung	79

Abstrakt

Einleitung

Implantatassoziierte Infektionen sind gefürchtete Komplikationen in der Chirurgie des Bewegungsapparates. *Staphylococcus aureus* ist hierbei der am häufigsten isolierte Erreger. Neben einer zumeist zeit- und kostenintensiven Behandlung ergeben sich für die betroffenen Patienten häufig gravierende sozioökonomische Folgen.

Art und Oberflächenbeschaffenheit von Biomaterialien haben einen Einfluss auf die Pathogenese dieser Infektionen. Die Modifikation von Implantatoberflächen kann somit einen Beitrag in der Prophylaxe implantatassoziiierter Infektionen leisten.

Ziel dieser experimentellen *In-vitro*-Studie war es, die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* auf biodegradierbaren und antibiotikahaltigen Poly(D,L-Laktid)-Beschichtungen (PDLLA) von Titanplättchen zu untersuchen.

Methodik

Folgende Modifikationen der Titanplättchen wurden untersucht:

- I. pures Titan
- II. PDLLA-Beschichtung
- III. PDLLA+10 % Gentamicin-Beschichtung
- IV. PDLLA+10 % Gentamicin-Beschichtung und extra PDLLA-Überzug

Die unterschiedlich beschichteten Plättchen wurden in einer *Staphylococcus aureus*-Bakteriensuspension über einen Zeitraum von insgesamt 24 h inkubiert.

Nach 1 h, 6 h, 12 h und 24 h wurden die Plättchen hinsichtlich ihrer bakteriellen Besiedelung mikrobiologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden nach einer Inkubationszeit von 1 h und 12 h rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Ergebnisse

Nach der mikrobiologischen Auswertung wiesen die Plättchen mit PDLLA+10 % Gentamicin zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zu den antibiotikafreien Plättchen signifikant geringere Keimanhaftungen auf. Nach einer Inkubationszeit von 6 h erwiesen sich diese Plättchen nach der mikrobiologischen Analyse sogar als steril.

Die Plättchen mit Gentamicin und Extrapolymerschicht zeigten ebenfalls nach 1 h Inkubation eine Inhibition der Bakterienadhäsion. Im Verlauf nahm die Bakterienadhäsion jedoch im Vergleich zur PDLLA+10 % Gentamicin-Gruppe stärker zu.

Die wirkstofffreie Beschichtung mit dem Trägermaterial PDLLA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Anhaftung.

Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopisch bestätigte sich die Wirkung des Gentamicins auf den Plättchen der PDLLA+10 % Gentamicin-Gruppe. Innerhalb der ersten 12 h Inkubation war das Keimwachstum auf den unbeschichteten Titanplättchen deutlich größer als auf den mit PDLLA+10 % Gentamicin beschichteten Plättchen.

Vereinzelt war erkennbar, dass die Bakterien von einer Substanz bedeckt waren. Hierbei handelt es sich möglicherweise um das morphologische Korrelat des Biofilms.

Schlussfolgerung

Durch eine antibiotikahaltige Beschichtung von Titanplättchen konnte innerhalb der ersten 12 h *in vitro* eine deutliche Reduktion der Keimzahl auf den Implantatoberflächen nachgewiesen werden.

Das könnte der entscheidende zeitliche Vorsprung sein, den die körpereigenen Zellen benötigen, um das „*race for the surface*“ gegen die Bakterien zu gewinnen.

Abstract

Introduction

Implant associated infections are feared complications in orthopedic and trauma surgery. *Staphylococcus aureus* is the most frequent isolated pathogen. Next to an expensive long-term treatment also the social economic factors have to be taken into account. Nature and surface character of biomaterials influence the pathogenesis of an infection. Therefore the modification of implant surfaces can contribute to the prophylaxis of implant associated infections.

The aim of this experimental *in-vitro*-study was to examine the effects of biodegradable and antibiotic-containing poly(D,L-lactide) coatings (PDLLA) of titanium implants on the adhesion of *Staphylococcus aureus*.

Methods

The following modifications of titanium implants were tested:

- I. pure titanium
- II. PDLLA-coating
- III. PDLLA+10 % gentamicin-coating
- IV. PDLLA+10 % gentamicin-coating and additional PDLLA-coating

The different implants were incubated in a bacterial suspension with *Staphylococcus aureus* over a timespan of 24 h.

After 1 h, 6 h, 12 h and 24 h the implants were examined microbiological as well as with a fluorescence microscope in regard to the bacterial colonisation. Additionally they were also examined with a scanning electron microscope after an incubation time of 1 h and 12 h.

Results

In the microbiological evaluation the PDLLA+10 % gentamicin coated implants showed in comparison to the groups without antibiotics at all incubation times a significant lower rate of bacterial colonisation. After the incubation time of 6 h the microbiological evaluation showed that these implants were even sterile.

The implants coated with gentamicin and the additional polymer layer also showed after 1 h of incubation an inhibition of bacterial adhesion. But over the course of time the bacterial adhesion showed a stronger increase compared to the PDLLA+10 % gentamicin-

group.

The agent free PDLLA coating had no significant effect on the bacterial adhesion.

The effect of gentamicin on implants of the PDLLA+10 % gentamicin-group was confirmed by fluorescence and scanning electron microscope. Within the first 12 h of incubation the bacterial growth was clearly higher on the uncoated implants than on the PDLLA+ 10% gentamicin coated implants.

In patches bacteria were covered in a substance, possibly the morphological correlate of the biofilm.

Conclusion

Within the first 12 h the antibiotic coating of titanium implants reduced *in vitro* the bacterial adhesion on the implant surfaces. This could be the essential temporal advantage for the cells in the human body to win the „*race for the surface*” against the bacteria.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aqua dest.	aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CSA	Casein-Sojamehl-Pepton-Agar
CSL	Casein-Sojamehl-Pepton-Lösung
et al.	et altera
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HMDS	Hexamethyldisilazan
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
IL	Interleukin
i. S.	im Sinne
Jhd. v. Chr.	Jahrhundert vor Christus
KBE	Kolonienbildende Einheiten
KCL	Kaliumchlorid
K-Draht	Kirschner-Draht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
n	Menge
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
nm	Nanometer

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDLA	Poly(D-Laktid)
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
PGA	Polyglykolsäure
PGE	Prostaglandine
PLA	Poly-Laktid
PLLA	Poly(L-Laktid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	Small colony variant
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UTN	Unreamed tibial nail
Vol. %	Volumenprozent
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Historische Vorbemerkungen

Weichteil- und Knocheninfektionen sind von jeher ein schwerwiegendes klinisches Problem. In Antike und Mittelalter stand die chirurgische Therapie im Vordergrund. So wird bereits im Corpus Hippocraticum (4.–5. Jhd. v. Chr.) die Entfernung nekrotischen Knochenmaterials erwähnt (Kapferer R, 1939).

Die operative Behandlung von Frakturen kam im 19. Jahrhundert zunehmend zum Einsatz. Der Franzose J.F. Malgaigne (1806–1865) entwickelte eine Operationsmethode zur Versorgung der Patellaquerfraktur, wobei die dislozierten Knochenfragmente durch eine Kralle aus Metall reponiert werden konnten. Diese Kralle kann als Vorgänger des Fixateur externe bezeichnet werden (Povacz F, 2007). Nach Einführung der Antisepsis durch den englischen Chirurgen J. Lister (1827–1912), einem Anhänger der Lehre von Pasteur und später der Asepsis, konnte der Weg der Osteosynthese weiter begangen werden. Erstmals stellte der deutsche Chirurg C. Hansmann (1852–1917) im Jahre 1886 auf dem deutschen Chirurgenkongress seine Plattenosteosynthese vor, die aus vernickeltem Stahlblech bestand. Im Rahmen dieses Kongresses wurde eine weitere Osteosynthese durch H. Bircher (1850–1923) vorgestellt, nämlich die Markraumbolzung mittels eines Zapfens aus Elfenbein bei Frakturen der Röhrenknochen (Povacz F, 2007). Obwohl die Erkenntnis der Antisepsis und Asepsis zunehmend an Bedeutung gewann, kam es jedoch nach Operationen zunächst immer wieder zu Infektionen des Weichteil- und Knochengewebes, sodass sich dieses Prinzip aufgrund der hohen Komplikationsraten zunächst nicht durchsetzte. Für diese hohe Infektionsrate gab es folgende Gründe: zum einen die schlechten hygienischen Bedingungen während der Operation, zum anderen die Verwendung von korrosionsanfälligen Metall (Luhr HG, 2000).

Als der schottische Bakteriologe Sir A. Fleming dann 1928 das Antibiotikum Penicillin entdeckte, wofür er 1945 den Nobelpreis erhielt, war das ein Meilenstein der Medizin. Obwohl die antibiotische Wirkung des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* bereits bekannt war, konnte erst 1941 der erste Patient mit Penicillin behandelt werden. Es kam immer wieder zu Schwierigkeiten, den Stoff in nennenswerter Menge zu isolieren. Mit dem Penicillin stand ein Mittel gegen die hohen Infektionsraten nach operativen Eingriffen zur Verfügung. Die Erfolge des Penicillins führten zur Suche und Entdeckung vieler weiterer Antibiotika (Povacz F, 2007).

Die Weiterentwicklung der Osteosynthesematerialien führte zusätzlich zu einer Reduktion der Infektrate nach osteosynthetischer Frakturversorgung. Es wurde 1958 in der Schweiz die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) gegründet, die sich mit der Forschung und Entwicklung neuer Techniken und Materialien im Bereich der Traumatologie beschäftigt. In der Vergangenheit wurde noch vorzugsweise als Implantatmaterial Edelstahl verwendet, während heute in Deutschland überwiegend Implantate aus Titan eingesetzt werden. Die Vorteile des Titans liegen in einer besseren Verträglichkeit und einer geringeren Infektrate (Arens S, 1996).

Gegenstand der heutigen Forschung ist die Entwicklung und Optimierung biodegradierbarer Oberflächenbeschichtungen für Implantate, die z. B. Wachstumsfaktoren zur schnelleren Frakturheilung freisetzen (Schmidmaier G, 2001) oder antimikrobielle Substanzen, wie Antibiotika (Schmidmaier G, 2006) oder Metallionen (Akiyama T, 2013).

1.2 Definition der Osteomyelitis

Als Osteomyelitis wird eine infektiöse Entzündung des Knochenmarks bezeichnet. Schwierigkeiten ergeben sich aus der uneinheitlichen begrifflichen Definition der Infektion (Hansis M, 1997). So werden die Begriffe Osteitis und Osteomyelitis häufig synonym gebraucht, wenn auch Osteitis die korrekte Bezeichnung wäre, da es sich beim Knochen um eine physiologische Einheit, bestehend aus Periost, Markraum und Endost handelt (Kutscha-Lissberg F, 2002).

Eine Einteilung der Osteomyelitis kann nach dem Erreger in eine unspezifische und spezifische, nach dem klinischen Bild in eine akute, subakute und chronische Form sowie nach der unten stehenden Pathogenese erfolgen.

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Osteomyelitis

Die Osteomyelitis kann hämatogen, fortlaufend (*per continuitatem*) oder posttraumatisch bzw. postoperativ entstehen.

Im Falle einer hämatogenen oder endogenen Osteomyelitis werden die Keime von einem Infektionsherd, der sich weit außerhalb des Knochens befinden kann, durch den Blutkreislauf verbreitet und können so in den Markraum des Knochens gelangen. Diese Form tritt vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen auf.

Eine *per continuitatem* fortschreitende Infektion des Knochens wird durch eine Infektion des umgebenden Weichteilgewebes verursacht.

Die posttraumatische bzw. postoperative oder auch exogene Form der Osteomyelitis

wird durch Bakterien verursacht, die z. B. in Verbindung mit einer offenen Fraktur in den Körper und somit bis in den Markraum des Knochens eindringen können. Dies führt zur Kontamination und kann dann eine Infektion der Wunde zur Folge haben.

Ob die Anwesenheit von Keimen zu einer klinisch manifesten Infektion führt oder nicht, ist von individuellen Faktoren des Patienten abhängig. Es seien hier die Beeinträchtigung des Immunsystems bei Host-B-Patienten entsprechend der Cierny-Mader-Klassifikation (siehe Tabelle 1) genannt (Heppert V, 2002).

Tab. 1: Cierny-Mader-Klassifikation (mod. nach Heppert V, 2002)

Host A	Host B	Host C
Normaler Immunstatus	Immunschwäche Unterernährung Hohes Alter Diabetes mellitus Alkoholabusus Malignom Chronische Hypoxie Nieren-/Leberversagen	Inoperabel

1.4 Implantatassoziierte Infektionen in der Chirurgie des Bewegungsapparates

1.4.1 Häufigkeit

Bei elektiven Eingriffen in der Endoprothetik wird über Inzidenzraten implantatassoziiertes Wundinfektionen zwischen 0,5 % und 2 % berichtet (Geipel U, 2004). Einen nicht unwesentlichen Einfluss scheint dabei die Häufigkeit des vorgenommenen Eingriffs zu haben. So konnte z. B. für Hüftprothesen in spezialisierten Kliniken mit 0,2 % eine deutlich geringere Inzidenz tiefer Wundinfekte gegenüber 4 % in weniger spezialisierten Kliniken nachgewiesen werden (Costerton B, 2004). Bei 209.000 künstlichen Hüftgelenken, die im Jahr 2013 in Deutschland implantiert wurden (BVMed e.V., 2013), hieße das, dass bei einer Infektionsrate von 0,2 %, de facto nur 418 Patienten von einer tiefen Wundinfektion betroffen sind, während bei einer 20× höher liegenden Infektionsrate von 4 % bereits 8360 Patienten behandelt werden müssten.

Deutlich höher als bei elektiven Eingriffen ist das Infektionsrisiko in der operativen Behandlung offener Frakturen. Abhängig von dem Ausmaß der Gewebetraumatisierung beträgt dieses zwischen 15 % und 40 % (Tsukayama T, 1999); beschrieben wurden

aber auch Infektraten von bis zu 60 % (Yokoyama K, 2009).

1.4.2 Erregerspektrum

Die Verursacher fremdkörperassoziierter Infektionen sind häufig Saprophyten, z. B. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Candida albicans*, oder Keime, die in der Umgebung ubiquitär vorhanden sind (z. B. *Pseudomonas aeruginosa*) (Geipel U, 2004; Gristina AG, 1994) (Tab. 2).

Tab. 2: Anteil verschiedener Erreger implantatassoziierter Infektionen (nach Geipel U, 2004)

Pathogen	Häufigkeit %
Staphylokokken , davon - Koagulasenegative Staphylokokken - <i>Staphylokokkus aureus</i>	50–60 25–35 25
Gramnegative, aerobe Stäbchenbakterien (u. a. Enterobacteriaceae, wie <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> sowie nicht fermentierende Erreger wie <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Alcaligenes spp.</i>)	20
Streptokokken (<i>S. agalacticae</i> , sog. „Viridans-Streptokokken“, seltener andere)	10–15
Anaerobier (u. a. <i>Probionibacterium spp.</i> , <i>Peptostreptokokken</i> , <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Veillonella parvula</i>)	7–10
Andere Erreger	2
Ohne Erregernachweis	10
Polymikrobiell	10–15

1.4.3 Pathogenese

Der erste Schritt bei der Entwicklung einer implantatassozierten Infektion besteht im Anhaften der Keime an der Implantatoberfläche.

Das klassische Konzept der Adhäsion, die sog. DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek)-Theorie aus den 1980er-Jahren beruht auf der Interaktion zwischen der

Oberfläche des Fremdkörpers und dem Bakterium. Neben thermodynamischen Faktoren sind chemische Bindungen von Bedeutung, abhängig von der räumlichen Distanz zwischen Bakterium und Oberfläche. Bei einem Abstand >50 nm überwiegen Van-der-Waals-Kräfte, die Bindung ist reversibel. Zwischen 10 und 20 nm kommen elektrostatische Kräfte hinzu, die Bindung ist anfangs noch reversibel, später irreversibel (Blenkinsopp SA, 1991).

Untersuchungen zeigten, dass für die Adhäsion außer den physikochemischen Kräften Oberflächenstrukturen der Bakterien eine wesentliche Rolle spielen. Eine irreversible Adhäsion kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass eine Matrix aus Exopolysacchariden der Bakterien dazu führt, dass die Distanz zwischen Zelle und Oberfläche überbrückt wird. Fimbrien und Pili der Bakterien sind in der Lage, die elektrostatische Abstoßung zu vermindern und die Zellen hydrophober zu machen. Bakterien mit solchen Oberflächenstrukturen weisen eine stärkere Tendenz zur Adhäsion auf als solche ohne (Costerton B, 2004). Körpereigene Proteine wie Albumin, Fibronectin oder Fibrinogen bilden einen „*conditioning film*“ auf dem Fremdkörper, der ebenfalls die Adhäsion begünstigt, wahrscheinlich über die Bindung von Bakterienrezeptoren an diese Moleküle (Geipel U, 2004; Gristina AG, 1994); diese werden bei *Staphylococcus aureus* über sog. MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) gesteuert (Patti JM, 1994). Besonders anfällig sind Knochen und Knorpelgewebe, weil sie zellarm und kollagenreich sind. Bakterien wie *Staphylococcus aureus* scheinen die Fähigkeit zu besitzen, direkt an Kollagen zu binden, das am traumatisierten Knochen besonders exponiert ist (Cook G, 2000; Tsukayama, 1999). Ist dieser jedoch bereits von einer Schicht körpereigener Zellen bedeckt, führt das zu einer deutlich verbesserten Abwehrlage.

In diesem Sinne spricht man bei Knochen, aber auch bei Oberflächen von Fremdmaterialien, von einem „*race for colonization of the biomaterial surface*“ (Gristina AG, 1994). Grundsätzlich ist ein gesundes Immunsystem in der Lage, das überschießende Wachstum saprophytärer Keime zu verhindern. Eine zu einer klinisch manifesten Infektion führende Keimzahl setzt daher weitere Mechanismen voraus, die die Erreger vor dem Immunsystem schützen. Dieses sind vorrangig die Bildung einer Bindegewebskapsel im Rahmen einer Fremdkörperreaktion und die Produktion eines Biofilms durch die Bakterien.

1.4.3.1 Fremdkörperreaktionen

Orthopädische Implantate stellen im Organismus Fremdkörper dar, werden als solche vom Immunsystem erkannt und rufen entsprechende Reaktionen des Organismus hervor. Bei Metallen stehen elektrochemische Prozesse (Korrosion) im Vordergrund, die zur Freisetzung einer Kaskade von Mediatoren führen, wie z. B. Histamin, Serotonin, Komplementfaktoren, Prostaglandine, Zytokine etc. (Tsukayama T, 1999).

Der Fremdkörper wirkt als Reiz, der mit einer Entzündungsreaktion beantwortet wird und zur Bildung einer – abhängig von der Reaktivität des Fremdkörpers – mehr oder weniger ausgeprägten bindegewebigen Kapsel führt. Faktoren, die diese Reaktion beeinflussen, sind u. a. die Form des Fremdkörpers, seine Oberflächenstruktur, seine physikochemischen Eigenschaften und der Grad seiner Löslichkeit. Hohe Löslichkeit sowie raue und poröse Oberflächen begünstigen die Entstehung einer Fremdkörperreaktion (Schakenraad JM, 1991). Je enger die Bindegewebskapsel Kontakt mit dem Implantat hat, desto geringer ist der minderdurchblutete „Totraum“, in dem Bakterien vor der körpereigenen Abwehr geschützt gedeihen können (Harris LG, 2006). Fibroblasten führen zur Akkumulation von Plasmazellen, Makrophagen und Lymphozyten, die wiederum proinflammatorische Substanzen freisetzen (z. B. IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , PGE) (Hallab NJ, 2004). Andererseits wird die Freisetzung anderer Faktoren wie Interleukin-2 oder Interferon- γ verhindert (Heppert V, 2002). Man geht davon aus, dass die Abbauprodukte der Fremdkörper Makrophagen zur massiven Produktion von Radikalen und chemotaktischen Faktoren anregen. Durch diese Radikale entstehen weitere Gewebeschäden und die Abwehrfunktion ist im Falle einer bakteriellen Kontamination stark geschwächt (Gristina AG, 1994). Eine weitere Konsequenz der Freisetzung der Zytokine ist der Knochenabbau durch Aktivierung von Osteoklasten und Inhibition von Osteoblasten (Wagner C, 2006).

Die unten stehende Abbildung 1 gibt einen Teil der Interaktionen nach Implantation eines Fremdkörpers wieder.

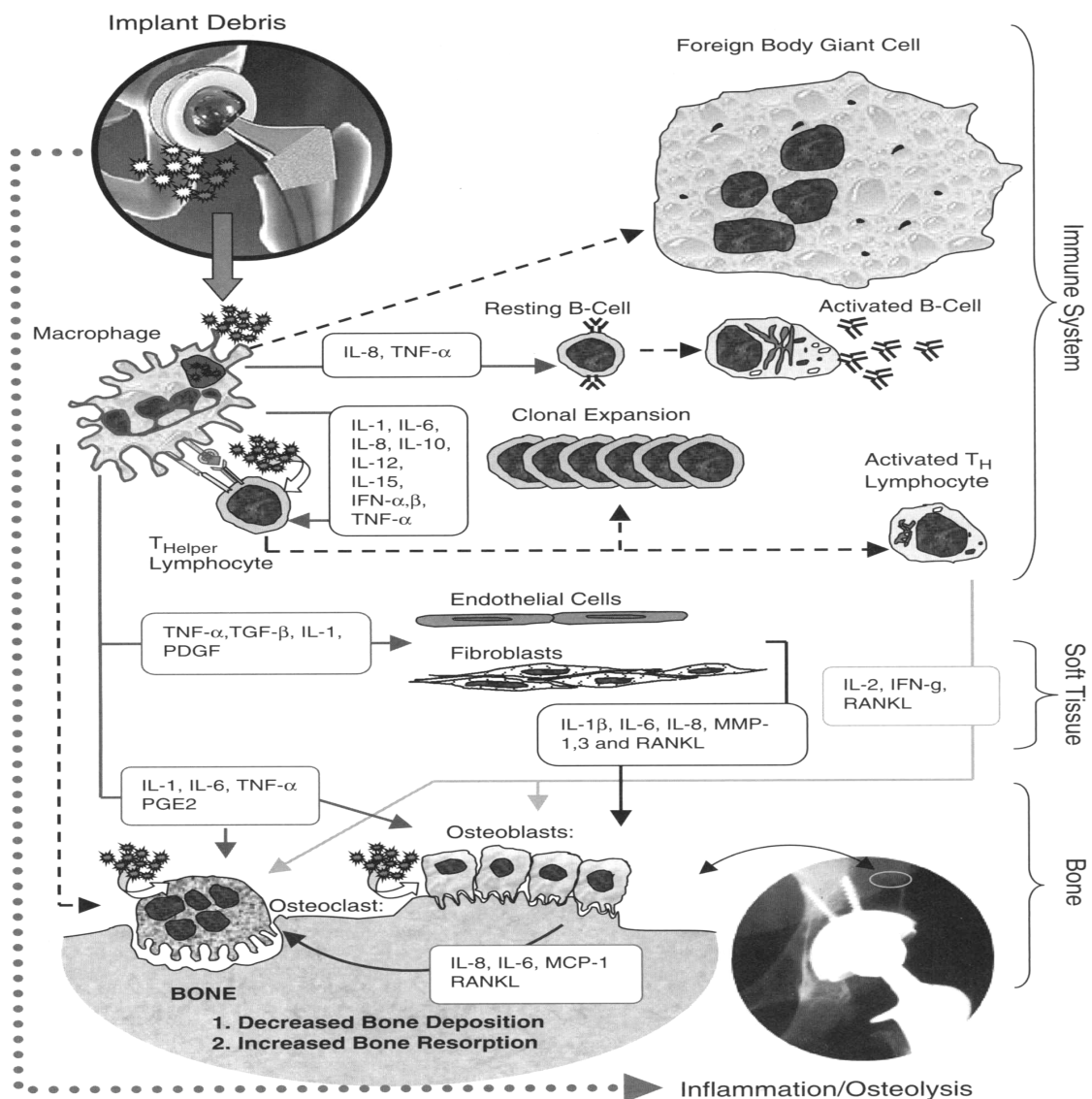


Abb. 1: Reaktion auf Fremdkörper (Hallab NJ, 2004)

Auswirkungen auf die Adhäsion und letztlich die Infektrate des Implantats haben auch das Material, die Struktur des Implantats sowie die Keimart und der pH-Wert der Umgebung.

Titan eignet sich aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften besonders als Implantatmaterial: hohe Festigkeit, geringes Gewicht und der Korrosionswiderstand. Zudem können Osteoblasten Titanimplantate schneller kolonisieren; dies könnte die Oberfläche vor der Bakterienadhäsion zumindest vorerst schützen (Cordero J, 1994). Es erweist sich somit als ausgesprochen biokompatibel.

1.4.3.2 Der bakterielle Biofilm

Staphylococcus aureus und koagulasenegative Staphylokokken, wie *Staphylococcus epidermidis* sind die häufigsten Verursacher nosokomialer und fremdkörperassoziierter Infektionen in Verbindung mit der Bildung von Biofilmformationen (Otto M, 2008). Unter dem Begriff „Biofilm“ versteht man bakterielle Mikrokolonien, die in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert sind. Diese Formation ist untereinander mit Kanälen verbunden (Costerton JW, 1995), über die ein An- und Abtransport von Nährstoffen bzw. Stoffwechselprodukten ermöglicht wird (Davies DG, 1998). Eine Kommunikation zwischen den Mikrokolonien auf Zellebene, das sog. „quorum sensing“, ist bekannt und Gegenstand aktueller Forschungen (Solano C, 2014).

Die Biofilmbildung erfolgt in mehreren Stufen. Die frei schwimmenden planktonischen Zellen binden sich vorerst reversibel mittels schwacher Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophober Wechselwirkungen mit dem Substrat an die Oberfläche eines Implantates. Es folgt die nunmehr irreversible Bindung an der Oberfläche des Fremdkörpers z. B. mittels Fimbrien (Pili) und anderer komplexer Glykoproteinstrukturen. Während der Proliferation, d. h. der Entwicklung von Mikrokolonien, wird die Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen gebildet (Seong-Cheol P, 2011).

Innerhalb des Biofilms sind die Bakterienpopulationen vor dem Zugriff des zellulären und humoralen Immunsystems sowie vor der Wirkung von Antibiotika geschützt (Olson ME, 2002). Die Matrix bildet eine Penetrationsbarriere für Antibiotika. Die Diffusionsstrecke wird verlängert, sodass die Wirkspiegel innerhalb des Biofilms zu niedrig sind (Jansen B, 1993). Der Stoffwechsel der Bakterien ist innerhalb der sessilen Form herabgesetzt und die Reproduktion ist reduziert. Darüber hinaus werden die Bakterien möglicherweise durch den Biofilm gebunden und/oder inaktiviert (Darouiche RO, 1994; Gracia E, 1998). Deutlich höhere Konzentrationen an Antibiotika sind erforderlich, um durch einen Biofilm geschützte Bakterien abzutöten (Blenkinsopp SA, 1991; Costerton B, 2004). Hinzu kommt, dass Gewebeschäden durch Trauma, Operation oder entzündliche Prozesse die Blutversorgung und damit auch den Zugang von Faktoren des Immunsystems weiter einschränken (Ochsner PE, 2006).

Charakteristisch für fremdkörperassozierte Infektionen ist, dass die Symptome nicht selten erst lange Zeit nach der Implantation des Fremdkörpers auftreten (Costerton B, 2004). Das späte Auftreten der Entzündungszeichen erklärt sich nach der Biofilmtheorie damit, dass die Keime innerhalb des Biofilms a) wenig Toxine produzieren und b) vor

dem Immunsystem und Antibiotika geschützt sind.

1.4.4 Therapie und Prophylaxe

Die Behandlung implantatassoziiertes Infektionen ist schwierig, kostenintensiv und für den Patienten belastend, da sie in der Regel ein invasives Vorgehen erfordert.

Die Infektion kann eine lange und mitunter schmerzhaft Behandlung notwendig werden lassen, wobei letztlich der Funktionsausfall oder die Amputation der betreffenden Extremität folgen kann. Selbst ein radikales chirurgisches Débridement führt nicht immer zu einer vollständigen Beseitigung der Keime, weshalb eine additive Behandlung mit lokaler und/oder systemischer Antibiose erforderlich ist. Die Erfolgsaussichten eines solchen Vorgehens werden mit 50–60 % beschrieben (Wodtke J, 2008). Bei Versagen dieser Maßnahmen bleiben nur Implantatentfernung und Resektion des infizierten Weichteil- und Knochengewebes.

Um die Inzidenz einer Infektion zu reduzieren, spielen mehrere Faktoren eine Rolle.

Genannt seien aseptische moderne, d. h. gewebeschonende Operationsverfahren in Reinraum-Operationssälen sowie die Erfahrung des Operateurs (Cioffi GA, 1988; Kalicke T, 2004). Eine große Bedeutung kommt zudem der perioperativen systemischen Antibiotikagabe zu (Campoccia D, 2006), wodurch die Inzidenz postoperativer Wundkomplikationen deutlich gesenkt werden konnte (Periti P, 1999).

Sollte eine längerfristige antibiotische Therapie notwendig sein, so ist diese neben einer möglichst erregerspezifischen Therapie an das individuelle Risikoprofil des Patienten anzupassen. Zu beachten sind die unspezifischen und spezifischen Nebenwirkungen der Antibiotika (Keeney KM, 2014; Singh R, 2014). Bei einer eingeschränkten Blutversorgung im traumatisierten Gebiet muss häufig eine höhere Konzentration des Antibiotikums verabreicht werden, wobei sich die Dosierungen schnell im toxischen Bereich mit unerwünschten Wirkungen wie Oto- und/oder Nephrotoxizität befinden können (de Lalla, 1999; Mader JT, 1999).

Infolgedessen kommt der Prophylaxe eine große Bedeutung zu. Die Optimierung der Implantatmaterialien sowie die Beschichtung mit Wirkstoffen ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Seit Buchholz und Engelbrecht im Jahre 1970 erstmals über die Verwendung von antibiotikahaltigem Knochenzement berichteten (Buchholz HW, 1970) hat es nicht an Versuchen gefehlt, bakterizide Substanzen direkt an den „*locus minoris resistentiae*“ zu bringen. Dies könnte den körpereigenen Zellen den entscheidenden Vorsprung ver-

schaffen, das „*race for the surface*“ (Gristina AG, 1994) zu gewinnen.

1.5 Beschichtung mit biodegradierbaren Substanzen – das Polymer Poly-Laktid

Die wesentlichen Anforderungen an einen medizinisch verwendbaren Fremdkörper lauten „*not doing damage, not being damaged*“ (Hallab NJ, 2004).

Biodegradierbare Polymere finden als Matrixmaterial zur Freisetzung von Arzneistoffen vielfältige Verwendung. Der Vorteil liegt in einer lokalen Freisetzung mit maximalen Wirkspiegeln direkt am gewünschten Ort.

Poly-Laktid wurde erstmalig in den 1950er-Jahren zusammen mit Polyglykolsäure (PGA) als Nahtmaterial verwendet. Es entsteht durch ringöffnende Polymerisation von Lactonen (Schakenraad JM, 1991). Der Abbau der Polymilchsäuren erfolgt durch hydrolytische Aufspaltung des Polymers mit anschließender Verstoffwechslung der Monomere im Zitratzyklus. Nur ca. 8 % erscheinen in Urin und Faeces (Bostman, 1991; Brady JM, 1973). Die Gewebeverträglichkeit von Poly-Laktiden wird als gut beschrieben, histologisch zeigt sich eine eng anliegende Bindegewebskapsel. Gelegentlich treten milde Fremdkörperreaktionen auf, die auch nach mehreren Jahren noch symptomatisch werden können (Athanasidou KA, 1998; Bergsma JE, 1995; Bostman, 1991). Das Abbauprodukt Milchsäure ist eine relativ starke Säure, die bei Auftreten in höherer Konzentration für die Gewebereaktion verantwortlich sein könnte (Athanasidou KA, 1998; Heller J, 2004; Kohn J, 2004). Die Abbaugeschwindigkeit des Poly(D,L-Laktid) liegt bei 12–16 Monaten (Lendlein A, 1999). Der Abbau dauert *in vivo*, abgesehen von einem initialen „*burst-effect*“ (Kälicke T, 2006), länger als *in vitro*, wahrscheinlich aufgrund der bindegewebigen Kapsel, die sich um das Implantat bildet (Schakenraad JM, 1991). Die Freisetzung des Wirkstoffes hingegen scheint *in vivo* schneller zu sein (Baro M, 2002; Kälicke T, 2006; Tas C, 1998).

In der vorliegenden Studie wurde Poly(D,L-Laktid) als lokaler Wirkstoffträger verwendet, wobei mittels einer Kaltbeschichtungstechnologie das Antibiotikum Gentamicin in einer Konzentration von 10 % w/w eingearbeitet wurde. Die auf Titanimplantate aufgebraute etwa 10 µm messende lackartige Schicht des PDLLA erwies sich als stabil gegenüber mechanischen Belastungen. Nach Im- und Explantation von PDLLA-beschichteten intramedullären Titanimplantaten zeigte sich ein Verlust der Beschichtungsmasse von unter 5 % (Schmidmaier G, 2001).

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die implantatassoziierte Infektion in der Chirurgie des Bewegungsapparates stellt eine schwerwiegende Komplikation dar. Die Therapie ist für den Patienten langwierig und belastend, für den Kostenträger sehr kostenintensiv.

Dementsprechend groß ist das Bestreben, die Infektionsrate zu reduzieren. Vielversprechend ist der Ansatz, die Oberfläche von Fremdmaterialien mittels biodegradierbarer Beschichtungen zu optimieren sowie diese zusätzlich als lokale Wirkstoffträger zu nutzen.

Es wurden in dieser *In-vitro*-Studie Titanplättchen mit einer Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung versehen bzw. mit PDLLA und Gentamicin in einer Konzentration von 10 % beschichtet. Zusätzlich wurde eine Gruppe gebildet, die zwiebelschalenartig über der antibiotikahaltigen PDLLA-Schicht mit einer weiteren reinen PDLLA-Schicht versehen wurde.

Ziel dieser *In-vitro*-Studie war es, unterschiedlich beschichtete Titanplättchen hinsichtlich der Keimadhäsion zu untersuchen.

Die Keimadhäsion wurde mikrobiologisch, fluoreszenzmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch analysiert.

Auf diese *In-vitro*-Studie kann ein tierexperimentelles Modell aufbauen, um die Möglichkeiten der Prophylaxe einer implantatassoziierten Infektion abschätzen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchskeim

- *Staphylococcus aureus*, Subspezies *aureus* Rosenbach
Kennzeichnung: Wichita
VA 20110-2209, registriert unter Nr.: ATCC 29213 American Typ Culture Collection,
Manassas, USA

Der in den Versuchen verwendete *Staphylococcus aureus* wurde aus einer Wunde eines Patienten mit chronischer Osteomyelitis isoliert. Der Stamm dient der Qualitätskontrolle einiger mikrobiologischer Arbeitsgeräte, seine mikrobiologischen Eigenschaften sind somit bekannt. Der Bakterienstamm ist sensibel auf gängige Antibiotika, wie z. B. Oxacillin, Gentamicin, Erythromycin und Tetracyclin, aber auf Benzylpenicillin resistent (Testung: Vitek® Vollautomat).

2.2 Implantate

Für die Versuche wurden Plättchen aus Reintitan verwendet. Die Plättchen wiesen einen Durchmesser von 5 mm und eine Höhe von 1 mm auf. Sie sind eine Sonderanfertigung der Firma Synthes GmbH (Oberdorf, Schweiz) für diese Studie. Eine Seite der Plättchen wurde zur Identifikation der zu bearbeitenden Oberfläche markiert (Abb. 2).

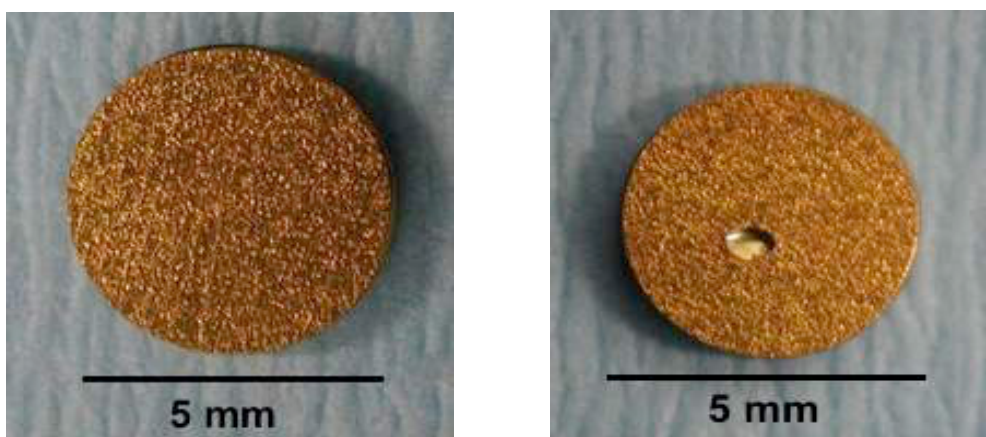


Abb. 2: Ober- und Unterseite (mit Markierung) der verwendeten Titanplättchen

2.3 Beschichtung und Beschichtungstechnik

- Ethylacetat; UN 1173; Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Gentamicinsulfat; Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland
- Poly(D,L-Laktid), (PDLLA); Boehringer, Ingelheim, Deutschland

Mit einem sog. „kalten Beschichtungsverfahren“ (Schmidmaier G, 2001) wurde das Gentamicinsulfat in eine biodegradierbare Poly(D,L-Laktid) Beschichtung eingearbeitet. Die Beschichtung der Titanplättchen erfolgte unter einer Sterilbank. Bei Raumtemperatur wurden 100 mg PDLLA in 1,5 ml Ethylacetat aufgelöst und steril filtriert. Da in dem verwendeten Gentamicinsulfat der Wirkstoff nur zu 60 % vorliegt, in der Beschichtung jedoch eine Konzentration der antibiotisch wirksamen Gentamicinbase von 10 % w/w erreicht werden sollte, wurden 16,6 mg steriles Gentamicinsulfat in der PDLLA-Lösung suspendiert (Magnetrührer, 10 min, 100 rpm). Jeweils 100 µl dieser gentamicinhaltigen Lösung wurden mit einer sterilen Pipette zuerst auf eine Seite der Plättchen gegeben. Die beschichteten Plättchen trockneten bei Raumtemperatur für 20 min. Nach Wendung der Plättchen mit einer sterilen Pinzette wurde die andere Seite beschichtet. Wiederum trockneten die Plättchen bei Raumtemperatur für 20 min. Ein Teil der Plättchen wurde nach der Beschichtung mit dem gentamicinhaltigen Polymer noch mit einer zusätzlichen – antibiotikafreien – Schicht Poly(D,L-Laktid) überzogen. Die unmarkierte Oberseite wurde analysiert (siehe Abb. 2). Abschließend wurden die beschichteten Plättchen in sterilen Tüten luftdicht verpackt und bis zu dem jeweiligen Versuchstag bei Raumtemperatur licht- und feuchtigkeitsgeschützt gelagert.

2.4 Versuchsgruppen und Versuchsaufbau

Es wurden vier Gruppen folgender Modifikationen der Titanplättchen untersucht:

- I. pures Titan
- II. PDLLA-Beschichtung
- III. PDLLA+10 % Gentamicin-Beschichtung
- IV. PDLLA+10 % Gentamicin-Beschichtung und extra PDLLA-Überzug

Insgesamt wurden 130 Plättchen untersucht. 112 dieser Plättchen wurden in einer Bakteriensuspension inkubiert. Die restlichen 18 Plättchen wurden als Negativkontrollen in einer sterilen Nährlösung inkubiert. Diese Negativkontrollen dienten zur Beurteilung der

Oberflächenbeschaffenheit der Plättchen sowie deren Auswirkung auf die fluoreszenzmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse.

Die Gesamtzahl der 130 Plättchen verteilte sich auf die unterschiedlich beschichteten Versuchsgruppen I–IV. Diese wurden zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h, 12 h und 24 h mikrobiologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen erfolgten ausschließlich zu den Zeitpunkten 1 h und 12 h.

Die 112 in der Bakteriensuspension inkubierten Plättchen teilten sich in die vier Versuchsgruppen mit je 28 Plättchen auf. Von diesen 28 Plättchen wurden zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h, 12 h und 24 h jeweils 4 mikrobiologisch und 2 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nur zu den Zeitpunkten 1 h und 12 h wurden jeweils 2 weitere Plättchen auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Eine Übersicht über die Inkubationszeiten sowie die Anzahl der untersuchten Implantate gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Anzahl der in Bakteriensuspension inkubierten Plättchen der Gruppen I–IV

Zeitpunkte	Mikrobiologie	Fluoreszenzmikroskopie	REM	Gesamtzahl
1 h	4	2	2	8
6 h	4	2	-	6
12 h	4	2	2	8
24 h	4	2	-	6
				28 × 4 Grp.
				112

Für die Negativkontrollen in steriler Nährlösung wurden insgesamt 18 Plättchen inkubiert. Die 18 Plättchen verteilten sich wiederum auf die Gruppen I–IV. Über 1 h, 6 h, 12 h und 24 h wurden 16 Plättchen inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde 1 Plättchen pro Gruppe fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die restlichen 2 Plättchen der Negativkontrolle wurden nach 1 h und 12 h rasterelektronenmikroskopisch untersucht, dieses waren Plättchen der Gruppe I (unbeschichtete Titanplättchen). Eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Gruppen II–IV erfolgte nicht. Die mikrobiologische Untersuchung entfiel für alle Implantate der Negativkontrolle.

Eine Übersicht über die Anzahl und Inkubationszeiten der Negativkontrollen gibt Tabelle 4.

Tab. 4: Anzahl der in steriler Nährlösung inkubierten Plättchen der Gruppen I–IV

Zeitpunkte	Mikrobiologie	Fluoreszenzmikroskopie	REM	Gesamtzahl
1 h	-	1 (Grp. I–IV)	1 (Grp. I)	5
6 h	-	1 (Grp. I–IV)	-	4
12 h	-	1 (Grp. I–IV)	1 (Grp. I)	5
24 h	-	1 (Grp. I–IV)	-	4
				18

2.5 Mikrobiologische Analyse und Quantifizierung adhärerender Bakterien auf der Oberfläche unterschiedlich beschichteter Plättchen

2.5.1 Materialliste

- Agarplatten:
Columbia-Blut-Agarplatten: Columbia Agar mit 5 % Schafsblut,
BBL® Stacker® Plates, Becton Dickinson Microbiology Europe, Meylan, Cedex, France
CSA-Platten: Nährbodenküche, Mikrobiologie Berlin-Mitte, Deutschland
- Brutschrank:
Modell: Heraeus Function Line, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Einmalspritzen 5 ml:
B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Kanülen: Neolus 20G 0,9 mm, Terumo Europe N.V.; Leuven, Belgien
- Gefrierschrank für Keime und Mikrobank:
Herafreeze -80 °C, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
- Mc Farland Rührchen:
Suspension Medium, 3 ml, bioMerieux sa, Marcy-l'Etoile, France

- Mikrobank:
Microbank[®], Pro-Lab Diagnostics, Cheshire, United Kingdom
- Mullkompressen zum Trocknen der Implantate:
Mullkompressen 10×10 cm, Rauscher, Wien, Österreich
- Nährbouillon:
CSL-Nährbouillon (Casein-Sojamehl-Pepton-Lösung U.S.P.)
Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England
Zubereitung: 30 g Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Trockensubstanz wurde in 1 l aqua dest. suspendiert. Die Suspension wurde bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Abschließend wurde die Lösung für 15 min bei 121 °C autoklaviert.
- Petrischale:
150×20 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Phosphatpuffer:
Zur Herstellung der *Staphylococcus aureus*-Keimsuspension
Merck, Darmstadt, Deutschland
Material für 2000 ml aqua dest.:
16,0 g NaCl (Merck 6404)
0,4 g KCl (Merck 4936)
2,9 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O (Merck 6580)
0,4 g KH₂PO₄ (Merck 4873)
Zubereitung: In 2000 ml aqua dest. lösen, dann pH auf 7,4 einstellen und anschließend 30 min bei 121 °C im Dampftopf autoklavieren
- Pipetten:
10 ml: Peleusball, Hersteller: D&N, Berlin, Deutschland
alle weiteren: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Reagenzröhrchen für Verdünnungsreihen:
15 ml Röhre/Tube, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Deutschland
- Resistenzbestimmung:
Vitek[®] 2, bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France
Karte: Karte zur Resistenzbestimmung von Staph. Spp. Vitek[®] 2; AST-P515, bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France

- Schütteltisch:
Typ: 4010, Köttermann, Hänigsen, Deutschland
- Spiralometer:
Typ: CU, Mfd. by Spiral System Inc., Cincinnati, USA
- Trübungsmessung:
Modell: Densimat, bioMerieux sa, Marcy-l'Etoile, France
- Ultraschallbad:
Transsonic 310, Elma, Singen, Deutschland
HF- Frequenz: 30 kHz; Schwing. 1PXE
- Vortexer:
Typ: Reax Control, Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Waage zur Herstellung des Phosphatpuffers:
Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
- Zentrifuge:
Typ: 4100, Heraeus-Christ GmbH, Osterode, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen:
Schott, Mainz, Deutschland

2.5.2 Herstellung der Keimsuspension

Zum Herstellen der Keimsuspension wurde ein mit *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 beimpfter Chip der Mikrobank in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit 200 ml steriler CSL-Nährbouillon überführt.

Zusätzlich wurden vier sterile Zentrifugenröhrchen mit jeweils 3 ml derselben sterilen CSL-Bouillon befüllt. Anschließend wurden sowohl die den Keim enthaltende „Chip-Bouillon“ als auch die mit steriler CSL-Bouillon angefüllten Zentrifugenröhrchen 24 h bei 37 °C bebrütet. Hierdurch wurde eine Vermehrung der Keime in der „Chip-Bouillon“ ermöglicht. Bei klarem Aspekt der Zentrifugenröhrchen konnte somit eine akzidentelle Verunreinigung der verwendeten Nährlösung ausgeschlossen werden.

Jeweils 100 µl der Keim enthaltenden „Chip-Bouillon“ wurden in die Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit der CSL-Bouillon vermischt. Um die Keime in eine logarithmi-

sche Wachstumsphase zu überführen, wurden die Zentrifugenröhrchen nun für weitere 3 h bebrütet.

Anschließend wurden die Bakterien durch wiederholte Waschkvorgänge von der Nährlösung gereinigt. Hierzu wurden die Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Die abgesetzten Bakterien wurden anschließend mit 3 ml sterilem Phosphatpuffer wieder aufgeschwemmt und für 30 s bei 1000 rpm gevortext. Nach einem erneuten Waschkvorgang erhielt man das von der CSL-Bouillon gereinigte Bakteriensediment. In einem Mc Farland Standardröhrchen wurden nun Bakteriensediment und steriler Phosphatpuffer anteilig unter Kontrolle des Trübungsmessgerätes durchmischt, bis eine Suspension mit der gewünschten Trübung eines Mc Farland Standards von sechs erreicht war. So konnten Suspensionen mit einer definierten Trübung hergestellt werden. Abschließend wurde die Keimmenge in den jeweiligen Suspensionen bestimmt, diese gekennzeichnet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5.3 Quantifizierung der Keime in der Ausgangssuspension

Die Keimdichte in der Suspension wurde sowohl direkt vor dem Einfrieren als auch am Versuchstag nach langsamem Auftauen bei Raumtemperatur bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Suspensionen erstellt. Mit einem Spiralometer wurden 3 CSA-Platten mit 1 ml der Suspensionen beimpft (siehe Abb. 3a). Die CSA-Platten wurden für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit normierten Schablonen wurden die gebildeten Kolonien auf den Platten ausgezählt und die Anzahl KBE/ml der Suspensionen berechnet (siehe Abb. 3b). Die Auszählung erfolgte über Verdünnungsreihen, damit die KBE auf den CSA-Platten sicher bestimmt werden konnten. Zur Überprüfung erfolgten mehrfache Auszählungen, bei Abweichungen wurde die Auszählung wiederholt. Bei hoher KBE-Dichte wurde zweimal, bei niedriger einmal ausgezählt.

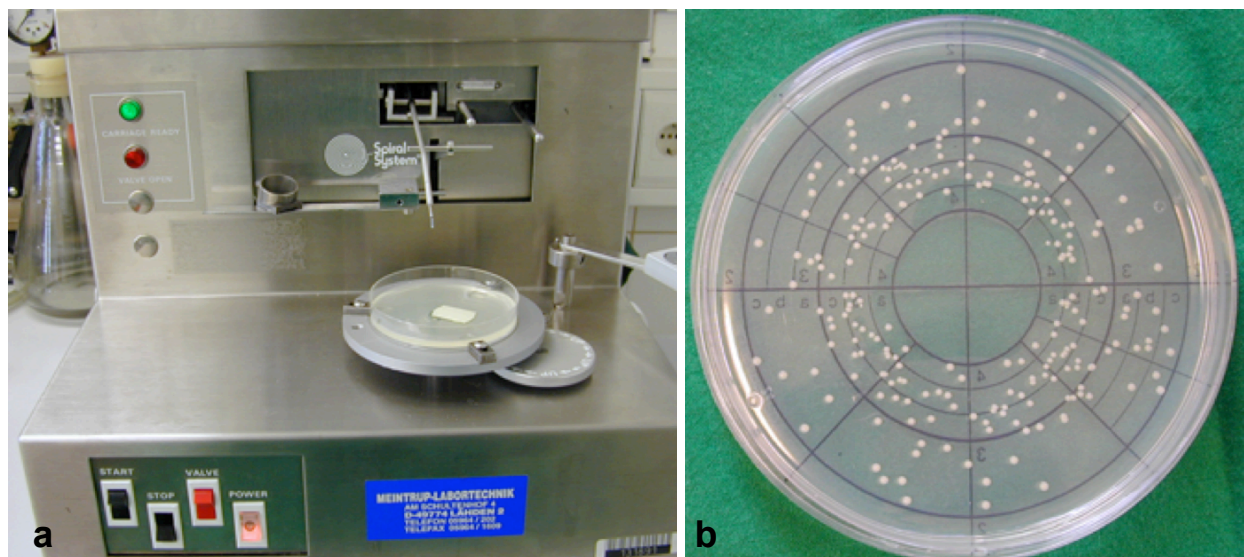


Abb. 3: a) Spiralometer, b) Normierte Schablone mit CSA-Platte zum Auszählen der KBE

2.5.4 Inkubation der Plättchen in den Bakteriensuspensionen

Die Suspensionen für die unterschiedlichen Versuchstage enthielten nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur eine durchschnittliche Keimkonzentration von 3×10^8 KBE/ml. Die Bakteriensuspension wurde auf 3×10^7 KBE/ml verdünnt und anschließend wurde 1 ml hiervon mit 99 ml der CSL-Nährbouillon in eine große sterile Petrischale gegeben, insgesamt also 100 ml pro Schale. Die Keimkonzentration in der Petrischale betrug nun durchschnittlich 3×10^5 KBE/ml. Anschließend wurden mithilfe einer sterilen Pinzette alle 28 Plättchen der Gruppen I in eine Petrischale gelegt und 28 Plättchen der Gruppen II (unbeschichtet und PDLLA-beschichtet) in eine weitere Petrischale gelegt. Die 28 Plättchen der Gruppe III dagegen (PDLLA+10 % Gentamicin) wurden entsprechend der Inkubationszeiten auf je vier Petrischalen verteilt. Mit den Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) wurde entsprechend verfahren. So befanden sich die antibiotikabeschichteten Implantate eines jeden Entnahmezeitpunktes in jeweils einer eigenen Petrischale. Die Inkubation der beschickten Petrischalen aller Gruppen erfolgte bei 37 °C auf einem Schütteltisch mit niedriger Schüttelfrequenz (10 rpm) in einem Brutschrank.

Zu den Zeitpunkten 1 h und 12 h wurden jeweils 8 Plättchen pro Gruppe zur weiteren Untersuchung mit einer sterilen Pinzette aus der Petrischale entfernt. Nach 6 h und 24 h Inkubation waren es jeweils 6 Plättchen pro Gruppe, da zu diesen Zeitpunkten, wie bereits voran beschrieben, keine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte (siehe Tab. 3).

Zu jedem Zeitpunkt der Implantatentnahmen wurden aus den Nährmedien Proben von 1 ml entnommen. Aus diesen wurden in oben geschilderter Weise mit dem Spiralometer die aktuellen Keimdichten der Nährlösungen zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten bestimmt. Hierzu wurden jeweils 3 CSA-Platten pro Gruppe und Zeitpunkt beimpft, die KBE ausgezählt und der jeweilige Mittelwert bestimmt.

2.5.5 Aufbereitung der Plättchen nach Inkubation

Nach erfolgter Inkubation wurden alle Plättchen einzeln unter sterilen Bedingungen in Reaktionsgefäße mit 2 ml sterilem Phosphatpuffer (PBS) überführt. In diesen wurden die Implantate behutsam auf einem Schütteltisch für 10 min mit niedriger Frequenz von 10 rpm gespült, um nicht adhärenente Bakterien von der Plättchenoberfläche zu entfernen. Anschließend wurden die Plättchen für 30 min zum Trocknen auf einer sterilen Mullkompressen in eine Petrischale gelegt. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden die Plättchen einzeln in sterilen Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur vorübergehend gelagert. Die mikrobiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten im direkten Anschluss.

Bis zur Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die entsprechenden Implantate in sterilen Reaktionsgefäßen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Mit den Implantaten der Negativkontrolle wurde analog verfahren, nur dass die CSL-Nährbouillon keine Bakterien enthielt. Zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h, 12 h und 24 h wurde ein Plättchen pro Gruppe zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Effektes der Inkubation in der reinen Nährlösung auf die Oberflächeneigenschaften verwendet. Rasterelektronenmikroskopisch wurde ein unbeschichtetes Plättchen der Gruppe I nach 1 h und ein weiteres Plättchen nach 12 h untersucht (siehe Tab. 4).

2.5.6 Quantifizierung adhärenenter Bakterien auf den Implantatoberflächen

Zur mikrobiologischen Auswertung mussten die auf den Plättchen adhärenenten Bakterien abgelöst werden. Hierzu wurden die 4 Plättchen pro Gruppe und Zeitpunkt jeweils einzeln in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. In die Röhrchen wurden jeweils 2 ml steriler Phosphatpuffer hinzugefügt. Durch 1-minütiges Vortexen und eine anschließende 30 s umfassende Ultraschallbadbehandlung wurden die Bakterien von den Plättchen gelöst.

Die Quantifizierung der abgelösten Bakterien in der Phosphatpufferlösung erfolgte durch die standardisierte Beimpfung von CSA-Platten mit dem Spiralometer wie bereits

oben beschrieben. Hierzu wurde für jedes Plättchen eine eigene CSA-Platte beimpft und anschließend nach Auszählung der Mittelwert der KBE aus den vier Einzelwerten pro Gruppe und Zeitpunkt bestimmt. Die Auszählung erfolgte über Verdünnungsreihen, damit die KBE auf den CSA-Platten sicher bestimmt werden konnten. Zur Überprüfung erfolgten mehrfache Auszählungen, bei Abweichungen wurde die Auszählung wiederholt. Das Ausmaß adhärenter Bakterien auf den Implantatoberflächen lässt sich durch die Besiedelungsdichte der Anzahl KBE/Oberfläche beschreiben. Diese ergibt sich durch den Quotienten der Anzahl (KBE) der abgelösten Bakterien und der Oberfläche der zylindrischen Implantate, welche sich nach der Formel $2 \pi r^2 + 2 \pi r h$ berechnet. Die Effektivität der Methode zur Ablösung adhärenter Bakterien von den Oberflächen der Implantate wurde durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse überprüft (Methode siehe 2.6).

Zusätzlich wurde mit dem Vitek® Vollautomaten eine Resistenzbestimmung durchgeführt.

2.6 Fluoreszenzmikroskopische Analyse und Quantifizierung

2.6.1 Materialliste

- Analyseprogramm:
Zeiss KS 400 Imaging
System Release 3.0 Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Fluoreszenzfarbstoff:
LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays,
Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Kamera zum Einlesen in den Computer:
Videokamera MC-3254 CCD Color, Sony, Minato, Japan
- Mikroskop:
Leica DMRB mit Fluoreszenz, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar,
Deutschland
- Phosphatpuffer:
Phosphate Buffer Solution, PBS pH 7,2
Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma®, Münster, Deutschland

- Reaktionsgefäße:
Safe-Lock 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Vortexer:
REAX control, Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.6.2 Zubereitung und Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffs

Der Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability Kit wurde mit sterilem Phosphatpuffer in einer Konzentration von 2 µl Farbstoff/10 ml PBS angesetzt. Anschließend wurde 1 ml der Lösung mit jeweils einem Plättchen in einem Reaktionsgefäß für 10 min in Dunkelheit inkubiert. Die Plättchen wurden dann wiederum mit sterilem Phosphatpuffer gespült und abschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Saidi IS, 1999).

2.6.3 Quantifizierung der Keime auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen

Zur Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop standen jeweils 2 Plättchen pro Gruppe, die zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h, 12 h und 24 h beurteilt wurden, zur Verfügung. Die Plättchen wurden einzeln mit dem Fluoreszenzmikroskop in einer 40-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Bilder von der Plättchenoberfläche konnten über eine digitale Videokamera mit der Zeiss KS400 Software in das Bildanalyseprogramm übertragen werden. Es wurden 5 Bilder von verschiedenen Regionen der Plättchen angefertigt. Bei insgesamt 2 Plättchen wurden somit 10 Bilder pro Gruppe und Zeitpunkt angefertigt. Die fotografierten Regionen waren auf jedem Plättchen vergleichbar.

Die angefertigten Bilder der Plättchenoberfläche wurden mit dem Analyseprogramm Zeiss KS400 Imaging 3.0 ausgewertet. Hierzu wurde der Anteil der fluoreszierenden Bakterien an der gesamten Plättchenoberfläche bestimmt. Dies wurde für jede der Gruppen I–IV dreimal pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt. Anschließend wurde der Mittelwert bestimmt. Das Programm ermöglichte sowohl das Herausblenden des schwach fluoreszierenden Hintergrundes als auch der schwächer fluoreszierenden Oberflächenverunreinigungen, sodass die Messergebnisse durch diese nicht beeinflusst wurden.

2.7 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

2.7.1 Materialliste

- Beschichtungsanlage für Goldbeschichtung:
BAL-TEC MED 020, Witten, Deutschland
- Entwässerung mit:
Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit MEK (Ethylmethylketon)
Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Zubereitung: verdünnen auf Ethanol 50, 70 und 80 Vol.-%, um aufsteigende Alkoholreihe zu erzeugen
- Fixierlösung:
NaH₂PO₄H₂O (Natriumdihydrogenphosphat) Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid) Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Mischröhrchen:
Falcon®, Blue Max™ 352070
50 ml Polypropylene Conical Tube
Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ., USA
- Rasterelektronenmikroskop:
Rasterelektronenmikroskop DSM 982 Gemini, Zeiss, Jena, Deutschland
- Trocknungsmittel:
Hexamethyldisilazane (HMDS), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.7.2 Vorbereitung der Plättchen für die Elektronenmikroskopie

In einem ersten Schritt wurde die Fixierlösung hergestellt. Zum Zubereiten des Puffers wurden 22,6 g Natriumdihydrogenphosphat NaH₂PO₄H₂O und 25,2 g Natriumhydroxid NaOH auf jeweils 1000 ml aqua dest. gelöst. Diese wurden im Verhältnis 830 ml:170 ml zusammengeführt und der pH wurde auf 7,2–7,4 eingestellt. Anschließend wurde durch Mischen der Pufferlösung mit Glutaraldehyd eine Fixierlösung aus 1%igem Glutaraldehyd hergestellt. Die Plättchen wurden einzeln in Reaktionsgefäßen für 12–24 h bei 4 °C im Kühlschrank in der Fixierlösung belassen. Dann wurden sie 3× für jeweils 15 min mit

aqua dest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50, 70, 80 Vol.-% je 5-10 min dehydriert.

In einem zweiten Schritt wurden die Plättchen noch für je 5–10 min in 90 Vol.-% und anschließend in 100 Vol.-% Alkohol überführt, bevor sie für 2×15 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS) infiltriert wurden. Getrocknet wurden die Plättchen bei Raumtemperatur. Abschließend wurden sie mit Gold beschichtet, um ergebnisbeeinflussende Aufladungseffekte auszuschließen.

2.7.3 Analyse der Plättchenoberfläche

Es wurden von jedem Plättchen mehrere Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung (100×, 500×, 1000×, 5000×, 10000×, 20000×) angefertigt, so dass die Plättchenoberfläche mit den adhärierenden Keimen in der Übersicht und im Detail beurteilt werden konnte. Die Aufnahmen wurden anschließend zur Archivierung digitalisiert.

2.8 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte deskriptiv und analytisch mithilfe der Programme MS-Excel und SPSS Statistics 22 (IBM SPSS Statistics, USA). Für die analytische Statistik der mikrobiologischen Auswertung der Adhäsionsversuche wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt und mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Mann-Whitney-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Diese Tests wurden verwendet, da es sich um eine geringe Fallzahl nicht normalverteilter Daten handelt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Mikrobiologische Auswertung

3.1.1 Ausgangskonzentrationen der Bakterien in den verwendeten Nährlösungen

Durch den Prozess des Einfrierens konnte eine geringe Abnahme der KBE/ml in den Suspensionen festgestellt werden.

Direkt nach dem Herstellen der Bakteriensuspension mit dem Trübungsgrad Mc Farland sechs konnte wie unter 2.5.3 beschrieben auf den CSA-Platten eine Keimkonzentration von durchschnittlich $3,5 \times 10^8 \pm 5,16 \times 10^7$ KBE/ml abgelesen werden. Nach dem Auftauen betrug die Keimkonzentration durchschnittlich $2,67 \times 10^8 \pm 3,42 \times 10^7$ KBE/ml. Die Bakteriensuspensionen wurden wie unter 2.5.4 beschrieben auf 10^5 KBE/ml weiter verdünnt.

3.1.2 Konzentration der Bakterien in der Nährlösung zu den Entnahmezeitpunkten

Es konnte beobachtet werden, dass die Keimkonzentrationen in den Suspensionen der antibiotikafreien Plättchen (Gruppen I und II) in den ersten sechs Stunden stärker zunahmen als in den Suspensionen der antibiotikahaltigen Plättchen (Gruppen III und IV). Die Keimkonzentration in der Suspension der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) fiel nach 6 h sogar deutlich unterhalb die der Ausgangssuspension ab, stieg nach 12 h aber wieder sprunghaft an. Nach 6 h Inkubation nahmen die Keimzahlen in den Suspensionen der Gruppe I (Titan) und der Gruppe II (PDLLA) bis zum Zeitpunkt 24 h nur noch unwesentlich zu.

Die Abbildung 4 zeigt die Keimkonzentrationen in den Suspensionen der vier Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

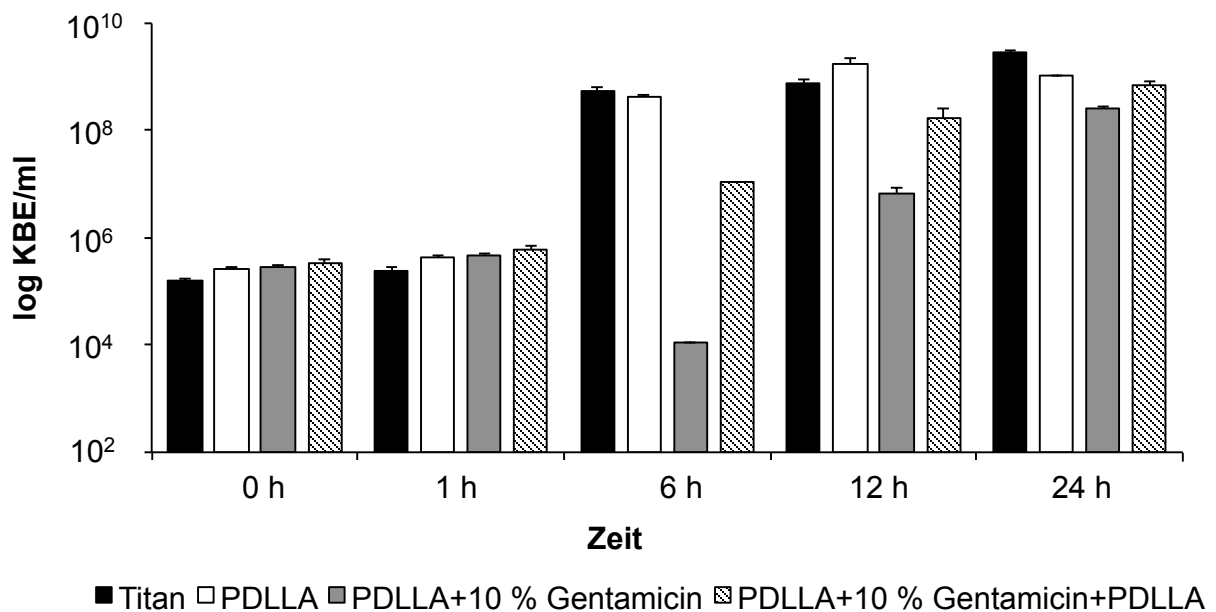


Abb. 4: Bakterienkonzentrationen in der Suspension im zeitlichen Verlauf

3.1.3 Quantifizierung der adhärenenten Keime auf den Plättchenoberflächen

Plättchen der Gruppen I (Titan) und II (PDLLA) wiesen zu allen Zeitpunkten die höchste Besiedlung der Implantatoberflächen auf.

Dabei ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikant unterschiedliche Keimadhäsion zwischen den Plättchen der Gruppen I (Titan) und II (PDLLA) nachweisen.

Nach 1 h und 6 h konnte auf den Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) wenig bis kein bakterielles Wachstum nachgewiesen werden; nach 12 h und 24 h stiegen die Keimanhaftungen jedoch an. Die Menge der adhärierenden Keime auf den Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) war zu jedem Zeitpunkt signifikant geringer als die auf den antibiotikafreien Plättchen der Gruppe I (Titan) und II (PDLLA).

Auf den Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) konnte nach 1 h kein bakterielles Wachstum nachgewiesen werden, nach 6 h stieg die Anzahl der Keime auf der Oberfläche deutlich an, blieb aber geringer als auf den Plättchen der Gruppe I (Titan) und Gruppe II (PDLLA). Im weiteren zeitlichen Verlauf änderte sich auch nach 12 h und 24 h Inkubation die Menge der Keimanhaftungen auf den Oberflächen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) nicht wesentlich. Die Abbildung 5 zeigt

die Unterschiede zwischen den Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die folgende Tabelle 5 stellt die Resultate im Gruppenvergleich mittels U-Test dar. Die Überprüfung der Bakterienablösung mittels Fluoreszenzmikroskopie ergab ein vollständiges Ablösen der Bakterien.

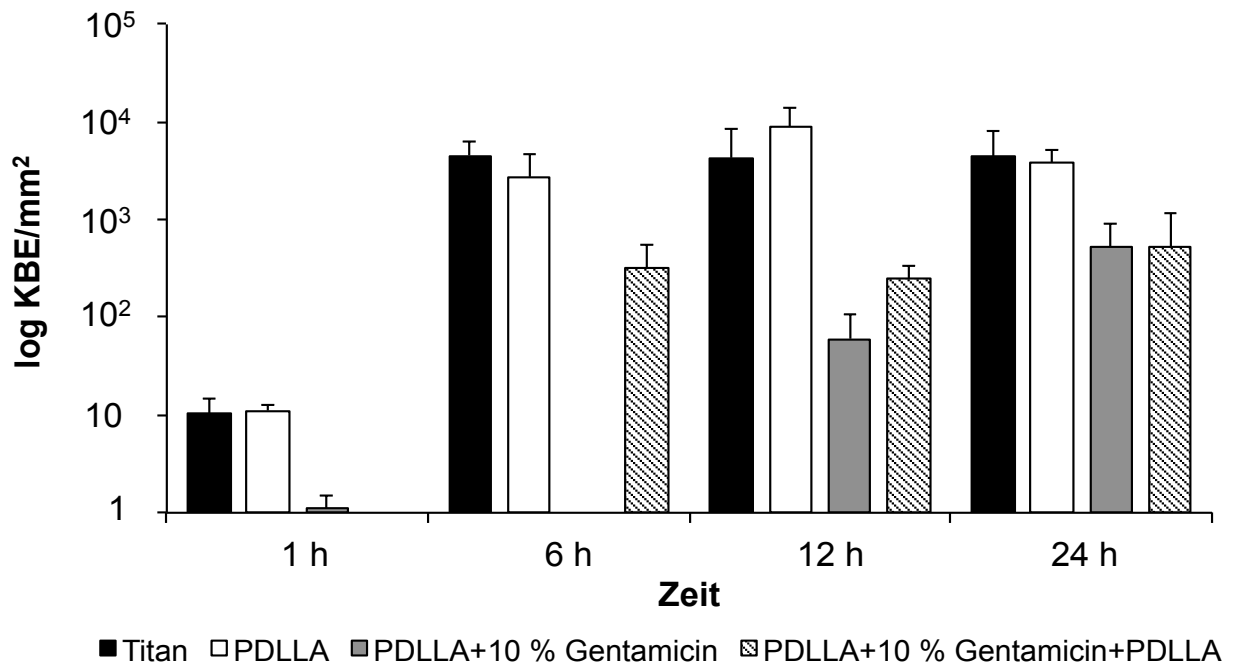


Abb. 5: Anzahl mikrobiologisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/mm² im zeitlichen Verlauf

Tab. 5: Resultate des U-Tests aus der Anzahl mikrobiologisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/mm² im zeitlichen Verlauf (n.s. = nicht signifikant). Die Werte wurden nicht für einen Mehrgruppenvergleich adjustiert

	1 h	6 h	12 h	24 h
Titan vs. PDLLA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Titan vs. PDLLA+10 % Gentamicin	0,029	0,029	0,029	0,029
Titan vs. PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA	0,029	0,029	0,029	0,029
PDLLA vs. PDLLA+10 % Gentamicin	0,029	0,029	0,029	0,029
PDLLA vs. PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA	0,029	n.s.	0,029	0,029
PDLLA+10 % Gentamicin vs. PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA	0,029	0,029	n.s.	n.s.

3.1.4 Antibiogramm

Die abgelösten Bakterien jedes Inkubationszeitpunktes wurden nach der in 2.1 beschriebenen Methode gegen zahlreiche Antibiotika getestet. Das Resistogramm ergab bei allen Testungen das gleiche Resistenzprofil (Tab. 6). Es zeigte sich lediglich eine Resistenz gegen Benzylpenicilline, auf das verwendete Gentamicin war *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sensibel.

Tab. 6: Ergebnisse der Resistenzbestimmung *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Antibiotikum	Endbefund MHK in mg/l	
Benzylpenicillin	$\geq 0,5$	R
Oxacillin MIC NCCLS 99	$\leq 0,25$	S
Ampicillin/Sulbactam	≤ 2	S
Cefazolin	≤ 4	S
Imipenem	≤ 1	S
Gentamicin	$\leq 0,5$	S
Erythromycin	$\leq 0,25$	S
Clindamycin	$\leq 0,25$	S
Ciprofloxacin	$\leq 0,5$	S
Levofloxacin	0,25	S
Vancomycin	≤ 1	S
Teicoplanin	$\leq 0,5$	S
Fosfomycin	≤ 8	S
Rifampicin	$\leq 0,25$	S
Quinupristin/Dalfopristin	$\leq 0,25$	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤ 10	S
Tetracycline	≤ 1	S
Fusidinsäure	$\leq 0,5$	S

3.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

3.2.1 Oberflächeneigenschaften der Plättchen vor Inkubation

Die Abbildung 6 zeigt exemplarische Aufnahmen der Plättchen aller vier Gruppen vor der Inkubation. Die unbeschichteten Implantate wiesen eine geringere Autofluoreszenz als die beschichteten auf. Die stärkste Autofluoreszenz fand sich bei den Implantaten der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin); es sind lakunenartige Formationen, die stärker autofluoreszierten, erkennbar.

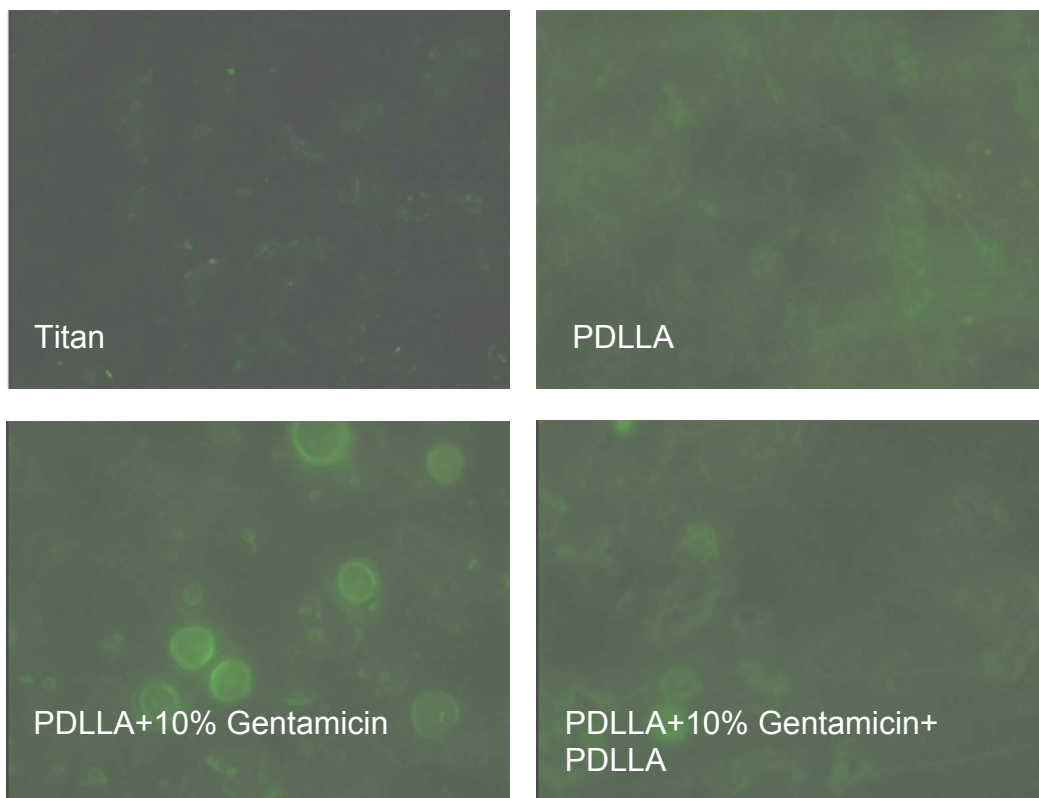


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aspekte der vier Plättchentypen vor Inkubation. Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) zeigt die stärkste Autofluoreszenz bei 40× Vergrößerung

3.2.2 Oberflächeneigenschaften der Plättchen nach Inkubation in steriler Nährlösung

Nach Inkubation in steriler Nährlösung wurden zu den vier Zeitpunkten erneut Aufnahmen gefertigt. Die unbeschichteten Titanplättchen zeigten nahezu keine Autofluoreszenz (Abb. 7), während die Plättchen der beschichteten Gruppen II–IV eine deutliche Autofluoreszenz aufwiesen (Abb. 8–10). Zusätzlich fällt bei den beschichteten Plättchen eine unregelmäßige Oberflächenstruktur auf.

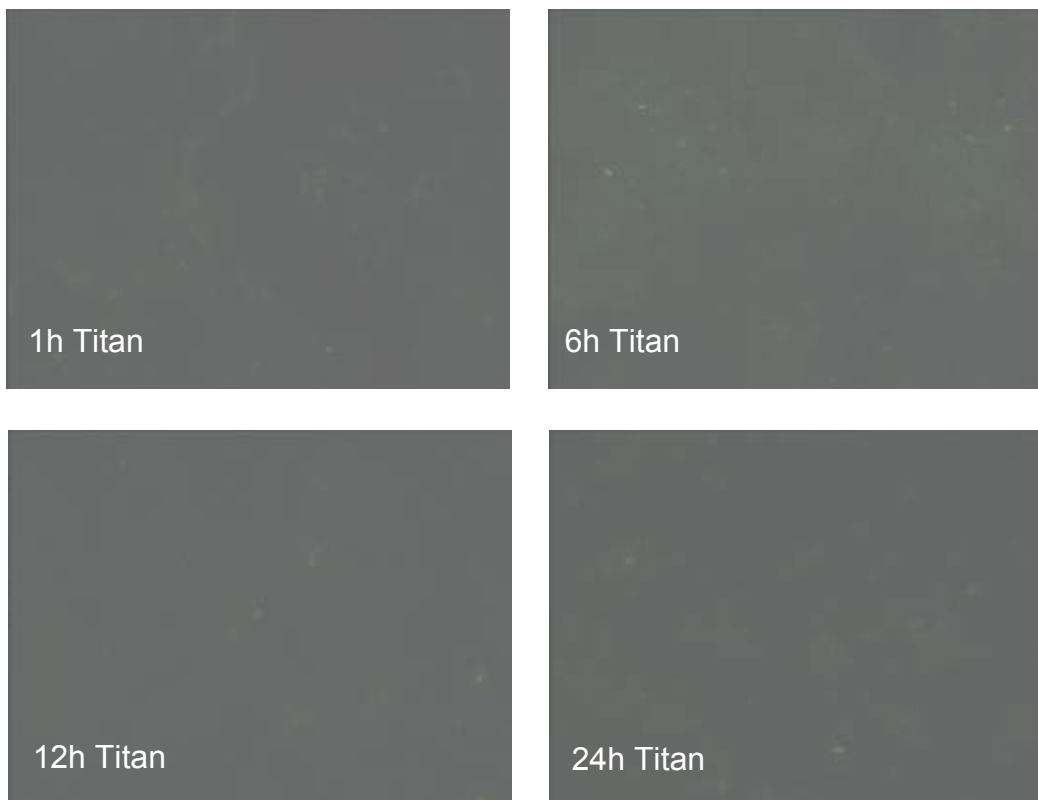


Abb. 7: Fluoreszenz der unbeschichteten Titanplättchen (Gruppe I) bei 40× Vergrößerung

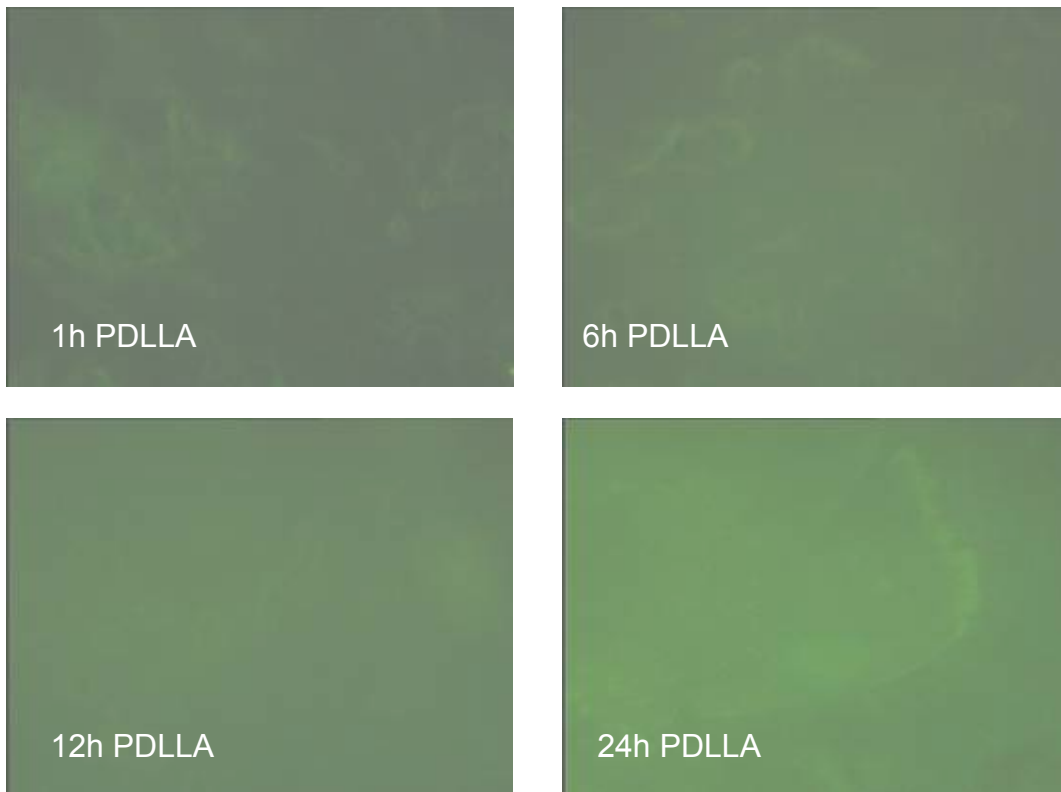


Abb. 8: Fluoreszenz der PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe II) bei 40× Vergrößerung



Abb. 9: Fluoreszenz der PDLLA+10 % Gentamicin-beschichteten Plättchen (Gruppe III) bei 40× Vergrößerung



Abb. 10: Fluoreszenz der PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe IV) bei 40× Vergrößerung

3.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen

Nach Inkubation der unterschiedlich beschichteten Plättchen der Gruppen I–IV in der Bakteriensuspension zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch eine zunehmende Anzahl adhärierender Keime in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abb.11–14). Die adhärierenden Keime waren deutlich grün fluoreszierend sichtbar.

Eine besonders dichte Keimbesiedelung im zeitlichen Verlauf zeigten die unbeschichteten Titanplättchen. Auf der Oberfläche der Gruppe II (PDLLA) war im Vergleich zur Gruppe I (Titan) eine geringere Keimadhäsion zu erkennen, besonders zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h und 24 h; die Besiedlung dieser Plättchen schien im zeitlichen Verlauf jedenfalls nicht sprunghaft anzusteigen. Dagegen fiel auf, dass zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h sowie 12 h die Adhäsion auf den Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) auf eine sehr geringe Anzahl Keime beschränkt war. Mit längeren Inkubationszeiten, vor allem von 12 h auf 24 h, stieg die Zahl der adhärierenden Bakterien auf der

Plättchenoberfläche wieder an. Es fallen die bereits unter 3.2.1 sichtbaren lakunenartigen Autofluoreszenzen auf. Zwar besiedelten ab 6 h Inkubation weniger Keime die mit PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe IV) als die der unbeschichteten Plättchen der Gruppe I, jedoch waren es im Verlauf mehr als auf der Oberfläche der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin).

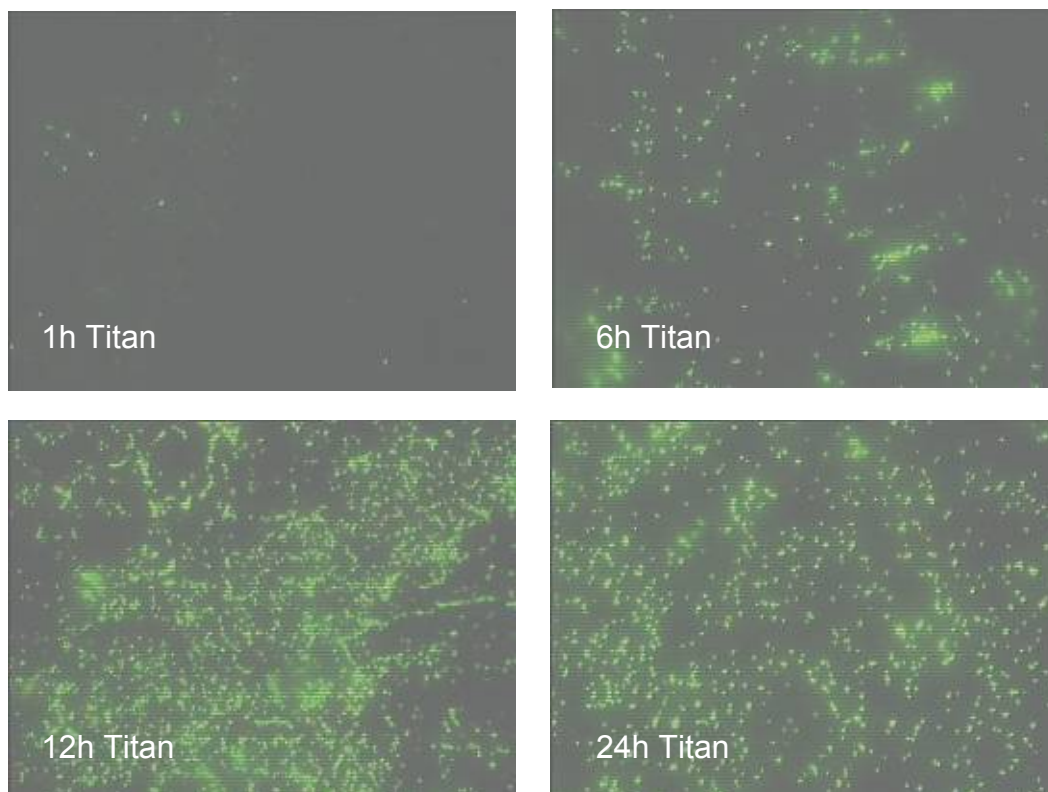


Abb. 11: Zunehmende bakterielle Besiedlung der unbeschichteten Titanplättchen (Gruppe I) bei 40× Vergrößerung

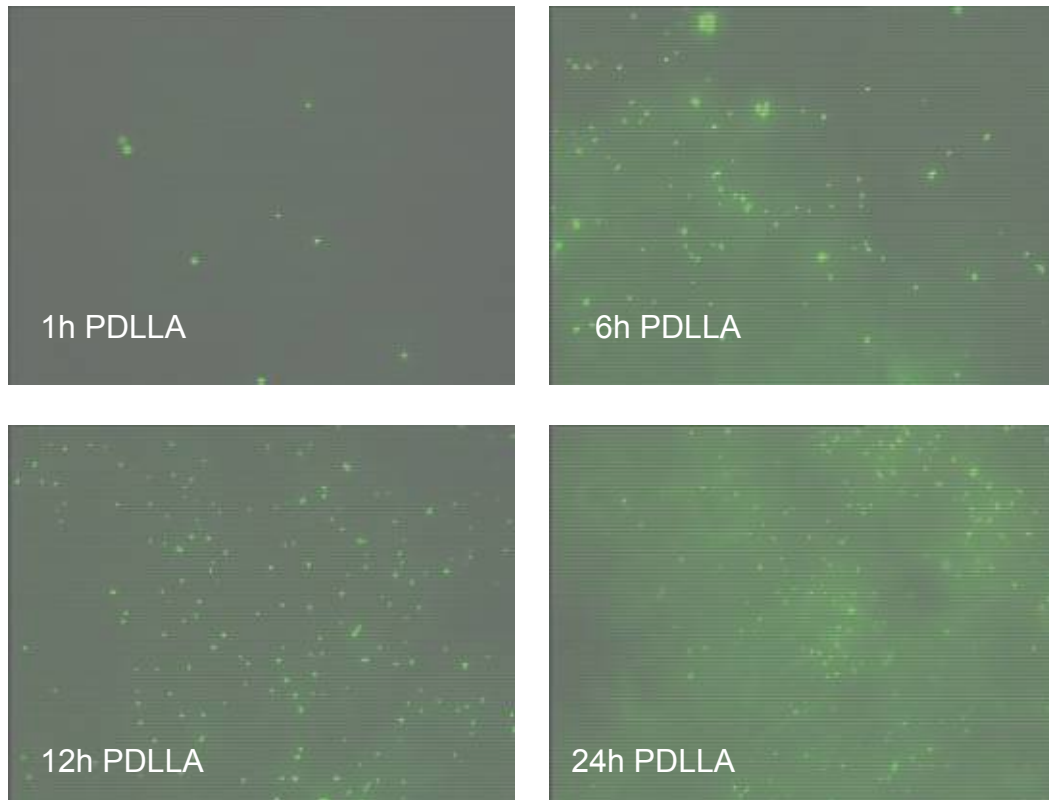


Abb. 12: Besiedlung der PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe II) bei 40× Vergrößerung

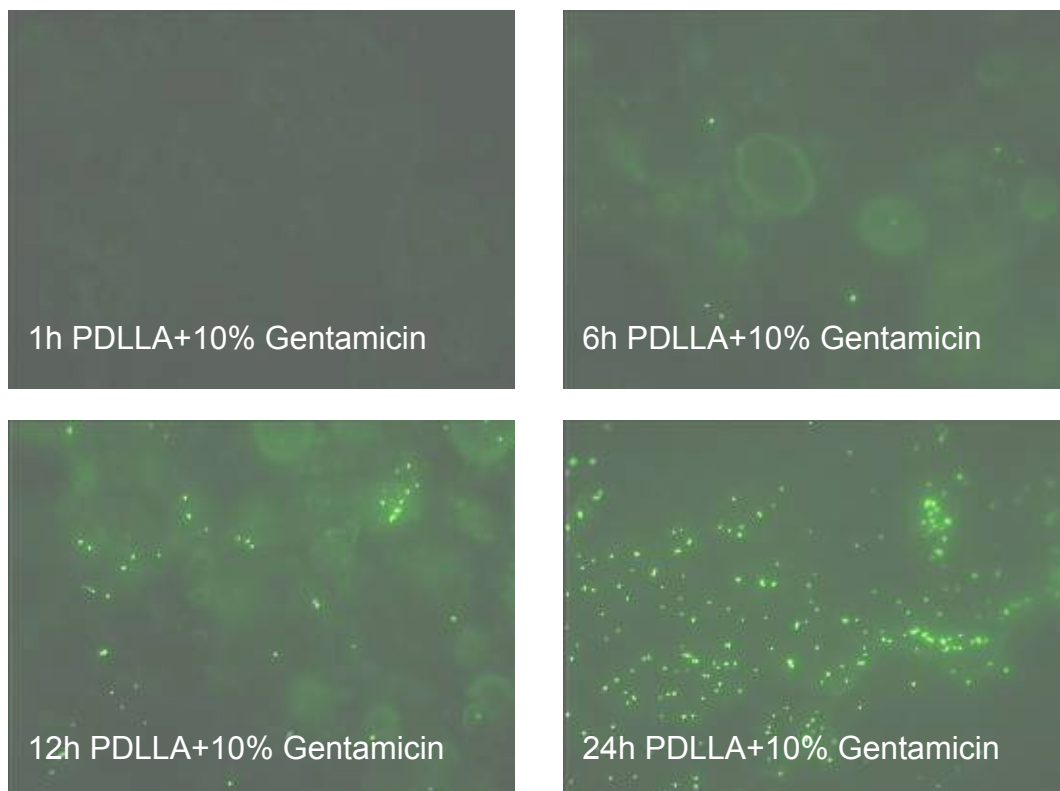


Abb. 13: Besiedlung der PDLLA+10 % Gentamicin-beschichteten Plättchen (Gruppe III) bei 40× Vergrößerung

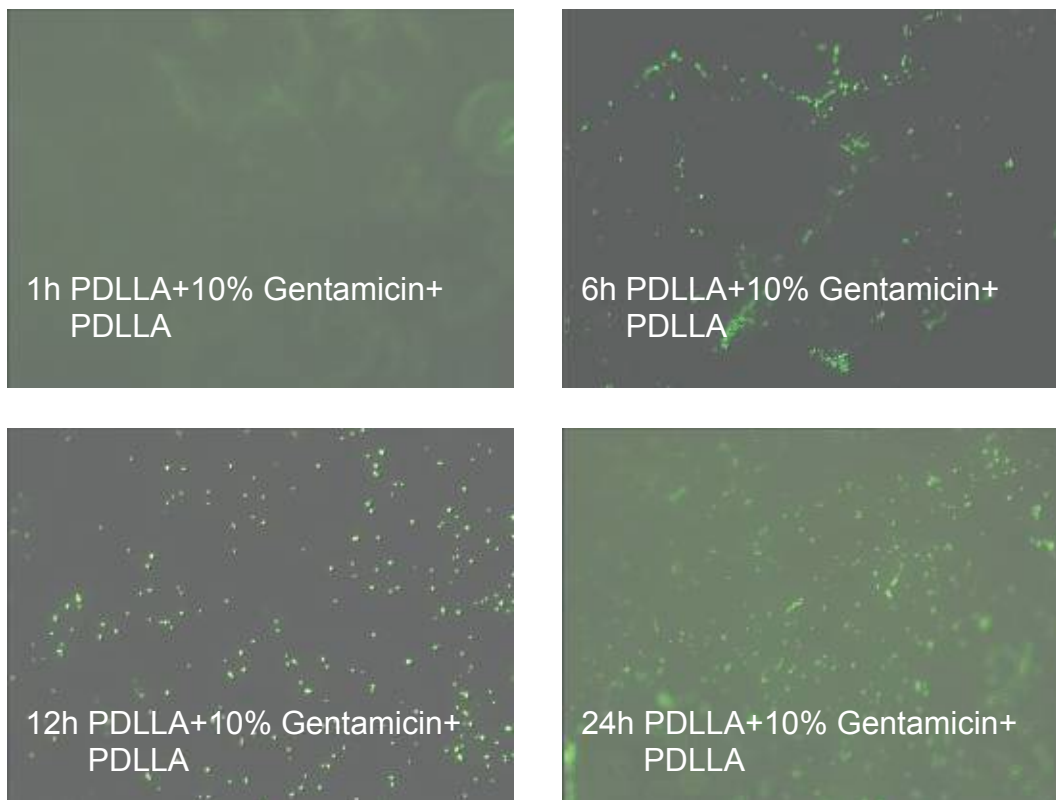


Abb. 14: Besiedlung der PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe IV) bei 40× Vergrößerung

3.2.4 Quantitative Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen

Die Bestimmung der Keimzahl auf der Plättchenoberfläche ergab, dass die Plättchen der Gruppe I (Titan) die höchste Keimadhäsion aufwiesen.

Im Vergleich zeigten die Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) nach 1 h, 6 h und 12 h Inkubation eine deutlich geringere Keimdichte auf der Plättchenoberfläche; lediglich nach 24 h Inkubation waren kaum noch Unterschiede zwischen den unbeschichteten Titanplättchen und den antibiotikabeschichteten Plättchen auszumachen. Insgesamt wiesen die Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) nach 6 h Inkubation die mit Abstand geringste Keimzahl auf der Oberfläche auf. Auf der Oberfläche der Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) konnten nach 1 h Inkubation keine Keime nachgewiesen werden, nach 6 h nahm die Besiedelung über den zeitlichen Verlauf deutlich zu. Auffällig war, dass die Menge der adhärierenden Keime auf den Plättchen der Gruppe II (PDLLA) nach 12 h und 24 h Inkubation auf einem geringen Niveau war; nach 24 h war dieses sogar niedriger als auf den antibiotikabeschichteten Plättchen.

Die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Keimbesiedelungen im zeitlichen Verlauf stellt Abbildung 15 dar.

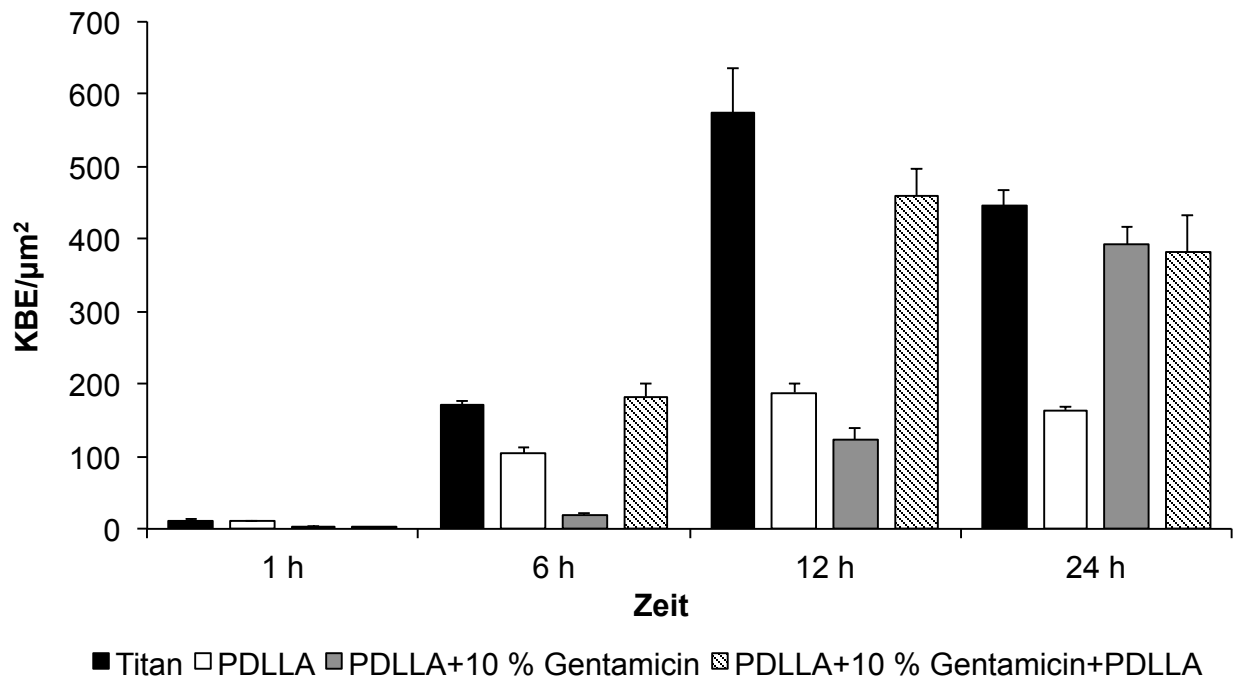


Abb. 15: Anzahl fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/μm² im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist der Mittelwert aus dreimaliger Messung von jeweils 5 Bildern für je 2 Plättchen pro Gruppe

3.3 Rasterelektronenmikroskopische Auswertung

3.3.1 Oberflächeneigenschaften der unbeschichteten Titanplättchen nach Inkubation in steriler Nährlösung

Zur Beurteilung der Oberflächenstruktur wurden die unbeschichteten Titanplättchen in einer sterilen Nährlösung inkubiert (Negativkontrolle). Nach 1 h bzw. 12 h Inkubation wurden Übersichts- und Detailaufnahmen (100- bzw. 1000-fache Vergrößerung) der Oberfläche angefertigt (Abb. 16).

Die Plättchenoberfläche wies sowohl nach 1 h als auch nach 12 h Inkubation ein unregelmäßiges leicht zerklüftetes Relief auf.

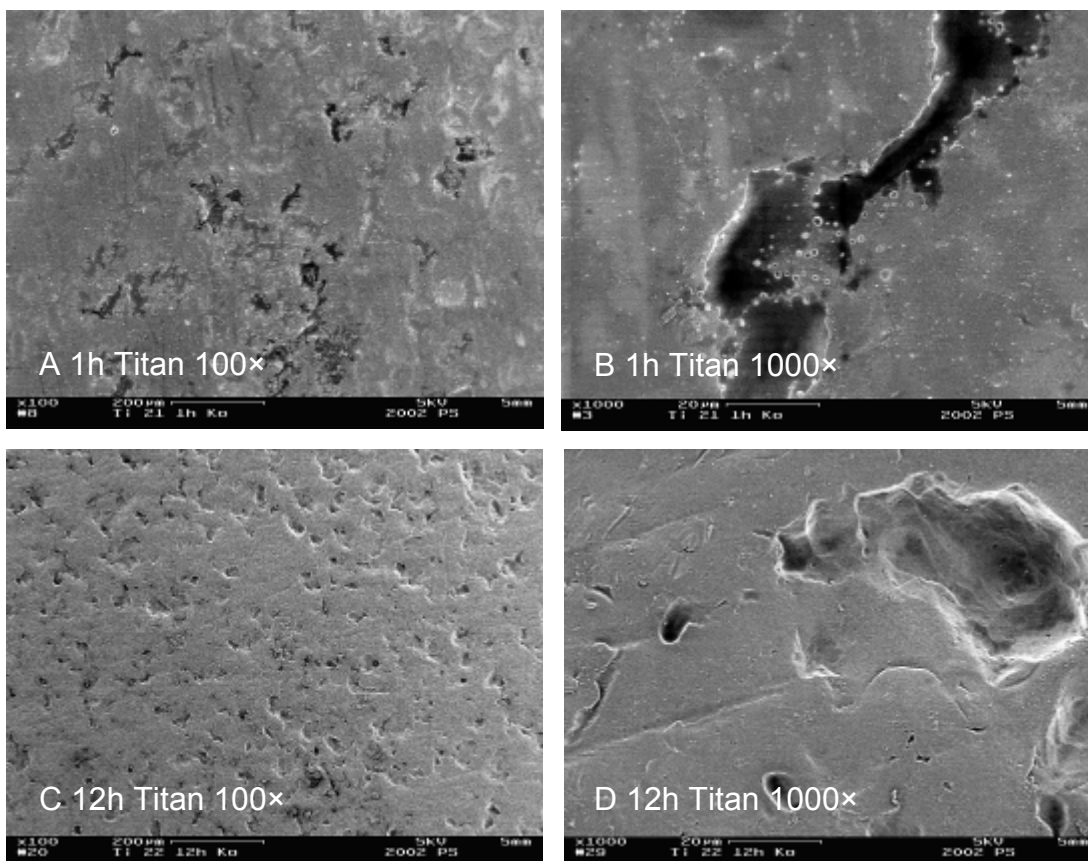


Abb. 16: Unbeschichtete Titanplättchenoberfläche ohne Bakterien nach 1 h Inkubation bei 100× (A) und 1000× Vergrößerung (B) sowie nach 12 h Inkubation bei 100× (C) und 1000× Vergrößerung (D)

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Keimadhäsion auf den Plättchenoberflächen

Zur Darstellung der Keime auf den Oberflächen wurden Übersichtsaufnahmen mit einer 1000fachen Vergrößerung sowie Detailaufnahmen (10.000 bzw. 20.000-fach) angefertigt. Die Detailaufnahmen sollten die Bakterienkolonien nach 12 h Inkubation darstellen und das Ausmaß einer möglichen Biofilmbildung überprüfen.

Die Abbildungen 17–20 zeigen repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen aller Gruppen nach 1 h bzw. 12 h Inkubation in keimhaltiger Suspension.

Auf der Oberfläche der unbeschichteten Plättchen der Gruppe I (Titan) fand eine deutlich erkennbare Keimbesiedelung statt. Die Plättchen der Gruppe II (PDLLA) wurden im Vergleich zur Gruppe I (Titan) nach 12 h Inkubation von weniger Keimen besiedelt.

Auffallend war wiederum, dass die Oberfläche der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) sowohl nach 1 h als auch nach 12 h Inkubation von erheblich weniger Keimen besiedelt wurde als die der anderen Gruppen.

Die Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) wurden nach 1 h kaum von Keimen besiedelt, jedoch stieg die Keimadhäsion nach 12 h Inkubation wieder deutlich an.

Auf den Detailaufnahmen kann man erkennen, dass die Bakterien von einer Substanz umhüllt sind (Pfeile in Abb. 17C und 18C), die die Keime brückenartig miteinander verbindet.

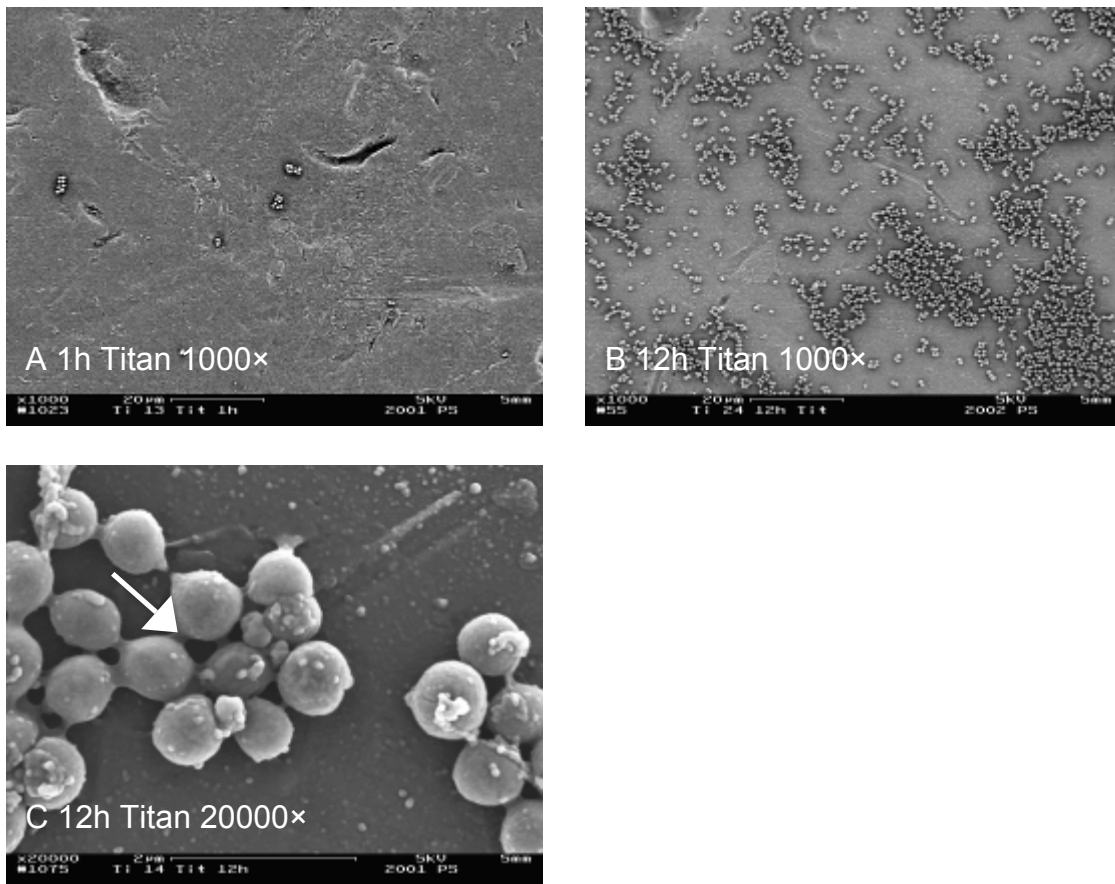


Abb. 17: Unbeschichtete Titanplättchen (Gruppe I) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 20.000× Vergrößerung (C). Pfeil: mögliche Polysaccharidmatrix

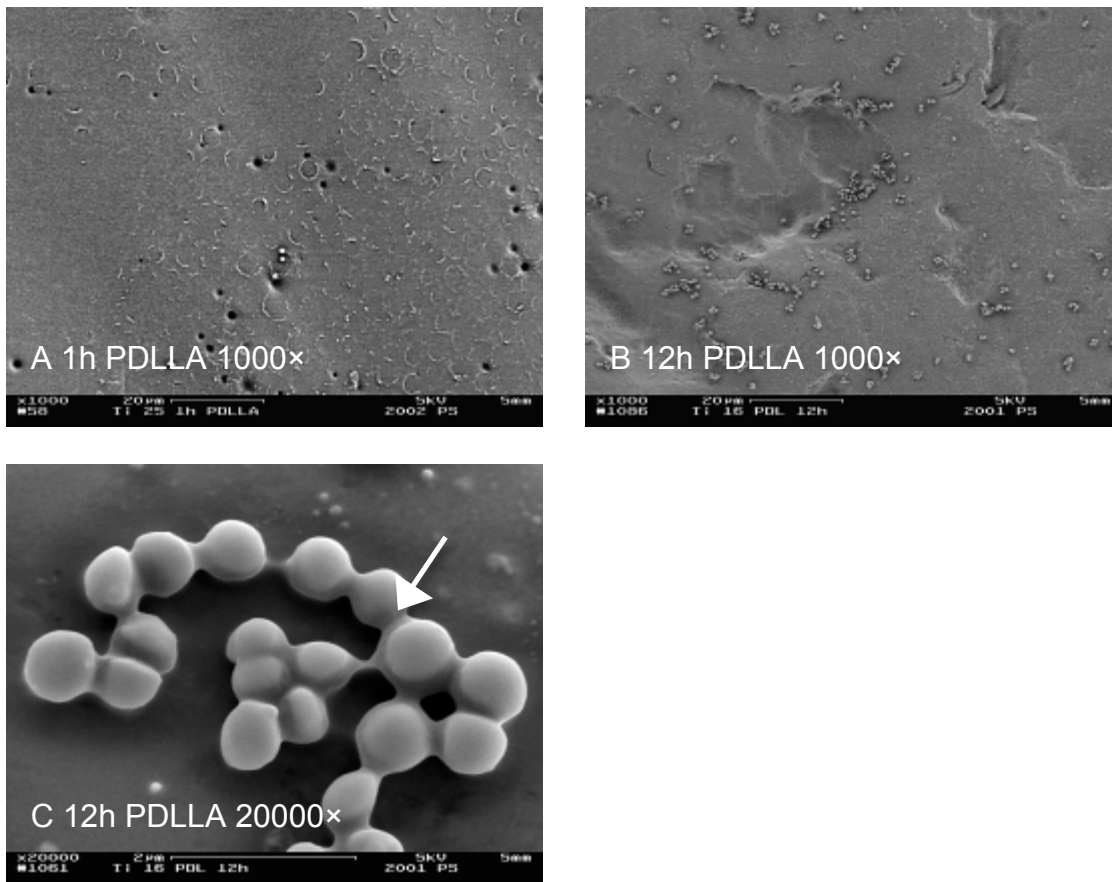


Abb. 18: PDLLA-beschichtete Plättchen (Gruppe II) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 20.000× Vergrößerung (C). Pfeil: mögliche Polysaccharidmatrix

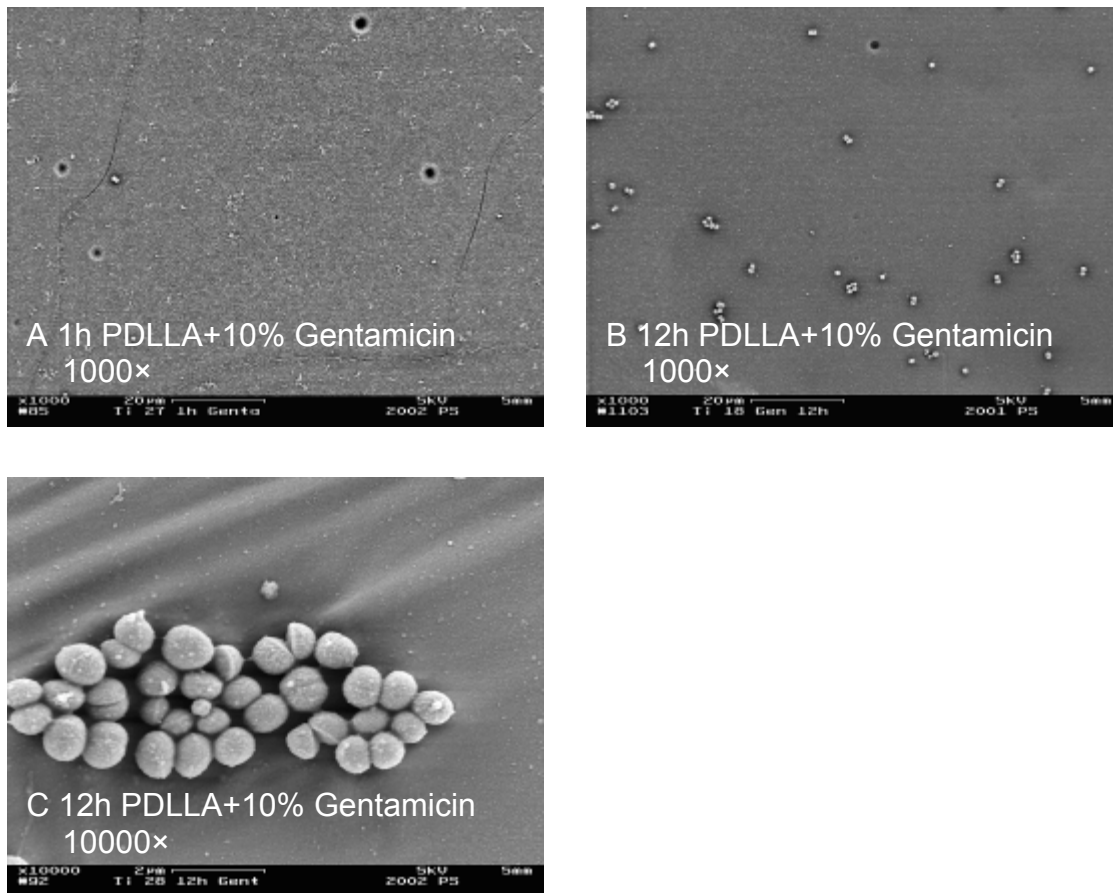


Abb. 19: PDLLA+10 % Gentamicin-beschichtete Plättchen (Gruppe III) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 10.000× Vergrößerung (C)

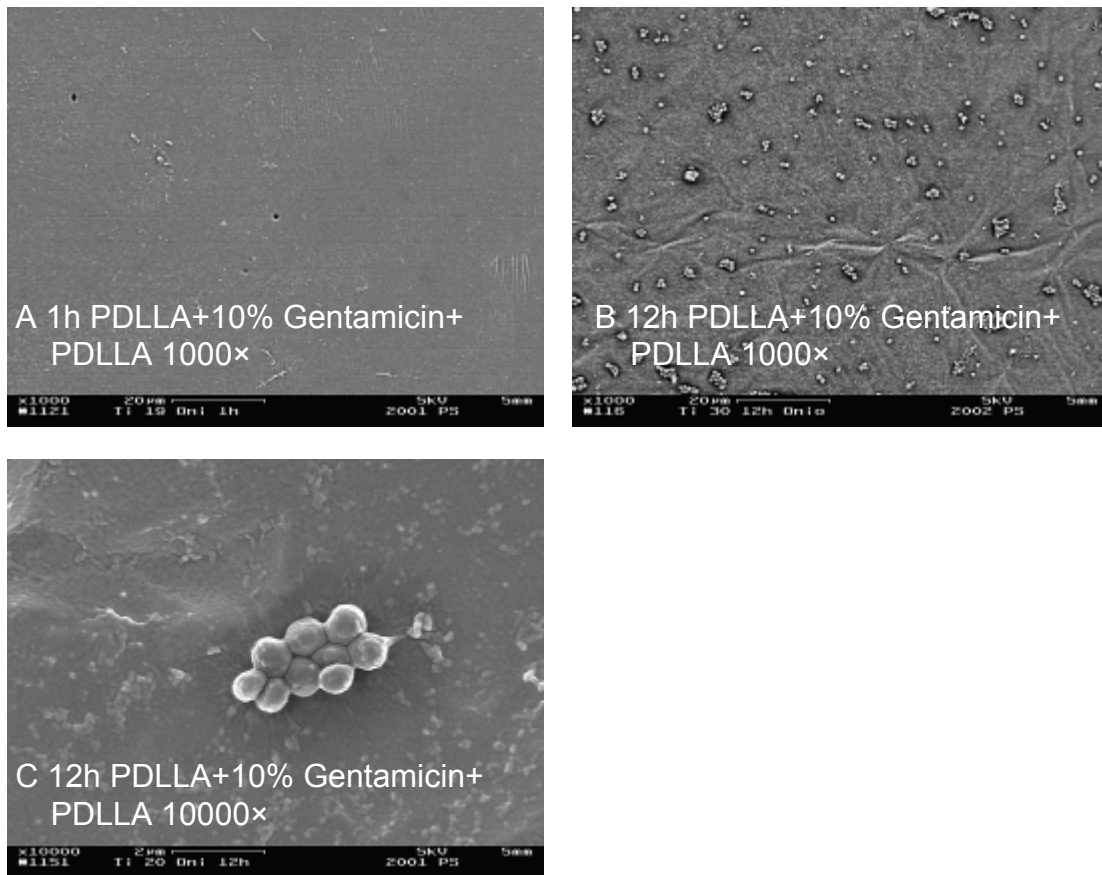


Abb. 20: PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichtete Plättchen (Gruppe IV) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 10.000× Vergrößerung (C)

4. Diskussion

Die Folgen implantatassoziierter Infektionen in der Chirurgie des Bewegungsapparates sind aus medizinischer und ökonomischer Sicht schwerwiegend. Es resultieren lange Krankenhausverweildauern und mitunter Arbeitsunfähigkeit. Somit kommt der Infektoprophylaxe eine große Bedeutung zu.

Nach Implantation eines Fremdkörpers befinden sich Matrixproteine und Gewebezellen, wie z. B. Fibrozyten und Osteoblasten, bei Anwesenheit von Bakterien gewissermaßen in einem Wettbewerb um die Adhäsion an der Oberfläche des Biomaterials. Man spricht hier auch vom sogenannten „*race for colonization of the biomaterial surface*“ (Gristina AG, 1994). Die Beschichtung von Osteosynthesematerialien mit einem biodegradierbaren und antibiotikahaltigen Polymer soll dem körpereigenen Gewebe den entscheidenden Vorsprung verschaffen. Denn gelingt es die Implantatoberfläche zu beanspruchen, bevor es zu einer Kolonisation einer relevanten Menge Bakterien mit anschließender Infektion kommt, so ist die Wahrscheinlichkeit einer implantatassozierten Infektion herabgesetzt. Das „*race*“ ist gewonnen.

Ziel dieser *In-vitro*-Untersuchung war es, die Wirkung einer biodegradierbaren und gentamicinhaltigen Polymerbeschichtung von Titanplättchen hinsichtlich des Adhäsions- und Besiedlungsverhaltens von Bakterien auf der Oberfläche zu untersuchen. Als Versuchskeim diente *Staphylococcus aureus*, der typischerweise bei Infektionen in der Chirurgie des Bewegungsapparates gefunden wird (Hogan A, 2013).

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Mikrobiologische Analyse

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass im Vergleich zu den unbeschichteten Titanplättchen weniger Keime die antibiotikabeschichteten Titanplättchen besiedelten.

Unbeschichtete Titanplättchen sowie die mit reinem PDLLA beschichteten Titanplättchen wiesen im Verlauf des Beobachtungszeitraums über 24 h die stärkste bakterielle Besiedelung auf.

Nicht nur die Abwesenheit einer bakteriziden Substanz, sondern auch die raue Oberfläche der unbeschichteten Plättchen können als Ursache für eine deutlichere Keimbeseidlung verantwortlich gemacht werden, da raue Oberflächen den Keimen bessere Haftmöglichkeiten bieten (Yoda I, 2014). Die alleinige Beschichtung mit dem Wirkstoff-

träger Poly-Laktid (PLA) führt bereits zu einer Oberflächenglättung (Herrmann R, 1999) und somit zu einer verminderten Oberfläche für adhärierende Bakterien. Allerdings war der Unterschied der Gruppe II (PDLLA) zu den unbeschichteten Plättchen in der mikrobiologischen Analyse zu allen Zeitpunkten nicht signifikant (siehe Tab. 5).

Die Oberflächen der Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) wiesen die geringste Anzahl der kolonienbildenden Einheiten (KBE) auf, was auf die Gentamicinwirkung zurückzuführen ist. Es lagen nach 6 h Inkubation aber auch deutlich weniger Keime in der Bakteriensuspension vor, wie die Abb. 4 zeigt. Zurückzuführen ist dies auf die Diffusion des Gentamicins in die Nährlösung. Die Wirkung des Antibiotikums konnte sich nach 1 h Inkubation in der Nährlösung noch nicht ausreichend entfalten; nach 12 h wiederum reichte die bakterizide Wirkung des Gentamicins in der Nährlösung nicht mehr aus, die KBE/ml stieg wieder deutlich an.

Die höchsten Bakterienkonzentrationen wies die Nährlösung der antibiotikafreien Gruppen I (Titan) und II (PDLLA) auf. Nach 6 h blieben die Konzentrationen über den Beobachtungszeitraum auf einem hohen Niveau, ohne weiter anzusteigen; es wurde ein „*steady state*“ erreicht.

Zusammenfassend haben zu jedem Untersuchungszeitpunkt nach der mikrobiologischen Analyse signifikant mehr Keime die unbeschichteten Titanplättchen besiedelt.

Dieser Befund steht im Einklang mit tierexperimentellen Studien. So wurden in einem *In-vivo*-Versuch mit PDLLA+10 %igem Gentamicin beschichtete K-Drähte aus Titan in Rattentibiae implantiert, in die zuvor *S. aureus* eingebracht wurde. Nach sechs Wochen wurden die K-Drähte zur Analyse wieder explantiert. Drei der 10 Drähte waren steril, die übrigen wurden nur an der Spitze besiedelt. In einer weiteren Studie wurde auch ein *In-vitro*-Vergleich zwischen unbeschichteten Drähten und mit PDLLA bzw. PDLLA+10 % Gentamicin beschichteten Drähten, die in einer *S. epidermidis*-Suspension inkubiert wurden, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit PDLLA+10 %igem Gentamicin beschichtete Titannägel signifikant weniger von *S. epidermidis* besiedelt wurden als unbeschichtete Nägel (Vester H, 2010).

Nach 24 h Inkubation stieg auch wieder die Anzahl der KBE auf den Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin), da das Gentamicin nach dem initialen „*burst effect*“ nun langsamer aus der Beschichtung freigesetzt wurde.

Um die Freisetzungskinetik des Antibiotikums aus der Beschichtung zu modifizieren, wurde in der Gruppe IV eine zusätzliche reine Polymerschicht über die 10 % gentamicinhaltige PDLLA-Beschichtung aufgetragen.

Nach der mikrobiologischen Auswertung der Anzahl der adhärenenten Keime auf den Plättchenoberflächen konnte im Zeitraum von 24 h kein Vorteil einer zusätzlichen äußeren PDLLA-Beschichtung (Gruppe IV) im Vergleich zu Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) festgestellt werden. Zwar konnten nach 1 h keine Keime auf den Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) nachgewiesen werden, nach 6 h jedoch stieg die Keimbesiedelung wieder deutlich an. Dies könnte ein Hinweis auf die Ineffektivität der äußeren Polymerschicht sein, die in dieser Studie nach 1 h keine Diffusionsbarriere für das Antibiotikum darstellte. Bis zum 24 h Zeitpunkt schienen die Wirkstoffspiegel an der Oberfläche der Implantate zu niedrig gewesen zu sein, um die Keimbesiedelung deutlich reduzieren zu können.

Die Bestimmung der KBE/ml in den Nährlösungen (Abb. 4) zeigte nach 6 h Inkubation einen schwächeren Abfall der Bakterienkonzentration gegenüber der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin). Dies deutet auf eine geringe Menge an freigesetztem Antibiotikum in der Gruppe mit Extraschicht hin. Diese Beobachtung stimmt mit den zuvor erwähnten Ergebnissen der mikrobiologisch nachgewiesenen Keimbesiedelungen überein, da bei den Plättchen mit Extraschicht nach 6 h die Reduktion der Bakterienadhäsion schwächer war als in der Gruppe ohne Extraschicht.

Daher kann aufgrund der Ergebnisse geschlossen werden, dass die freigesetzte Antibiotikamenge gerade ausreichend war, um einen Gleichgewichtszustand aufrechtzuerhalten. Um eine deutliche Verringerung der kolonienbildenden Einheiten zu erreichen, wäre demzufolge *in vitro* eine höhere Konzentration in dieser Beschichtungsmodifikation erforderlich.

Im Zeitraum über 24 h wäre eine weitere Zunahme der Keimzahl in Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) und (aufgrund der ebenfalls nur 10%igen Gentamicinkonzentration) auch in der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) zu erwarten.

Die initiale effektive Reduktion der Keimzahl nach 1h und 6 h in Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) könnte dem körpereigenen Immunsystem bereits den entscheidenden Vorsprung verschaffen, um das „*race for the surface*“ (Gristina AG, 1994) zu gewinnen.

4.1.2 Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse

Untersucht wurden die vitalen Keime, sodass sich die Bakterien fluoreszenzmikroskopisch grün färbten.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Plättchenoberflächen zeigte vor allem nach 6 h, 12 h und 24 h die stärkste Keimadhäsion auf den unbeschichteten Titanplättchen der Gruppe I. Auf den antibiotikabeschichteten Plättchen adhärten deutlich weniger Keime, was nach 6 h Inkubation der Plättchen der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) besonders auffallend war. Dies kann mit der glatteren Plättchenoberfläche in Kombination mit der Freisetzung des Antibiotikums erklärt werden. In der weiteren Folge nahm die Anzahl der fluoreszierenden Keime auf den mit antibiotikabeschichteten Plättchen wieder zu. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den zuvor beschriebenen mikrobiologischen Ergebnissen. Nach 24 h Inkubation wiesen jedoch die Plättchen der Gruppe II (PDLLA) gemäß der quantitativen Auswertung (Abb. 15) die geringste Anzahl fluoreszierende Keime auf. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Autofluoreszenz des Materials so stark ausgeprägt ist, dass alle übrigen Strukturen quasi „überstrahlt“ werden (Saidi IS, 1999).

Darüber hinaus stellt sich die Frage, warum auf den antibiotikabeschichteten Plättchen der Gruppen III (PDLLA+10 % Gentamicin) und IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) nach 24 h Inkubation wieder mehr fluoreszierende Keime nachweisbar waren.

Ein Grund hierfür kann das Lösungsverhalten des Antibiotikums sein. Aufgrund der geringen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wird Gentamicin während des Beschichtungsvorganges in Form kleiner Partikel in das Polymergerüst integriert. Wenn es aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft im wässrigen Milieu herausgelöst wird, hinterlässt es Unebenheiten in Form kleiner Lakunen auf der Polymeroberfläche, die eine Adhäsion von Bakterien begünstigen könnten (Gollwitzer H, 2003; Strobel C, 2011a; Zhang X, 1994).

Bestätigt wird dies durch die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder.

Beispielhaft sind auf der Oberfläche der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) stärker autofluoreszierende lakunenartige Formationen zu erkennen (Abb. 6, Abb. 13).

Letztlich kann die Konzentration des Antibiotikums in diesem *In-vitro*-Ansatz nicht über einen längeren Zeitpunkt aufrechterhalten werden, um weiter bakterizid zu wirken. Hierzu wären sicher höhere Gentamicinkonzentrationen in der PDLLA-Schicht notwendig.

Die beobachtete geringere Anzahl anhaftender Keime in der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) nach 6 h kann also durch die bakterizide Wirksamkeit des Antibiotikums erklärt werden. In der Folgezeit machen sich dann die oben erwähnten Oberflächenveränderungen bemerkbar, welche nach dem Herauslösen des Wirkstoffes eine Zunahme der Keimadhärenz bewirken.

Der Nachweis von Bakterien auf der Oberfläche von beschichteten Implantaten, sei es mittels Fluoreszenz- oder Rasterelektronenmikroskopie, bedeutet nicht zwangsläufig das Versagen deren antibiotischer Eigenschaften. Die bakteriziden Substanzen vermögen die Keime zwar abzutöten, die abgetöteten Zellkörper verbleiben jedoch auf der Oberfläche (Costerton B, 2004). Diese abgetöteten Bakterien würden mit dem in dieser Studie verwendeten Fluoreszenzfarbstoff jedoch nicht mehr im grünen Bereich des Lichtspektrums, sondern unter Verwendung eines Rhodaminfilters im roten Bereich fluoreszieren.

Betrachtet man die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der PDLLA-beschichteten Plättchen der Gruppe II (Abb. 12 und Abb. 15), so ergibt sich eine Diskrepanz zu der mikrobiologischen Analyse. Nach 12 h Inkubation besiedelten deutlich weniger Keime die PDLLA-beschichteten Plättchen der Gruppe II als die unbeschichteten Titanplättchen. Die mikrobiologische Analyse ließ dagegen keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 5).

Poly(L,L-Laktid)- und Poly(D,L-Laktid)-Implantate sollen anfälliger für eine Besiedlung sein als metallische (Mainil-Varlet P, 2001). Andere Untersuchungen hingegen fanden an Poly(L,L-Laktid)- und Poly(D,L-Laktid)-beschichteten Materialien eine um 15–30 % verminderte Anhaftung im Vergleich zu unbeschichteten (Gollwitzer H, 2002; Kälicke T, 2006). Möglicherweise ist die glattere Oberfläche bei beschichteten Implantaten für diesen Effekt verantwortlich. Poly(D,L-Laktid) scheint darüber hinaus eine bakterizide Wirkung zu besitzen (Gollwitzer H, 2002; Gollwitzer H, 2003). Möglicherweise spielen auch pH-Veränderungen durch Laktatbildung bei der Hydrolyse eine Rolle, die wiederum die Ladungsverhältnisse auf der Implantatoberfläche verändern. Bakterizid wäre dann nicht das Material an sich, sondern das azide Milieu im Rahmen der Degradation.

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte eine antibiotikafreie Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung die Keimzahl jedenfalls nicht reduzieren (Lucke M, 2003; Lucke M, 2005), was auch im Einklang mit den mikrobiologischen Ergebnissen dieser Studie steht.

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse nach 1 h und 12 h Inkubation in der bakterienhaltigen Suspension bestätigte die mikrobiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse. Die Oberflächen der beschichteten Plättchen (Abb. 18–20) wirkten im Vergleich zu den unbeschichteten Titanplättchen (Abb. 16) glatter; vereinzelt waren kleine Lakunen zu erkennen (Abb. 19). Einschränkend muss erwähnt werden, dass keine genaue Analyse der Oberflächeneigenschaften in dieser Studie erfolgte.

Offensichtlich war nach 12 h Inkubation, dass die Oberfläche der unbeschichteten Titanplättchen (Gruppe I) von mehr Keimen als die Oberfläche der PDLLA+10 % Gentamicin beschichteten Plättchen (Gruppe III) besiedelt wurde.

Erkennbar war in Abb. 17C und 18C eine die Bakterien umhüllende und diese verbindende Substanz. Hierbei handelte es sich vermutlich um eine Polysaccharidmatrix, i. S. des bakteriellen Biofilms. Diese Vermutung beruhte allerdings nur auf der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Biochemische Verfahren zur Verifizierung dieser Vermutung sowie zur Analyse der Zusammensetzung des Biofilms wurden nicht durchgeführt. Auch könnte eine Untersuchung mittels fluoreszenzbasierter *In-situ*-Hybridisierung (FISH) weitere Informationen zum Biofilm geben (Moter A, 2000). Der Vergleich der in dieser Untersuchung angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder zeigt aber ein hohes Maß an Übereinstimmung mit Aufnahmen von bakteriellen Biofilmen aus anderen Studien (Bartoszewicz M, 2007; Smith K, 2008).

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Keim und Antibiotikum – Probleme *in vitro* und *in vivo*

Es wurde *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) verwendet. Es handelt sich um einen ubiquitär vorkommenden Keim, der zu den am häufigsten isolierten Erregern bei implantatassoziierten Infektionen gehört (Geipel U, 2004). Er ist in der Lage nach Adhäsion auf der Implantatoberfläche eine Polysaccharidmatrix, den bakteriellen Biofilm, zu bilden. Aufgrund dieser klinischen Relevanz wird *Staphylococcus aureus* in *In-vitro*- sowie *In-vivo*-Studien verwendet, um die Prophylaxe einer implantatassoziierten Infektion bzw. Osteomyelitis zu erforschen (Inzana JA, 2015; Lucke M, 2003; Lucke M, 2005, Stewart S, 2012).

Allgemein können *In-vitro*-Studien nur eingeschränkt mit einer Kolonisation und Infektion „natürlich“ vorkommender Keime verglichen werden. Laborkeime verfügen nicht über alle Eigenschaften der „wilden“ Stämme, wie z. B. eine sehr geringe Teilungsrate innerhalb des Biofilms. Die Teilungsrate der Laborkeime ist wesentlich höher, was sie sensibler auf Antibiotika macht. Das spiegelt sich in einer deutlich herabgesetzten minimalen Hemmkonzentration MHK wider (Bartoszewicz M, 2007).

Zudem verlieren Laborkeime, die mehrere Tausend Male übertragen wurden, ihre Fähigkeit zur Adhärenz an Oberflächen während „wilde“ Stämme auch weiterhin an glatten Oberflächen adhäreren können (Donlan RM, 2002).

In-vitro-Experimente mit Laborkeimen können daher zu falsch-positiven Resultaten führen (Costerton B, 2004).

In dieser Studie wurde Gentamicin, ein Antibiotikum der Aminoglykosidgruppe, verwendet. Die Wirkung des Gentamicins hängt von vielen Variablen ab. Bakterienart, Inokulumdichte und umgebendes Medium sind entscheidende Faktoren. So ergibt sich das Problem, dass durch das Antibiotikum bei einer Infektion nicht alle Keime direkt abgetötet werden könnten, sondern nur ein Teil. Die verbleibenden Keime können somit in der Lage sein, eine Infektion weiter zu unterhalten. In der vorliegenden Studie stieg die Keimmenge auf den antibiotikabeschichteten Plättchen mit der Inkubationszeit wieder langsam an; es waren aber nach 24 h Inkubation immer noch signifikant weniger Keime auf den Oberflächen als auf den antibiotikafreien Plättchen (siehe Abb. 5). Entscheidend ist, ob die Konzentration des Antibiotikums ausreicht, dass die körpereigene Immunabwehr den Wettstreit mit den Bakterien gewinnen kann.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass sich im Rahmen der klinischen Anwendung bei Verwendung von Gentamicin Probleme ergeben können. Zur systemischen perioperativen Prophylaxe ist Gentamicin trotz des breiten antibiotischen Spektrums und der hohen Knochengängigkeit nicht das Antibiotikum der Wahl. Der Grund hierfür ist die Oto- und Nephrotoxizität; bei eingeschränkter Nierenfunktion bzw. langer Therapiedauer kann das Antibiotikum kumulieren (Jankauskas S, 2012). Die Reduktion der notwendigen Gentamicinmenge bei lokaler Gabe und somit die Reduktion der Gefahr systemischer Nebenwirkungen stellt daher einen weiteren Vorteil dar.

Bei der lokalen Anwendung machen der schnelle Wirkungseintritt und die primär bakterizide Wirkung das Gentamicin zu einem geeigneten Antibiotikum. Mit Gentamicin angereicherter Polymethylmethacrylat (PMMA)-basierter Knochenzement wird schon über Jahrzehnte für die Prophylaxe im Rahmen chirurgischer Revisionen von Protheseninfekten verwendet (Diefenbeck M, 2006). Durch die lokale Freisetzung des Antibiotikums aus der Beschichtung kann schnell ein hoher Wirkstoffspiegel aufgebaut werden, zudem kann die Freisetzungskinetik durch die Modifizierung der Polymerbeschichtung variiert werden (Strobel C, 2011; Vester H, 2010). Außerdem hat die lokale Freisetzung des Antibiotikums neben einer prophylaktischen Wirkung auf implantatassoziierte Infektionen (Lucke M, 2003) den weiteren Vorteil, dass es zu keinen negativen Interaktionen mit dem Heilungsprozess des Knochens kommt. In einer tierexperimentellen Studie zur Osteotomieheilung zeigte sich in der Histologie und mechanischen Testung kein

negativer Einfluss auf die Knochenheilung einer gentamicinhaltigen PDLLA-Beschichtung von K-Drähten (Fassbender M, 2013).

Bakterien können in eine Sonderform übergehen: „*small colony variants*“ (SCV). Hierbei handelt es sich um langsam wachsende, etwa 10-mal kleinere Kolonien (Eiff von C, 2006), die auch für andere *Staphylokokken*-Spezies, wie etwa *S. epidermidis* sowie für *P. aeruginosa*, *E. coli* und einige andere Arten beschrieben worden sind. Das Vorliegen dieser SCVs konnte in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, da dies nicht explizit untersucht wurde. Jedoch zeigten die klassischen Methoden keine kleineren Kolonien.

Eine Alternative zu den Antibiotika kann die Verwendung von Antiseptika sowie von zytotoxischen metallionenhaltigen Beschichtungen in der Knochenchirurgie sein (Darouiche RO, 1998; Heidenau F, 2005). Der Vorteil der antiseptischen Beschichtung liegt in einem erweiterten Wirkspektrum auch gegen Pilze, in einer ausbleibenden Resistenzentwicklung sowie in einer schnellen destruktiven Wirkung auf die Zellfunktionen. Antibiotika haben vergleichsweise einen etwas verzögerten Effekt, da diese z. B. die bakterielle RNA-Polymerase blockieren und so auf die Proteinsynthese einwirken (Kälicke T, 2006).

Die Anwendung von antiseptischen Beschichtungen ist jedoch nicht unumstritten, da auch für Antiseptika wie Chlorhexidin bereits resistente *Staphylokokken*stämme nachgewiesen werden konnten (Harris LG, 2006). Hinzu kommt die Toxizität dieser Substanzen gegenüber Chondrozyten und Fibroblasten (Harris LG, 2006; Montali A, 2006).

Gegenstand weiterer Untersuchungen sind Versuche mit mehrfach beschichteten Implantaten, die in der Lage sind, neben dem Antibiotikum auch Faktoren freizusetzen, die das Knochenwachstum stimulieren (IGF-1 und BMP-2). Dies führt zu einer Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase von „*osteoblast-like cells*“ (Strobel C, 2011a). Eine neue Perspektive implantatassoziierte Infektionen zu reduzieren ohne die Knochenheilung negativ zu beeinflussen, ist die Beschichtung der Implantate im Nanobereich zu modifizieren.

In einer aktuellen *In-vitro*-Studie wurden Implantate nanostrukturell beschichtet, wobei dies zu einer verminderten Adhäsion von *S. aureus* führte; die Aktivität von Osteoblasten wurde hierbei nicht beeinträchtigt. Zusätzlich konnte durch diese wirkstofffreie Nanobeschichtung die Biofilmbildung reduziert werden (Izquierdo-Barba I, 2015).

4.2.2 Freisetzungskinetik und das „Onion“-Prinzip

Für die Eradikation eines adhärennten Keimes muss nicht nur die minimale inhibitorische Konzentration des Antibiotikums erreicht werden, sondern darüber hinaus ist diese auch über einen hinreichend langen Zeitraum aufrechtzuerhalten, da sonst die Gefahr einer Resistenzentwicklung der Mikroorganismen besteht.

Eine Möglichkeit zur verlangsamten Freisetzung des Wirkstoffes bietet eine zusätzliche äußere, „zwiebelschalen- bzw. onionartig“ angeordnete Poly(D,L-Laktid)-Schicht über der eigentlichen gentamicinhaltigen Schicht. Nach diesem Prinzip wurde die Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) beschichtet.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen, fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopischen Analyse zeigten aber, dass nach 1 h Inkubation keine bzw. nahezu keine Keime auf der Oberfläche der Plättchen waren, was zunächst gegen eine verzögerte Freisetzung des Antibiotikums spricht. Nach 6 h Inkubationszeit konnten wiederum signifikant mehr Keime auf der Oberfläche der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) quantifiziert werden als auf der Oberfläche der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin), wie Abb. 5 bzw. Tab. 5 zeigen. Nach 12 h und 24 h Inkubation änderte sich die Keimzahl auf den „zwiebelschalenartig“ beschichteten Plättchen der Gruppe IV (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) nicht mehr wesentlich. Der Grund für die Ineffektivität der zusätzlichen Polymerschicht könnte während des Beschichtungsvorganges (siehe 2.3) zu finden sein. Für beide Schichten wurde Ethylacetat als Lösungsmittel verwendet. Somit könnte während der zweiten Beschichtung die erste PDLLA+10 % gentamicinhaltige Schicht angelöst worden sein. Möglicherweise diffundierte das Gentamicin dann in die oberflächennahe PDLLA-Schicht und wurde schnell freigesetzt. Zum Untersuchungszeitpunkt 6 h waren dann wieder deutlich mehr Keime auf der Oberfläche als bei der Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA) zu finden, wenn auch weniger als auf den antibiotikafreien Plättchen. Das Gentamicin hatte dann keinen wirkungsvollen Effekt mehr auf die Adhäsion der Keime.

Eine ganz schlüssige Erklärung dieses Phänomens kann jedoch nicht gegeben werden; hierzu wären weitere Untersuchungen zur Modifikation des Beschichtungsverfahrens notwendig. So könnten z. B. das verwendete Lösungsmittel, die Beschichtungszeiten sowie die Dicke des Polymers variiert werden.

Eine weitere Möglichkeit die Freisetzungskinetik zu modifizieren, ist die Veränderung der Dicke der PDLLA-Schicht als auch der Konzentration des Antibiotikums. Bei geringerer PDLLA-Schichtdicke erfolgte, unabhängig von seiner Konzentration, die Freisetzung

des Antibiotikums am schnellsten (innerhalb von 4 h). Eine Erhöhung der Schichtdicke führte zu einer Verzögerung der Freisetzung mit einem Maximum zwischen dem ersten und dritten Tag. Mit zunehmender Schichtdicke beginnt der Freisetzungsprozess der tiefer liegenden Antibiotikamoleküle erst, nachdem ein Teil des Materials degradiert ist (Strobel C, 2011; Strobel C, 2011a).

Die Mechanismen, die bei einer solchen Freisetzung eine Rolle spielen, sind neben dem Prozess der Degradation, die Diffusion und die osmotischen Druckdifferenzen.

Die Diffusion der nahe an der Oberfläche liegenden Partikel ist für den initialen „burst-effect“ verantwortlich, der innerhalb von 6 h auftritt, wodurch in einer Zeitspanne von 24 h ca. 50 % des Antibiotikums freigesetzt werden (Koort JK, 2008; Teller M, 2007). In der Folge führen osmotische Druckdifferenzen dazu, dass Partikel ohne Verbindung zur Oberfläche eine solche Verbindung erhalten und ebenfalls freigesetzt werden können.

4.3 Limitierung der Untersuchung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Untersuchung die Effektivität der lokalen Applikation von Gentamicin aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Titanplättchen zur Reduktion der Keimadhäsion nachgewiesen werden konnte. In einem *In-vivo*-Modell führt dies zur Prophylaxe einer implantatassoziierten Osteomyelitis (Lucke M, 2003).

Bei dieser Studie handelt es sich um eine *In-vitro*-Untersuchung mit einem relativ kurzen Beobachtungszeitraum von 24 h. Es spielen sich zwar viele der Reaktionen, die Einfluss auf die Adhäsion von Keimen haben in diesem Zeitraum ab, die Mechanismen im lebenden Organismus sind aber deutlich komplizierter als es in einem *In-vitro*-Modell dargestellt werden kann. Interaktionen mit dem Immunsystem können in einem *In-vitro*-Modell natürlich nicht untersucht werden.

Für die Keimadhäsion spielen das Umgebungsmilieu und die Keimart eine Rolle; die Oberfläche des Materials hat einen entscheidenden Einfluss auf die Besiedlung. Zusätzlich sei die einschränkende Aussage bezüglich der Freisetzungskinetik des Antibiotikums *in vivo*, die z. B. durch die Akkumulation freier Radikale sowie durch den pH-Wert im traumatisierten Gebiet beeinflusst wird, erwähnt.

Durch den Versuchsaufbau war die statistische Aussagekraft dieser Untersuchung eingeschränkt. Eine statistische Analyse der Bakterienkonzentrationen in der Suspension im zeitlichen Verlauf (Abb. 4) sowie der Anzahl der fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Keimanhaftungen (Abb. 15) war aufgrund der zu geringen Fallzahl der nicht

normalverteilten Daten nicht möglich. Rückblickend sollte der Versuchsaufbau geändert werden; es sollte jedes Plättchen einzeln, auch die antibiotikafreien Plättchen, in der Nährlösung nach den Zeitpunkten getrennt inkubiert werden und nicht wie unter 2.5.4 beschrieben im Sinne einer „Gruppeninkubation“.

Es erfolgte 2005 eine CE-Kennzeichnung für gentamicinbeschichtete intramedulläre Tibianägel (UTN PROtect).

In einer publizierten prospektiven Studie wurden bereits mehrere Patienten nach offenen bzw. geschlossenen Tibiafrakturen mit gentamicinbeschichteten unaufgebohrten Marknägeln (UTN PROtect) behandelt. Die Knochenheilung verlief komplikationsfrei, tiefe Wundinfektionen traten nicht auf (Fuchs T, 2011).

Der breite Einsatz wird in einer prospektiv randomisierten Multicenter-Studie derzeit erprobt.

5. Literaturverzeichnis

Akiyama T, Miyamoto H, Yonekura Y, Tsukamoto M, Ando Y, Noda I, Sonohata M, Mawatari M. „Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia.“ *J Orthop Res.* 31, 2013; 8: 1195–2000.

Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. „Influence of material for fixation implants on local infection.“ *J Bone Joint Surg* 78-B, 1996; 4: 647–651.

Athanasίου KA, Agrawal CM, Barber FA, Burkhart S. „Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers.“ *Arthroscopy*, 1998: 726–737.

Baro M, Sanchez E, Delgado A, Perera A, Évora C. „In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants.“ *Journal of Controlled Release*, 2002; 83: 353–364.

Bartoszewicz M, Rygiel A, Krzeminski M, Przondo-Mordarska A. „Penetration of a selected antibiotic and antiseptic into a biofilm formed on orthopedic steel implants.“ *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja*, 2007: 310–318.

Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G. „Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws.“ *Biomaterials*, 1995: 25–31.

Blenkinsopp SA, Costerton JW. „Understanding the bacterial biofilm.“ *Trends in biotechnology*, 1991: 138–143.

Bostman OM, „Absorbable implants for the fixation of fractures.“ *J Bone Joint Surg*, 1991; 73-A: 148–153.

Brady JM, Cutright DE, Miller RA. „Resorption rate, route of elimination and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat.“ *J Biomed Mat Res*, 1973; 7: 155–166.

Buchholz HW, Engelbrecht H. „Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei der Vermischung mit dem Kunstharz Palacos.“ *Chirurg*, 1970: 511–515.

BVMed e.V. *Bundesverband Medizintechnologie*. 2013. <http://bvmed.de> (Zugriff am 2. August 2014).

Campoccia D, Montanaro L, Arciola C. „The significance of infection related to orthopedic devices and issue of antibiotic resistance.“ *Biomaterials*, 2006: 2331–2339.

Cioffi GA, Terezhalmay GT, Tybos GM. „Total joint replacement: a consideration for antimicrobial prophylaxis.“ *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1988; 66: 124–129.

Cook G, Costerton JW, Darouiche RO. „Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff.“ *J Antimicrob Agents* (Elsevier), 2000; 13: 169–173.

Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. „Influence of metal implants on infection.“ *J Bone Joint Surg*, 1994; 76-B: 717–720.

Costerton B, Cook G, Shirtliff M, Stoodley P, Pasmore M. *Biomaterials Science*. 2. Edition. Herausgeber: Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons J (Eds.) Ratner BD. Elsevier Academic Press, 2004.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin SH. „Microbial biofilms.“ *Annu Rev Microbiol*, 1995; 49: 711–745.

Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. „Vancomycin penetration into biofilmcovering infected prostheses and effect on bacteria.“ *J Infect Dis*, 1994; 3: 720–730.

Darouiche RO, Farmer J, Chaput C, Mansouri M, Saleh G, Landon GC. „Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails.“ *J Bone Joint Surg*, 1998; 80-A: 1336–1340.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. „The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.“ *Science*, 1998; 280: 295–298.

De Lalla F, „Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications.“ *J Chemother*, 1999; 11: 440–445.

Diefenbeck M, Mückley T, Hofmann GO. „Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics.“ *Injury*, 2006: 95–104.

Donlan RM, Costerton W. „Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.“ *Clin Microbiol Rev*, 2002: 167–193.

Eiff von C, Peters G, Becker K. „The small colony variant (SCV) concept-the role of staphylococcal SCVs in persistent infections.“ *Injury* (Elsevier), 2006; 37: 26–33.

Fassbender M, Minkwitz S, Kronbach Z, Strobel C, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B. „Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model.“ *Bone*, 2013: 298–304.

Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Reaschke M. „The use of gentamicin-coated nails in the tibia. Preliminary results of a prospective study.“ *Arch Ortho Trauma Surg*, 2011: 1419–1425.

Geipel U, Herrmann M. „Das infizierte Implantat Teil 1.“ *Orthopäde*, 2004: 1411–1428.

Gollwitzer H, Meyer H, Stemberger A. „Implantatinfektion und Strategien zur antibakteriellen Beschichtung.“ *Trauma Berufskrankh*, 2003: 347–352.

Gollwitzer H, „Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate: mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektive Oberflächen in der Orthopädieneonatologie.“ TU München, 2002.

Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B. „Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms.“ *J Surg Res*, 1998; 79: 146–153.

Gristina AG, „Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone.“ *Clin Orthop Rel Res*, 1994: 106–118.

Hallab NJ, „Orthopedic applications.“ In *Biomaterials Science*, von Hoffman AS, Schoen FJ Ratner BD, 526-555. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

Hansis M, Arens S, Wingenfeld C. „Infektionsraten in der Unfallchirurgie.“ *Der Unfallchirurg*, 1997: 457–464.

Harris LG, Richards RG. „Staphylococci and implant surfaces: a review.“ *Injury*, 2006: 3–14.

Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G, Gollwitzer H. „A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization.“ *J Mater Sci Mater Med*, 2005; 16: 883–888.

Heller J, Hoffman AS. „Drug delivery systems.“ In *Biomaterials Science*, von Hoffman AS, Schoen FJ, Ratner BD, 628-648. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

Heppert V, Wagner C, Glatzel U, Wentzensen A. „Prinzipien der operativ-chirurgischen Therapie der Osteitis.“ *Trauma Berufskrankh*, 2002: 321–328.

Herrmann R, Schmidmaier G, Markl B. „Antithrombogenic coating of stents using a biodegradable drug delivery technology.“ *Thromb Haemost*, 1999: 51–57.

Hippokrates. *Die Werke des Hippokrates – Das Buch vom Hebel*. Übersetzung: Dr. med. Richard Kapferer. Bd. 22. 26 Bde. Stuttgart: Hippokrates-Verlag Marquard & Cie., 1939.

Hogan A, Heppert VG, Suda AJ. „Osteomyelitis.“ *Arch Orthop Trauma Surg*, 2013: 1183–1196.

Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. „A novel murine model of established Staphylococcal bone infection in the presence of a fracture fixation plate to study therapies utilizing antibiotic-laden spacers after revision surgery.“ *Bone*, 2015; 72: 128–136.

Izquierdo-Barba I, García-Martín JM, Álvarez R, Palmero A, Esteban J, Pérez-Jorge C, Arcos D, Vallet-Regí M. „Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and Staphylococcus aureus proliferation.“ *Acta Biomaterialia*, 2015; 15: 20–28

Jankauskas SS, Plotnikov EY, Morosanova MA, Pevzner IB, Zorova LD, Skulachev VP, Zorov DB. „Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 ameliorates gentamycin-induced renal failure and hearing loss.“ *Biochemistry (Mosc.)*, 2012: 666–670.

Jansen B, Peters G. „Foreign body associated infection.“ *J Antimicrob Chemother*, 1993; 32: 69–75.

Kälicke T, Kutscha-Lissberg F, Frangen TM, Muhr G, Arens S. „Pathophysiology of posttraumatic osteitis.“ *Orthopäde*, 2004: 405–410.

Kälicke T, Schierholz J, Schlegel U, Frangen TM, Köller M, Printzen G. „Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: an in vitro and in vivo study.“ *J Orthop Res*, 2006; 24: 1622–1640.

Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Finlay BB. „Effect of antibiotics on human microbiota and subsequent disease.“ *Annu Rev Microbiol*, 2014; 68: 217–235.

Kohn J, Abramson S, Langer R. „Bioresorbable and bioerodible materials.“ In *Biomaterials Science*, von Hoffman AS, Schoen FJ, Ratner BD, 115–127. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

Koort JK, Mäkinen TJ, Suokas E. „Sustained release of ciprofloxacin from an osteoconductive poly(D,L)-lactide implant.“ *Acta Orthop*, 2008: 295–301.

Kutscha-Lissberg F, Hebler U, Kälicke T, Wingenfeld C, Arens S. „Inzidenz, Diagnose, Manifestations und Verlaufsformen der Osteitis.“ *Trauma Berufskrankh*, 2002: 297–305.

Lendlein A. „Polymere als Implantatwerkstoffe.“ *Chemie in unserer Zeit*, 1999: 279–295.

Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M. „Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats.“ *Bone*, 2003: 521–531.

Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. „Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model.“ *Bone*, 2005: 770–778.

Mader JT, Shirliff ME, Bergquist SC, Calhoun J. „Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis.“ *Clin Orthop Rel Res*, 1999: 47–65.

Mainil-Varlet P, Hauke C, Maquet V. „Polylactide implants and bacterial contamination: An animal study.“ *J Biomed Mater Res*, 2001; 54: 335–343.

Montali A, „Antibacterial coating systems.“ *Injury* (Elsevier), 2006; 37: 81–86.

Moter A, Göbel UB. „Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms.“ *Journal of Microbiological Methods*, 2000; 41: 85–112.

Ochsner PE, Hailemariam S. „Histology of osteosynthesis associated bone infection.“ *Injury* (Elsevier), 2006; 37: 49–58.

Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. „Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics.“ *Can J Vet Res* 66, 2002; 2: 86–92.

Otto M, „Staphylococcal biofilms.“ *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008; 322: 207–228.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. „MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues.“ *Annu Rev Microbiol*, 1994; 48: 585–617.

Periti P, Stringa G, Mini E. „Comparative multicenter trial of teicoplanin versus cefazolin for antimicrobial prophylaxis in prosthetic joint implant surgery. Italian study group for antimicrobial prophylaxis in orthopedic surgery.“ *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999; 18: 113–119.

Povacz F, *Geschichte der Unfallchirurgie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.

Saidi IS, Biedlingmaier JF, Whelan P. „In vivo resistance to bacterial biofilm formation on tympanostomy tubes as a function of tube material.“ *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999: 621–700.

Schakenraad JM, Dijkstra PJ. „Biocompatibility of Poly (DL-Lactic Acid/Glycine) copolymers.“ *Clin Materials*, 1991: 253–269.

Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. „Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review.“ *Injury*, 2006; 37: 105–112.

Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. „Biodegradable Poly(D,L-Lactide) Coating of Implants for Continuous Release of Growth Factors.“ *J Biomed Mater Res*, 2001; 58: 449–455.

Seong-Cheol P, Yoonkyung P, Kyung-Soo, H. „The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formations.“ *Int J Mol Sci*, 2011; 9: 5971–5992.

Singh R, Sripada L, Singh R. „Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell.“ *Mitochondrion*, 2014: 50–54.

Smith K, Perez A, Ramage G. „Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.“ *J Med Microbiol*, 2008; 57: 1018–1023.

Solano C, Echeverez M, Lasa I. „Biofilm dispersion and quorum sensing.“ *Curr Opin Microbiol*, 2014; 18: 96–104.

Stewart S, Barr S, Engiles J, Hickok NJ, Shapiro IM, Richardson DW, Parvizi J, Schaer TP. „Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study.“ *J Bone Joint Surg AM* 94, 2012; 15: 1406–1415.

Strobel C, Bormann N, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B. „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.“ *Journal of Controlled Release*, 2011a; 156: 37–45.

Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. „Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer.“ *Int J Artif Organs*, 2011; 34: 304–316.

Tas C, Kozluca A, Onur MA, Tümer A, Vahapoglu H. „In vivo degradation and release kinetics of chloramphenico-loaded poly(D,L)-lactide sponges.“ *Tissue Engineering*, 1998: 353–363.

Teller M, Gopp U, Neumann HG. „Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study.“ *J Biomed Mater Res*, 2007; 81B: 23–29.

Tsukayama T, „Pathophysiologie of posttraumatic osteomyelitis.“ *Clinical orthopaedics and related research*, 1999: 22–29.

Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, Stöckle U, Lucke M. „Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants. In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis.“ *Injury*, 2010: 1053–1059.

Wagner C, Hänsch GM, Wentzensen A, Heppert V. „Die implantatassoziierte posttraumatische Osteitis.“ *Unfallchirurg*, 2006: 761–769.

Wodtke J, Löhr JF. „Das infizierte Implantat.“ *Orthopäde*, 2008: 257–269.

Yoda I, Koseki H, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, Osaki M. „Effect of roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion.“ *BMC Microbiol*, 2014: 234.

Yokoyama K, Itoman M, Nakamura K, Uchino M, Hiroshi N, Yoshiaki K. „New scoring system predicting the occurrence of deep infection in open upper and lower extremity fractures: efficacy in retrospective re-scoring.“ *Arch Orthop Trauma Surg*, April 2009: 469–474.

Zhang X, Wyss UP, Pichora D, Goosen M. „A mechanistic study of antibiotic release from biodegradable poly(D,L-lactide) cylinders.“ *J of Controlled Release (Elsevier)*, 1994; 31: 129–144.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Reaktion auf Fremdkörper (Hallab NJ, 2004).....	17
Abb. 2: Ober- und Unterseite (mit Markierung) der verwendeten Titanplättchen.....	22
Abb. 3: a) Spiralmeter, b) Normierte Schablone mit CSA-Platte zum Auszählen der KBE	29
Abb. 4: Bakterienkonzentrationen in der Suspension im zeitlichen Verlauf.....	36
Abb. 5: Anzahl mikrobiologisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/mm ² im zeitlichen Verlauf.....	37
Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aspekte der vier Plättchentypen vor Inkubation. Gruppe III (PDLLA+10 % Gentamicin) zeigt die stärkste Autofluoreszenz bei 40× Vergrößerung.....	39
Abb. 7: Fluoreszenz der unbeschichteten Titanplättchen (Gruppe I) bei 40× Vergrößerung.....	40
Abb. 8: Fluoreszenz der PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe II) bei 40× Vergrößerung.....	41
Abb. 9: Fluoreszenz der PDLLA+10 % Gentamicin-beschichteten Plättchen bei 40× Vergrößerung.....	41
Abb. 10: Fluoreszenz der PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe IV) bei 40× Vergrößerung.....	42
Abb. 11: Zunehmende bakterielle Besiedlung der unbeschichteten Titanplättchen (Gruppe I) bei 40× Vergrößerung	43
Abb. 12: Besiedlung der PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe II) bei 40× Vergrößerung.....	44
Abb. 13: Besiedlung der PDLLA+10 % Gentamicin-beschichteten Plättchen (Gruppe III) bei 40× Vergrößerung	44
Abb. 14: Besiedlung der PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichteten Plättchen (Gruppe IV) bei 40× Vergrößerung.....	45
Abb. 15: Anzahl fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/μm ² im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist der Mittelwert aus dreimaliger Messung von jeweils 5 Bildern für je 2 Plättchen pro Gruppe	46

Abb. 16: Unbeschichtete Titanplättchenoberfläche ohne Bakterien nach 1 h Inkubation bei 100× (A) und 1000× Vergrößerung (B) sowie nach 12 h Inkubation bei 100× (C) und 1000× Vergrößerung (D).....	47
Abb. 17: Unbeschichtete Titanplättchen (Gruppe I) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 20.000× Vergrößerung (C). Pfeil: mögliche Polysaccharidmatrix.....	49
Abb. 18: PDLLA-beschichtete Plättchen (Gruppe II) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 20.000× Vergrößerung (C). Pfeil: mögliche Polysaccharidmatrix.....	50
Abb. 19: PDLLA+10 % Gentamicin-beschichtete Plättchen (Gruppe III) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 10.000× Vergrößerung (C).....	51
Abb. 20: PDLLA+10 % Gentamicin+PDLLA-beschichtete Plättchen (Gruppe IV) nach 1 h Inkubation bei 1000× Vergrößerung (A) und nach 12 h Inkubation bei 1000× (B) und 10.000× Vergrößerung (C).....	52

Tabellen

Tab. 1: Cierny-Mader-Klassifikation (mod. nach Heppert V, 2002)	13
Tab. 2: Anteil verschiedener Erreger implantatassoziiertes Infektionen.....	14
Tab. 3: Anzahl der in Bakteriensuspension inkubierten Plättchen der Gruppen I–IV	24
Tab. 4: Anzahl der in steriler Nährlösung inkubierten Plättchen der Gruppen I–IV	25
Tab. 5: Resultate des U-Tests aus der Anzahl mikrobiologisch nachgewiesener Keimanhaftungen KBE/mm ² im zeitlichen Verlauf (n.s. = nicht signifikant). Die Werte wurden nicht für einen Mehrgruppenvergleich adjustiert.....	37
Tab. 6: Ergebnisse der Resistenzbestimmung <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	38

Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. N.P. Haas, Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, in dessen Abteilung ich meine wissenschaftliche Arbeit anfertigen durfte.

Besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Wildemann, Projektleiterin am Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité, Universitätsmedizin Berlin, für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden des BAN-Teams.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. med. M. Lucke, Leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München sowie Herrn Prof. Dr. med. G. Schmidmaier, Leiter der Sektion Unfallchirurgie der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg.

Ich wurde durch diese Personen ständig mit Rat und Tat während der Durchführung und Auswertung meiner Arbeit unterstützt.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. S. Sadoni für die Unterstützung während der Planung des Projektes.

Dank gilt dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité für die Kooperation. Erwähnt seien hier Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U.B. Göbel und Herr Dr. med. R. Schiller, ohne deren Unterstützung die mikrobiologische Auswertung nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an meine bereits verstorbene Großmutter Heggi sowie an meine gesamte Familie, ohne die der Abschluss meines Studiums und das Anfertigen dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen wären.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Ehefrau Katrin Shams-Eddien bedanken. Sie hat mich vom Anfang bis zur Fertigstellung der Arbeit mit viel Geduld und Toleranz begleitet. Ich bin mir sicher, dass sie die Arbeit nach vielen Korrekturen nun nicht mehr sehen kann. Danke an meinen Sohn Tim, ich werde nun wieder mehr Zeit für Dich haben!

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationen

- Baumgartner, A., Schmeller, W.
Benigne symmetrische Lipomatose Launois Bensaude – eine therapeutisch undankbare Erkrankung
Praktische Dermatologie derm (20)2014:192–202.
- Schmeller, W., Baumgartner, A.
Operative Aspekte bei Liposuktion des Lipödems: Zwölf Fragen – zwölf Antworten
Lymphologie in Forschung und Praxis 18 (1)2014:6–12.
- Schmeller, W., Baumgartner, A.
Liposuktion bei benigner symmetrischer Lipomatose Launois-Bensaude
Lymphologie in Forschung und Praxis 17 (2)2013:83–87.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Axel Baumgartner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

- Experimentelle Untersuchung einer biodegradierbaren und antibiotikahaltigen Beschichtung von Titanplättchen auf das Adhäsionsverhalten von *Staphylococcus aureus* - selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift