

Aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. A. Stemberger und
Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt

vorgelegt über Prof. Dr. med. vet. Köstlin
Chirurgische Tierklinik der
Ludwig Maximilians Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. vet. U. Matis

**Induktion und Prophylaxe Implantat assoziierter Knocheninfektionen am Modell eines
antiinfektiv beschichteten Marknagels
-eine experimentelle Studie am Kaninchen-**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michaela Rößner
aus
Rosenheim

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Köstlin
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meiner Großmutter Elisabeth Hirsch gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Schrifttum..... | 2 |
| 2.1 | Inzidenz und Bedeutung Implantat assoziierter Knocheninfektionen..... | 2 |
| 2.2 | Überblick über Tiermodelle zur Osteomyelitis..... | 3 |
| 2.2.1 | Infektionen von Gelenkendoprothesen..... | 3 |
| 2.2.2 | Modelle zur Pin-Tract-Infektion | 5 |
| 2.2.3 | Modelle zur Untersuchung der Osteomyelitispathogenese | 5 |
| 2.2.4 | Osteomyelitismodelle mit verschiedenen Implantatmaterialien | 6 |
| 2.2.5 | Osteomyelitismodelle mit metallischen Implantaten und nachfolgender Therapie8 | |
| 2.2.6 | Weitere Osteomyelitismodelle mit nachfolgender Therapie..... | 10 |
| 2.3 | Pathogenese der Osteomyelitis..... | 12 |
| 2.3.1 | Allgemeine Pathophysiologie | 12 |
| 2.3.2 | Endogene Osteomyelitis..... | 13 |
| 2.3.3 | Posttraumatische Osteomyelitis | 14 |
| 2.3.4 | Therapie Implantat assoziierter Knocheninfektionen | 16 |
| 2.4 | Problematik der Biofilmbildung..... | 17 |
| 2.4.1 | Erregerspektrum | 17 |
| 2.4.2 | Bakterielle Adhäsion und Infektion | 18 |
| 2.5 | Die Beschichtung mit Poly-D,L-Laktid | 19 |
| 2.5.1 | Allgemeines..... | 19 |
| 2.5.2 | Gewebereaktion..... | 21 |
| 2.5.3 | Gentamicin | 22 |
| 3 | Eigene Untersuchungen..... | 24 |
| 3.1 | Zielsetzung | 24 |
| 3.2 | Material und Methoden | 25 |
| 3.2.1 | Materialien | 25 |
| 3.2.1.1 | Arzneistoffträger/Polymer..... | 25 |
| 3.2.1.2 | Antibiotikum | 25 |
| 3.2.1.3 | Lösungsmittel | 25 |
| 3.2.1.4 | Orthopädische Implantate | 25 |
| 3.2.2 | Beschichtungstechnologie..... | 26 |
| 3.2.3 | In-vitro-Untersuchungen | 27 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.2.3.1 | Sterilprüfung der Implantate | 27 |
| 3.2.3.2 | Elution von Gentamicin | 27 |
| 3.2.3.3 | Kapillarversuch | 28 |
| 3.2.4 | Versuchstiere | 28 |
| 3.2.5 | Versuchsplan | 29 |
| 3.2.5.1 | Induktion einer experimentellen Knocheninfektion..... | 30 |
| 3.2.5.2 | Operationsvorbereitung und Anästhesie | 30 |
| 3.2.5.3 | Operatives Vorgehen..... | 31 |
| 3.2.5.3.1 | Biokompatibilitätsgruppe | 31 |
| 3.2.5.3.2 | Osteomyelitisgruppe..... | 32 |
| 3.2.5.4 | Postoperatives Monitoring | 33 |
| 3.2.5.5 | Euthanasie und Sektion | 33 |
| 3.2.5.5.1 | Biokompatibilitätsgruppe | 33 |
| 3.2.5.5.2 | Osteomyelitisgruppe..... | 34 |
| 3.2.5.6 | Röntgenologische Untersuchung..... | 34 |
| 3.2.5.7 | Mikrobiologische Verlaufskontrolle | 34 |
| 3.2.5.8 | Histologische Verlaufskontrolle..... | 35 |
| 3.2.5.9 | Statistische Auswertung und Dokumentation | 36 |
| 3.3 | Ergebnisse | 36 |
| 3.3.1 | Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen | 36 |
| 3.3.1.1 | Sterilprüfung..... | 36 |
| 3.3.1.2 | Elution von Gentamicin | 36 |
| 3.3.1.3 | Kapillarversuch | 38 |
| 3.3.2 | Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen | 39 |
| 3.3.2.1 | Postoperative Versuchsphase | 39 |
| 3.3.2.2 | Biokompatibilitätsgruppe – Implantat ohne Beschichtung | 40 |
| 3.3.2.3 | Biokompatibilitätsgruppe – Implantat mit Beschichtung..... | 41 |
| 3.3.2.4 | Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat..... | 44 |
| 3.3.2.5 | Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat..... | 45 |
| 3.3.3 | Röntgenologische Auswertung | 48 |
| 3.3.4 | Mikrobiologische Auswertung der Kontrollgruppe | 49 |
| 3.3.4.1 | Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat und Infektion | 49 |
| 3.3.4.2 | Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat und Infektion | 50 |
| 3.3.5 | Histologische Auswertung | 50 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.3.5.1 | Biokompatibilitätsgruppe – Implantat ohne Beschichtung | 50 |
| 3.3.5.2 | Biokompatibilitätsgruppe – Implantat mit Beschichtung..... | 51 |
| 3.3.5.3 | Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat und Infektion | 51 |
| 3.3.5.4 | Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat und Infektion | 54 |
| 4 | Diskussion | 57 |
| 4.1 | Material und Methoden | 57 |
| 4.1.1 | Beschichtung der Marknägel..... | 57 |
| 4.1.2 | Tiermodell | 60 |
| 4.2 | In-vivo-Ergebnisse | 62 |
| 4.2.1 | Biokompatibilitätsgruppe | 62 |
| 4.2.2 | Osteomyelitisgruppe..... | 64 |
| 4.3 | Schlussfolgerung und Ausblick..... | 67 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 70 |
| 6 | Summary | 72 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 74 |
| 8 | Tabellenverzeichnis..... | 87 |
| 9 | Abbildungsverzeichnis | 88 |
| 10 | Abkürzungsverzeichnis | 89 |
| 11 | Danksagung..... | 90 |
| 12 | Lebenslauf..... | 92 |

1 EINLEITUNG

Alloarthroplastische Operationen wie auch die Implantation von Osteosynthesematerialien werden heute weltweit routinemäßig und mit gutem Erfolg durchgeführt.

Nach wie vor stellt jedoch die Knocheninfektion nach chirurgischen Eingriffen ein schwerwiegendes Problem dar. Die Anwesenheit von Bakterien im Knochen allein ist noch nicht ausreichend, um eine Osteomyelitis hervorzurufen. Diese seit langem bekannte und gefürchtete Erkrankung ist abhängig von der Keimzahl und Virulenz der Erreger als auch von der Abwehrlage des Organismus. Mit der Implantation körperfremder Materialien steigt jedoch die Infektionsgefahr. So konnten bereits erste In-vivo-Versuche von ELEK und CONEN (1957) zeigen, dass in Anwesenheit eines implantierten Seidenfadens bereits eine Anzahl von 100 Kolonie bildenden Einheiten (KBE) eines Staphylokokken-Stammes ausreicht, um eine Infektion zu erzeugen. Die Bedeutung einer effektiven Infektionsprophylaxe ist daher unumstritten. Ein Beispiel hierfür ist die Zumischung von Antibiotika zu Knochenzement wie sie 1970 erstmals von BUCHHOLZ und ENGELBRECHT sowohl als Präventivmaßnahme als auch zur Herdsanierung infizierter Endoprothesen beschrieben wurde. Eine Weiterentwicklung dieses Konzepts stellen die Polymethylmethacrylat-Ketten dar (KLEMM 1989). JOSEFSSON et al. (1990) untersuchten den Wert einer systemischen Antibiotikagabe im Vergleich zu gentamicinhaltigem Knochenzement bei der Erstimplantation künstlicher Hüftgelenke. Sie stellten für das erste Jahr eine geringere Infektionsrate in der Patientengruppe fest, die den Knochenzement als lokale Prophylaxemaßnahme erhielt. Weitere Fortschritte sind in der Entwicklung bioresorbierbarer Trägersysteme zu sehen, durch die sich eine Zweitoperation zur Implantatentfernung umgehen lässt. Der Vorteil der lokalen Therapie bzw. Prophylaxe ist darin zu sehen, dass am Ort der Infektion durch retardierte Freisetzung des Antibiotikums sehr hohe Wirkspiegel erzeugt werden, die bei systemischer Applikation mit Nebenwirkungen verbunden wären.

Die bakterielle Besiedelung der Implantatoberfläche ist als der Initialschritt in der Entstehung Implantat assoziierter Infektionen zu sehen.

In der vorliegenden Arbeit soll die antibakterielle Wirkung einer antiinfektiven, bioresorbierbaren und abriebstabilen Poly-D,L-Laktid-Beschichtung als Trägersubstanz für Gentamicin auf Osteosynthesematerialien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in der Verhinderung experimentell erzeugter Knocheninfektionen am Kaninchenmodell überprüft werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 **Inzidenz und Bedeutung Implantat assoziierter Knocheninfektionen**

Die Infektion ist eine gefürchtete und schwerwiegende Komplikation in der modernen Endoprothetik, Traumatologie und Orthopädie. Trotz der Fortschritte in der operativen Medizin und der Entwicklung moderner Antibiotika sowie entsprechender perioperativer systemischer Antibiotikagabe zählen postoperative Infektionen noch immer zu den häufigsten chirurgischen Komplikationen (DE LALLA 1999). Die Zahl künstlicher Hüftgelenke, die in Deutschland jährlich implantiert werden, wird auf 50.000 bis 60.000 geschätzt (PERDREAU-REMYINGTON et al. 1996). In den USA werden über 200.000 Hüft- und knapp 100.000 Kniegelenksendoprothesen implantiert (AN und FRIEDMAN 1996). Bei primär implantierten Hüftgelenksendoprothesen kommt es in 1 %, bei Kniegelenks- und Ellbogenendoprothesen in bis zu 5 % bzw. 7 % der Fälle zu Infektionen (GRISTINA et al. 1991; BENGTSON 1991; BAUER und SCHILS 1999).

Nach ARENS (2002) liegen weder auf globalem noch regionalem Niveau exakte epidemiologische Daten zur Inzidenz speziell der Osteitis vor. Die Erkrankung präsentiert sich heute überwiegend in ihrer chronischen posttraumatischen bzw. postoperativen Form. Sie ist eng an die Abwehrlage des Organismus sowie an die Durchblutungsverhältnisse im Knochen gebunden. So werden beispielsweise bei der Versorgung offener Frakturen, je nach Ausmaß des Weichteilschadens, Infektionsraten bis zu 50 % beschrieben (GUSTILO et al. 1990).

Die Therapie von Knochen- und Weichteilinfektionen besteht in einer gründlichen chirurgischen Herdsanierung und einer systemischen Antibiotikagabe über 4 bis 6 Wochen, die in der Regel mit einem längeren Klinikaufenthalt verbunden ist. Häufig lässt sich eine manifeste Infektion nur durch eine Entfernung des Implantats zum Stillstand bringen.

HEITEMAYER und HAX (1990) ermittelten die Behandlungskosten und Rentenleistungen im Rahmen der posttraumatischen Osteitis auf das 5- bis 7,5-fache im Vergleich zu gleichartigen Verletzungen mit komplikationslosem Verlauf. ARENS (2002) bezifferte in einer eigenen Untersuchung eine geschätzte volkswirtschaftliche Bedeutung infizierter Endoprothesen mit ca. 150 Mio. €/Jahr in Deutschland.

Für den betroffenen Patienten kann eine derartige Erkrankung eine massive Einschränkung seiner Lebensqualität bedeuten und letztlich sogar psychosoziale Konsequenzen nach sich ziehen aufgrund wiederholter langwieriger Therapien, Invalidität und Verlust der Arbeitsfähigkeit, psychischer Belastung und sozialer Desintegration.

Durch prophylaktische Antibiotikagaben sowie verbesserte Operationstechniken und –bedingungen (einschließlich ultrasteriler Luft) konnte die Infektionshäufigkeit seit 1975 deutlich gesenkt werden (AN und FRIEDMAN 1996).

2.2 Überblick über Tiermodelle zur Osteomyelitis

Die Pathogenese von Osteomyelitiden und Kunstgelenk assoziierten Infektionen ist ausgesprochen komplex und die Therapie derartiger Infektionen schwierig und mit weitreichenden Folgen für den Patienten verbunden. In den vergangenen Jahrzehnten wurden eine Vielzahl von Tiermodellen zur weiteren Aufklärung der Pathogenese, Untersuchung der Wirksamkeit von chirurgischen Maßnahmen sowie systemischer oder lokaler Antibiotikagabe entwickelt (NORDEN 1970; ANDRIOLE et al. 1973; RODEHEAVER et al. 1983; CALHOUN und MADER 1997; GÜRSEL et al. 2001). Um osteomyelitische Veränderungen zu erzeugen, werden in diesen Modellen sklerosierende Agentien, Implantate als Fremdkörper und die Inokulation von Bakteriensuspensionen verwendet (NORDEN 1970; PASSL et al. 1984; PETTY et al. 1985; CORDERO et al. 1994; EERENBERG et al. 1994; SCHULZ et al. 2001).

In den nachfolgenden Tabellen sind eine Auswahl an verschiedenen Osteomyelitismodellen nach verschiedenen Gesichtspunkten zusammengestellt.

2.2.1 Infektionen von Gelenkendoprothesen

Die Arthroplastik stellt den teilweisen oder vollständigen Ersatz eines Gelenkes dar, zu deren Verankerung Knochenzement oder aber eine besonders gestaltete Oberfläche ohne zusätzliche Verbindungsmaterialien (zementlose Endoprothese) verwendet wird (REMMELE 1984). Neben der aseptischen Lockerung ist die Infektion die häufigste Komplikation des Gelenkersatzes; die Infektionsraten liegen zwischen 1 und 5 % (BAUER und SCHILS 1999). Die bakterielle Infektion erfolgt hauptsächlich zum Zeitpunkt der Operation, während die endogene Autoinfektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur hämatogenen Infektion des Implantationsgebietes führen kann. Die Eintrittspforten für die Erreger sind diesem Fall die Haut, der Gastrointestinaltrakt oder der Genitaltrakt sowie die Mund- und Nasenhöhle. In der Diagnostik unterscheidet man zwischen Früh- und Spätinfektionen, über deren zeitliche Einteilung die Angaben in der Literatur variieren. Zusammengefasst kann jedoch festgehalten werden, dass Frühinfekte unmittelbar nach der Implantation auftreten und eine deutliche

SCHRIFTTUM

klinische Symptomatik mit schmerzhafter Beweglichkeit und Fixation des Gelenkes in leichter Beugstellung, Schwellung, Rötung und Gelenkerguss des betroffenen Gelenkes sowie veränderte Laborparameter und Fieber zeigen. Ein Spätinfekt kann dagegen nach Monaten oder sogar nach zwei bis fünf Jahren aufgrund eines anderen infektiösen Herdes im Körper auftreten und die Abgrenzung zur aseptischen Prothesenlockerung schwierig sein (AN und FRIEDMAN 1996; LEW und WALDVOGEL 1997; BAUER und SCHILS 1999).

Modelle zur Infektion von Gelenkendoprothesen beim Kaninchen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

| Arthroplastik | Bakterien | Implantat | Unter-suchungen | Zeitraum | Autor/ Jahr |
|----------------------------------|---|---|--|---------------------|------------------------------------|
| partieller Knie-gelenksersatz | E. coli, 2 x 10 ⁶ KBE, intraartikulär | Knochenzement mit und ohne Gentamicin | Mikrobiologie | 4, 8, 24 Wochen | Schurman et al. (1978) |
| vollständiger Knie-gelenksersatz | Staph. aureus, 11,5 x 10 ⁸ KBE, 6-8 Wochen post OP i.v. | Knochenzement mit und ohne Gentamicin | Mikrobiologie, Histologie | 10 bis 12 Wochen | Blomgren und Lindgren (1981) |
| partieller Hüft-gelenksersatz | Staph. aureus, 10 ¹ -10 ⁵ KBE, intramedullär bzw. i.v. bzw. 3 Wochen post OP i.v. | Stahlprothese mit Zement | Mikrobiologie | 4 Wochen | Southwood et al. (1985) |
| partieller Knie-gelenksersatz | Staph. aureus, 5 x 10 ⁶ KBE, intraartikulär | Silikon- Elastomer- Implantat | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 5 bis 8 Wochen | Belmatoug et al. (1996) |

Tabelle 1: Modelle zur Infektion von Gelenkendoprothesen beim Kaninchen

2.2.2 Modelle zur Pin-Tract-Infektion

Tabelle 2 stellt exemplarisch zwei Modelle zur Pin-Tract-Infektion beim Schaf dar. CLASPER et al. (1999) untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen Infektion und Lockerung eines Fixateur extern. DEJONG et al. (2001) brachten eine Hydroxyapatit-Chlorhexidin-Beschichtung auf Pins aus Stahl oder Titan auf und untersuchten deren antibakterielle Wirksamkeit.

| Modell | Implantat | Bakterien | Untersuchungen | Zeitraum | Autor/ Jahr |
|---------------|---|--|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Tibia | Fixateur externe | Staph. aureus, 2,5 x 10 ⁵ KBE/ml, davon 100µl | Klinik, Röntgen, Mikrobiologie, | 2 Wochen | Clasper et al. (1999) |
| Tibia | Pins aus rostfreiem Stahl und Titan | Staph. aureus, 10 ⁶ KBE/ml, davon 30µl | Klinik, Mikrobiologie | 2 Wochen | DeJong et al. (2001) |

Tabelle 2: Modelle zur Pin-Tract-Infektion beim Schaf

2.2.3 Modelle zur Untersuchung der Osteomyelitispathogenese

NORDEN (1970) verwendete Natrium morrhuate als sklerosierendes Agens, um die intra-medulläre Blutversorgung zu beeinträchtigen und das Angehen des Knocheninfektes zu erleichtern. Mit diesem Modell ließ sich in 91 % der Fälle eine Osteomyelitis erzeugen. Röntgenologische Veränderungen traten dabei erst nach 14 bis 21 Tagen auf. ANDRIOLE et al. (1973), PASSL et al. (1985) und WORLOCK et al. (1988) untersuchten die Osteomyelitispathogenese anhand eines Frakturmodells. EERENBERG et al. (1994) infizierten den Femur über einen lateralen Knochendefekt, um eine möglichst genaue Lokalisation der osteomyelitischen Veränderungen zu erzeugen (siehe Tabelle 3).

| Tierart und Modell | Implantat | Bakterien | Untersuchungen | Zeitraum | Autor/Jahr |
|---|--|---|---|--------------------|-------------------------------|
| Kaninchen Tibia (perkutane Injektion in die Markhöhle) | Sodium morrhuate als sklerosierendes Agens | Staph. aureus, 3 x 10 ⁶ KBE/0,1ml, 5% Sodium morrhuate | Klinik, Blut, Röntgen, Mikrobiologie | 60 bis 180 Tage | Norden (1970) |
| Kaninchen Tibia (Fraktur, Implantat und Inokulation) | Nagel | Staph. aureus, 2 x 10 ⁴ – 2 x 10 ⁹ KBE/ml | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 18 Monate | Andriole et al. (1973)) |
| Meerschweinchen Femur (Fraktur, Implantat und Infektion) | intramedullärer Draht | Staph. aureus, 10 ⁴ KBE/0,1ml und E. coli, 10 ⁵ KBE/0,1ml | Klinik, Röntgen, Mikrobiologie | 90 Tage | Passl et al. (1984) |
| Kaninchen Tibia (Fraktur und Wunde, Injektion in den Frakturspalt) | Kirschner-Draht | Staph. aureus, 10 ⁵ , 10 ⁶ oder 10 ⁷ KBE /0,5ml | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 12 Wochen | Worlock et al. (1988) |
| Kaninchen Femur (Infektion des Im- plantats über lateralen Knochendefekt) | Stahlnagel | Staph. aureus, 3 x 10 ⁵ KBE/0,1ml | Klinik, Mikrobiologie, Histologie | 28 bis 175 Tage | Eerenberg et al. (1994) |

Tabelle 3: Tiermodelle zur Osteomyelitispathogenese

2.2.4 Osteomyelitismodelle mit verschiedenen Implantatmaterialien

In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen beschrieben, die sich mit der Infektionsanfälligkeit verschiedener Implantatwerkstoffe beschäftigen und belegen, dass Bakterien sich an die meisten der gebräuchlichen Materialien anheften können. Tabelle 4 fasst einige dieser Modelle zusammen.

PETTY et al. untersuchten 1985 an Hunden den Einfluß gängiger Implantatwerkstoffe auf die Infektionsrate. Dazu brachten sie Implantate aus rostfreiem Stahl, Cobalt-Chrom-(Co-Cr)-Legierung, Polyethylen, vorpolymerisiertem Polymethylmetacrylat (PMMA) sowie in-situ polymerisierendem PMMA in die Femora von Hunden ein und infizierten sie mit Staphylococcus aureus (Staph. aureus), Staphylococcus epidermidis (Staph. epidermidis) und Escherichia coli (E. coli). Sie stellten fest, dass für die Infektion aller Implantate eine geringere Dosis an Staphylococcus aureus ausreichte als für die Infektion der Kontrolltiere, die kein Implantat erhielten.

CORDERO et al. (1994) untersuchten am Kaninchenmodell unterschiedliche Oberflächen von Zylindern aus einer Cobalt-Chrom-Molybdän-(Co-Cr-Mo)-Legierung bzw. einer Titan-Aluminium-Vanadium-(Ti-Al-V)-Legierung. Sie konnten zeigen, dass sowohl bei Implan-

ten einer Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung als auch bei Implantaten mit rauher Oberfläche eine geringere Keimdosis für eine Infektion ausreicht.

ARENS et al. (1996) implantierten Standard-6-Loch 2,0mm AO dynamische Kompressionsplatten (DCP) aus rostfreiem Stahl (ISO 5832-1) und Titan (ISO 5832-2) an die Tibia von Kaninchen und infizierten sie mit einer Staphylococcus aureus - Suspension in unterschiedlichen Konzentrationen. Ebenso wie CORDERO et al. (1994) konnten sie in Abhängigkeit vom Material eine signifikant höhere Infektionsrate belegen, nämlich 75% für Stahl und 35% für Titan.

MELCHER et al. (1994) untersuchten am Kaninchenmodell die Infektionsraten von hohlen geschlitzten Marknägeln aus Stahl im Vergleich zu massiven Marknägeln und stellten bei ersteren mit 59 %, im Vergleich zu 27 % für letztere, eine deutlich höhere Infektionsrate fest. Durch die größere Oberfläche des Hohl Nagels sowie die Erzeugung eines „dead space“ bei der Implantation des Marknagels in den Knochen erhöht sich die Infektanfälligkeit (MELCHER et al. 1994).

| Tierart und Modell | Implantat | Bakterien | Unter-suchungen | Zeitraum | Autor/Jahr |
|--|---|---|------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Hund Femur (Implantation und Infektion) | Zylinder aus rost-freiem Stahl, Co-Cr-Legierung, Polyethylen, vorpolymerisiertem PMMA, in-situ polymerisierendem PMMA | Staph. aureus, Staph. epidermidis, E. coli, 10^2 - 10^8 KBE/ml | Mikrobiologie, Histologie | 15 Tage | Petty et al. (1985) |
| Kaninchen Femur (zuerst Infektion der Markhöhle, dann Implantation) | Zylinder aus Co-Cr-Legierung bzw. Ti-Al-V-Legierung mit glatter oder rauher Oberfläche | Staph. aureus, 10^2 - 10^8 KBE/0,1ml | Mikrobiologie, Histologie | 4 Wochen | Cordero et al. (1994) |
| Kaninchen Tibia (Infektion der Markhöhle) | hohler geschlitzter Marknagel oder massiver Marknagel | Staph. aureus, 2×10^3 - 4×10^7 KBE/0,1ml | Röntgen, Mikrobiologie | 4 Wochen | Melcher et al. (1994) |
| Kaninchen Tibia (Knochenzement oder Zylinder aus Titan, perkutane Infektion der Markhöhle) | Knochenzement oder Zylinder aus Titan | 12 Wochen post OP: Staph. epidermidis, 5×10^3 , 5×10^5 , 5×10^7 KBE/0,1ml 16 Wochen post OP: Staph. aureus, 9×10^5 , 9×10^3 , 9×10^7 KBE/0,1ml | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 20 Wochen | Sanzén und Linder (1995) |
| Kaninchen Tibia (Implantation, perkutane Infektion der Platte) | Kompressionsplatten aus rostfreiem Stahl oder Titan | Staph. aureus, 4×10^3 - 4×10^6 KBE/100µl | Klinik, Mikrobiologie | 4 Wochen | Arens et al. (1996) |
| Kaninchen Femur (Implantation einer Biopsienadel in die Markhöhle, Aspiration von 1 ml Knochenmark, Infektion) | Biopsienadel, Sodium morrhuate als sklerosierendes Agens | Staph. aureus, $0,3 \times 10^6$ KBE/0,1ml, 5% Sodium morrhuate | Klinik, Mikrobiologie, Röntgen | 6 bis 8 Wochen | Schulz et al. (2001) |

Tabelle 4: Modelle zur chronischen posttraumatischen Osteomyelitis unter Berücksichtigung verschiedener Implantatmaterialien

2.2.5 Osteomyelitismodelle mit metallischen Implantaten und nachfolgender Therapie

In Tabelle 5 sind einige Tiermodelle dargestellt, die für die Erzeugung einer Osteomyelitis ausschließlich metallische Implantate verwendeten und verschiedene Therapieansätze untersuchten.

SCHRIFTTUM

| Tierart und Modell | Implantat | Bakterien | Therapie | Untersuchungen | Zeitraum | Autor - Jahr |
|--|---|--|--|---|-------------------|---------------------------------------|
| Ratte Tibia (Implantation, Infektion über Knochendefekt) | Implantate aus rostfreiem Stahl | Staph. aureus, $2,5 - 7 \times 10^7$ KBE/ml, davon 0,1ml | Calcium- Hydroxyapatit- Keramik oder Knochenzement mit Gentamicin oder Gentamicin parenteral | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie, Pharmako- kinetik | 12 Wochen | Korkusuz et al. (1993) |
| Kaninchen Tibia (Infektion über kortikale Defekte) | Kirschner- Drähte | Staph. aureus, 2×10^8 KBE/ml, davon $2 \times$ 0,5ml, | Kollagen mit Gentamicin oder Gentamicin parenteral | Mikrobiologie, Blutkulturen, Pharmako- kinetik | 1 Woche | Riegels- Nielsen et al. (1995) |
| Kaninchen Tibia (offene Fraktur) | Kirschner- Drähte | Staph. aureus, 10^7 KBE/ml, davon 0,1ml | Implantat- beschichtung mit Chlorhexidin- Chloroxylenol | Klinik, Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 6 Wochen | Darouiche et al. (1998) |
| Ratte Tibia (Implantation und intramedulläre Inokulation) | Kanüle aus rostfreiem Stahl, biofilm- inkubiert | Staph. aureus, 10^5 KBE/ml, davon 0,1ml | parenterale Antibiotika- Therapie über 21 Tage | Klinik, Mikrobiologie | 8 Wochen | Gracia et al. (1998) |
| Kaninchen Tibia (Implantation und Infektion) | Stücke aus Kirschner- Draht | Staph. aureus, 5×10^6 KBE/ml | 3 Wochen post OP Implantation von Poly- hydroxyalkanoate- Stiften mit Sulbactam- Cefoperazone | Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 5 bis 7 Wochen | Yagmurlu et al. (1999) |
| Kaninchen (Implantation und Infektion der Nadel) | 25G-Nadel | Staph. aureus, $3,7 \times 10^7$ KBE/ml, davon 0,1ml | 3 Wochen post OP Entfernung der Nadel und Implantation eines D,L-Dilaktids mit Pefloxacin | Klinik, Röntgen, Mikrobiologie, Pharmako- kinetik | 6 Wochen | Kanella- kopoulou et al. (2000) |
| Kaninchen Tibia (Implantation und Infektion der Markhöhle) | Implantate aus Stahl | Staph. aureus, 5×10^6 KBE/0,1 ml, davon 0,5ml | Poly- hydroxyalkanoate- Stifte mit Sulbactam- Cefoperazone und Sulbactam- Ampicillin | Klinik, Röntgen, Mikrobiologie, Pharmako- kinetik | 6 Wochen | Gürsel et al. (2001) |

Tabelle 5: Osteomyelitismodelle mit metallischen Implantaten und nachfolgender Therapie

2.2.6 Weitere Osteomyelitismodelle mit nachfolgender Therapie

In Tabelle 6 sind weitere verschiedene Osteomyelitismodelle aufgeführt, die Prophylaxe- und Therapieansätze untersuchten. Die lokale Anwendung von Antibiotika auf verschiedene Trägersubstanzen aufgebracht ist dabei geeignet, das Angehen einer Osteomyelitis zu verhindern (FITZGERALD 1983; JACOB et al. 1991; GERHART et al. 1993; NICOLAU et al. 1998). Als Zusatzmaßnahme zu einem Débridement führt die lokale Anwendung von Antibiotika im Knochen zum größten Erfolg (EVANS und NELSON 1993; GARVIN et al. 1994; CALHOUN und MADER 1997; ITOKAZU et al. 1997).

| Tierart und Modell | Bakterien | Therapie | Unter- suchungen | Zeitraum | Autor - Jahr |
|--|---|--|---|-------------------|---|
| Kaninchen Femur (Eröffnung am Knie und Aspiration des Knochenmarks, Infektion, Verschluss mit Knochen- zement) | Staph. aureus, $10^3 - 10^7$ E. coli, $10^4 - 10^8$ KBE/0,1ml | PMMA mit Colistin oder Erythromycin bzw. Knochenzement ohne Antibiotikum | Röntgen, Mikro- biologie, Histologie | 4 Wochen | Rode- heaver et al. (1983) |
| Hund Tibia (proximale Metaphyse, Kortexkürettage, Infektion, PMMA) | Staph. aureus, $10^3 - 10^9$ KBE/ml | PMMA mit Gentamicin | Röntgen, Mikro- biologie, Histologie | 12 Wochen | Fitzgerald (1983) |
| Ratte Tibia (Bohren oder Implantation einer Nadel, Infektion) | Staph. aureus, 3×10^6 KBE/5 μ l bzw. 25 μ l, 5% Natrium morrhuate, 5 μ l bzw. 25 μ l | 3 Wochen post OP: 14 bis 28tägige Therapie mit Oxacillin bzw. Ceftriaxone s.c. | Klinik, Blut, Röntgen, Mikro- biologie, Histologie | 35 bis 70 Tage | Rissing et al. (1985) |
| Kaninchen Tibia (perkutane Inokulation) | Staph. aureus, 3×10^6 KBE/0,1ml, 0,1ml 5% Natrium morrhuate, 0,1ml sterile PBS | Kalziumsulfat mit und ohne Gentamicin | Klinik, Röntgen, Mikro- biologie | 7 Wochen | Dahners und Funder- burk (1987) |
| Kaninchen Tibia (perkutane Inokulation) | Staph. aureus, 5×10^6 KBE/0,1ml, 0,1ml 5% Natrium morrhuate, 0,1ml sterile PBS | Mikrokapseln aus Poly-D,L-Laktid-co- Glykolid mit Ampicillin oder Ampicillin parenteral | Röntgen, Mikro- biologie, Pharmako- kinetik | 8 Wochen | Jacob et al. (1991) |

Fortsetzung

SCHRIFTTUM

| | | | | | |
|---|---|--|--|--------------|-----------------------------------|
| Kaninchen Radius (Osteotomie eines diaphysären Segments und Wiedereinsatz nach Bakterieninokulation) | Staph. aureus, 10^8 KBE | Débridement; Débridement plus PMMA mit und ohne Gentamicin; Débridement plus AB systemisch; Débridement plus PMMA mit Gentamicin und AB systemisch | Klinik, Mikro- biologie, Histologie | 8 Wochen | Evans und Nelson (1993) |
| Ratte Tibia (Knochendefekte werden mit Stück PMMA und Draht gefüllt, Entfernung nach 3 Wochen) | Staph. aureus, 10^4 KBE/10 μ l | 3 Wochen post OP: PMMA bzw. biodegradierbarer Knochenzement mit Vancomycin und Gentamicin | Klinik, Röntgen, Mikro- biologie | 6 Wochen | Gerhart et al. (1993) |
| Hund Tibia (kortikaler Defekt, PMMA als Fremdkörper) | Staph. aureus, 10^9 KBE/0,1ml | Débridement; Gentamicin i.m.; PMMA mit Gentamicin; Polylaktid- Polyglykolid-Polymer mit Gentamicin | Röntgen, Mikro- biologie, Histologie, Pharmako- kinetik | 10 Wochen | Garvin et al. (1994) |
| Kaninchen Tibia (laterale Metaphyse, Inokulation der Bakteriensuspension, PMMA) | Staph. aureus, 10^5 KBE/ml, davon 0,1ml | Poly-D,L-Laktid-co- Glykolid-Schwamm mit Vancomycin; Vancomycin syste- misch; mit und ohne Débride- ment | Röntgen, Mikro- biologie, Pharmako- kinetik | 6 Wochen | Calhoun und Mader (1997) |
| Ratte Tibia (Implantation eines in die Bakteriensuspension getränkten Seidenfadens) | Staph. aureus, 10^8 KBE | 4 Wochen post OP: Débridement; Débridement plus Hydroxyapatit-Blöcke mit Arbekacin; Débridement und AB systemisch | Röntgen, Mikro- biologie, Histologie, Pharmako- kinetik | 8 Wochen | Itokazu et al. (1997) |
| Kaninchen Femur (kortikaler Defekt, Inokulation der Bakterien- suspension in den Mark- raum) | Pseudomonas aeruginosa, 10^8 KBE/0,1ml | 4 Wochen post OP: D,L-Laktid-co- Glykolid-Polymer mit bzw. ohne Ofloxacin; Ofloxacin systemisch; Ofloxacin-Polymer und AB systemisch | Röntgen, Mikro- biologie, Histologie, Pharmako- kinetik | 8 Wochen | Nie et al. (1998) |
| Kaninchen Femur (kortikaler Defekt; Implantation des Polymers; i.v.-Infektion 1 Stunde post OP) | Staph. aureus, 5×10^4 KBE/ml i.v. | D,L-Laktid-Glykolid- Polymer mit Ofloxacin | Röntgen, Mikro- biologie, Pharmako- kinetik | 4 Wochen | Nicolau et al. (1998) |
| Kaninchen Femur (Aufbohren der Markhöhle, Infektion, Zement) | Staph. aureus, 10^6 KBE/0,1ml | Cefazolin systemisch oder Knochenzement mit Tobramycin | Klinik, Blut, Röntgen, Mikro- biologie, Histologie | 1 Woche | Nijhof et al. (2000) |

Tabelle 6: Weitere Osteomyelitismodelle mit nachfolgender Therapie

2.3 Pathogenese der Osteomyelitis

2.3.1 Allgemeine Pathophysiologie

Bei der Osteomyelitis handelt es sich um eine Entzündung bei der alle Bauelemente des Knochens betroffen sind, also das Knochenmark wie auch die knöchernen Anteile (KÖNN und POSTBERG 1970; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002). Dabei ist das von starren Hohlraum- und Kanalsystemen durchzogene Knochengewebe nach einer bakteriellen Infektion als Substrat für eine Keimvermehrung besonders geeignet (KINZL und FLEISCHMANN 1992). Die entzündlichen Prozesse spielen sich dabei primär im Markraum ab und greifen sekundär auf die Kompakta und Spongiosa der Tela ossea über (ADLER und RIEDE 1993). Später können sie in nekrotische und proliferative Prozesse übergehen (REMMELE 1984).

Eine aseptische Entzündung des Knochens ist meist traumatisch-mechanisch bedingt und von einer bakteriellen Knocheninfektion nicht zu unterscheiden (KÖNN und POSTBERG 1970; PLAUE 1970; CONTZEN 1970). Durch die Absiedelung von Bakterien kann daraus aber auch eine septische Knocheninfektion entstehen. Eine histologische Differenzierung zwischen endogener und exogener Osteomyelitis ist nicht möglich (BURRI 1974).

Bei den infektiösen entzündlichen Knochenerkrankungen sind je nach Art des Erregers spezifische Knocheninfektionen wie Syphillis, Typhus, Tbc oder mykotische Infektionen von solchen durch unspezifische Erreger abzugrenzen (ADLER 1983; REMMELE 1984; KINZL und FLEISCHMANN 1992).

Nach der Entstehungsweise unterscheidet man endogene und exogene Osteomyelitiden.

Bei der endogenen Form erfolgt die Ausbreitung der Keime hämatogen, wobei die ursprüngliche Eintrittspforte oft unbekannt ist (BURRI 1974). Sie stellt somit die septische Metastase eines infektiösen Herdes an anderer Stelle des Körpers dar (REMMELE 1984).

Die exogene posttraumatische Osteomyelitis stellt dagegen den primären und lokalen Befall des Knochens durch direkte Erregereinschleppung dar (WALDVOGEL et al. 1970; BURRI 1974; KINZL und FLEISCHMANN 1992). Nach PLAUE (1970) ist jeder Erreger für sich allein geeignet, die vielseitigen morphologischen Erscheinungsbilder der posttraumatischen Osteomyelitis hervorzurufen. Für die Entstehung und Manifestation der Infektion sind letztlich Anzahl und Virulenz der Keime, das Ausmaß des Gewebetraumas mit Zerstörung von Weichteilen und Knochen sowie die körpereigene Abwehrlage ausschlaggebend (NEUGEBAUER 1990; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002).

Bei der akuten Osteomyelitis ruft die Absiedelung der Keime im Markraum eine leukozytäre Entzündung mit der Bildung von Abszessen hervor. Gefäßschädigung und weiterer Gewebeeruntergang, verursacht durch Bakterienenzyme und lysosmale Enzyme der Leukozyten, führen zu einer Ausbreitung des entzündlichen Exsudats im Markraum. Dieses Ödem kann durch die Haversschen und Volkmannschen Kanäle bis unter das Periost gedrückt werden und hier einen subperiostalen Abszess hervorrufen. Durch die Thrombosierung von Gefäßen können sich septische Knocheninfarkte ausbilden. Das tote Knochengewebe wird durch aktivierte Osteoklasten aus dem Spongiosaverband herausgelöst. Diese Sequester stellen ihrerseits Fremdkörper dar, die ein vollständiges Ausheilen der Osteomyelitis verhindern und zu chronischen Rezidiven führen können. Zur Bildung einer Totenlade kommt es, wenn sich um einen Sequester eine bindegewebige Kapsel bildet, in der dann eine Knochenneubildung stattfindet (ARDEN 1977; WALDVOGEL et al. 1970; ADLER 1983; REMMELE 1984; ADLER und RIEDE 1993).

Histologisch ist eine akute Osteomyelitis gekennzeichnet von Fibrin, leukozytärem Exsudat, Blutungen und Bakterienhaufen (LEW und WALDVOGEL 1997). Kommt der Entzündungsvorgang nicht zum Stillstand, folgen diesem erhebliche Umbauvorgänge am Knochen (ADLER 1983; REMMELE 1984).

Bei einer chronischen Osteomyelitis finden sich zunehmend ein dichtes Narbengewebe sowie vorwiegend lymphoplasmazelluläre Infiltrate und blutgefüllte Kapillaren (ADLER 1983; LEW und WALDVOGEL 1997).

2.3.2 Endogene Osteomyelitis

Die hämatogene (endogene) Osteomyelitis tritt gehäuft bei Kindern und Jugendlichen auf und ist in den Metaphysen der langen Röhrenknochen (v.a. Tibia und Femur) lokalisiert (WALDVOGEL et al. 1970; ADLER und RIEDE 1993; LEW et WALDVOGEL 1997). Bei Säuglingen ist aufgrund der noch vorhandenen meta-epiphysären Gefäßverbindungen ein Einbruch in das Gelenk und somit die Bildung eines Pyarthros möglich (WALDVOGEL et al. 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992). Bei Erwachsenen ist diese Form der Osteomyelitis seltener und dann v.a. in den Wirbelkörpern bzw. in den diaphysären Bereichen der langen Röhrenknochen lokalisiert (WALDVOGEL et al. 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992; LEW und WALDVOGEL 1997). Eine Bakteriämie bzw. Sepsis ist die Voraussetzung für die metastatische Entstehung einer endogenen Osteomyelitis. *Staphylococcus aureus* zählt zu den häufigsten Erregern, dazu bei Säuglingen Streptokokken und Pneumokokken sowie bei

Erwachsenen gram-negative Keime (WALDVOGEL et al. 1970; BÖHM 1987; REMMELE 1984; LEW und WALDVOGEL 1997). Typische Symptome sind Fieber, Schüttelfrost, Unwohlsein, Schwellung und stechende Schmerzen in der betroffenen Gliedmaße. Die Blutkulturen sind meist positiv (WALDVOGEL et al. 1970; LEW und WALDVOGEL 1997). Die Therapie besteht in einer möglichst frühzeitigen parenteralen Gabe von Antibiotika für mindestens 4 Wochen (WALDVOGEL et al. 1970; LEW und WALDVOGEL 1997). Ein Übergang in eine sekundär chronische Form ist möglich.

2.3.3 Posttraumatische Osteomyelitis

Die postoperative Osteomyelitis stellt eine schwerwiegende Komplikation bei der operativen Frakturversorgung mit und ohne Weichteilverletzung sowie in der modernen Endoprothetik dar. Durch die chirurgische Eröffnung können Keime an und in den Knochen gelangen und zu einer Infektion führen (WALDVOGEL et al. 1970; LEW und WALDVOGEL 1997).

Anders als bei der endogenen Osteomyelitis, die sich als Allgemeinerkrankung mit Organmanifestation präsentiert, handelt es sich bei der posttraumatischen Osteomyelitis um einen primären Lokalbefall des betroffenen Knochens, wobei allgemeine Krankheitssymptome nicht unbedingt auftreten müssen (KINZL und FLEISCHMANN 1992). Im Gegensatz zur akuten hämatogenen Osteomyelitis ist das Keimspektrum bei der posttraumatischen Osteomyelitis polymikrobiell. Es werden v. a. *Staphylococcus aureus*, aber auch *Staphylococcus epidermidis*, Enterokokken, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, Klebsiellen, *Proteus* und Streptokokken isoliert (PLAUE 1988; BÖHM 1987; WALDVOGEL et al. 1970; GRISTINA 1987). Das Erscheinungsbild der Erkrankung ist dabei erregerunspezifisch und die Erstmanifestation des Infektes findet stets in unmittelbarer Nähe einer Weichteil- oder Knochenläsion statt (KINZL und FLEISCHMANN 1992). Der weitere Verlauf einer möglichen Knocheninfektion ist abhängig von Virulenz und Keimzahl, dem Ausmaß des Haut-, Weichteil- und Knochentraumas, den Durchblutungsverhältnissen des Knochens sowie den körpereigenen Abwehrmechanismen (KINZL und FLEISCHMANN 1992; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002).

Als eine der möglichen multifaktoriellen Entstehungsursachen der posttraumatischen Osteomyelitis ist ein Übergreifen von Weichteilinfektionen auf den benachbarten Knochen zu nennen (BURRI 1974). Nach Explosions- oder Schussverletzungen oder bei offenen Frakturen können die Erreger dagegen direkt in den Knochen gelangen (PLAUE 1970; WALDVOGEL et al. 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992; LEW und WALDVOGEL

1997). Traumatisiertes oder avitales Knochen- und Weichgewebe mit gestörten Durchblutungsverhältnissen und Frakturhämatome stellen dabei einen idealen Nährboden für die Erreger dar und sind besonders infektionsgefährdet (PLAUE 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992). Am häufigsten betroffen sind die unteren Extremitäten (WALDVOGEL et al. 1970; BÖHM 1987).

BURRI beschreibt bereits 1974, dass sich in Anhängigkeit vom Osteosyntheseverfahren spezifische Osteomyelitisformen mit bestimmten Merkmalen entwickelten. So ist bei der Bohrdrahtosteomyelitis die lokale Überwärmung oder sogar Hitzenekrose des Knochengewebes der infektfördernde Moment. Der Verlauf ist oft schleichend und lokalisiert und wird entscheidend von der intraoperativ erzielten Stabilität und der subkutanen Verlagerung der Drähte beeinflusst. Nach Entfernung des Drahtes kann der Infekt häufig spontan abheilen. Bei der Osteomyelitis nach Markraumfixation beeinträchtigt das Ausfräsen des Markraumes die intraossäre Blutversorgung erheblich und es kann dadurch zur Entstehung einer Markraumphlegmone kommen. Diese wird klinisch als Eiterung an der Nageleintrittsstelle manifest. Eine Osteitis nach Plattenosteosynthese wird durch ein infiziertes subkutanes Hämatom verursacht. Bei korrekter Reposition kann der Infekt nur langsam in die Tiefe dringen und bleibt anfangs auf das Hämatom und das Plattenbett beschränkt. Nur bei unvollständiger Adaptation und Instabilität breitet sich das entzündliche Geschehen in tieferliegende Gewebeareale aus.

Bei einer Frakturversorgung mit Drahtcerclagen erlaubt dieses Osteosyntheseverfahren keine stabile Fixierung der Frakturfragmente. Ein subkutaner Infekt kann sich somit aufgrund der durch die zirkuläre Fixation des Drahtes eingeschränkten periostalen Durchblutung rasch ausbreiten und wegen der nicht erreichten Stabilität ausdehnen (BURRI 1974).

Der weitere Verlauf ist also immer auch von der erreichten Stabilität durch die verschiedenen Osteosyntheseverfahren abhängig (PLAUE 1970). Mechanische Ruhe an der Fraktur stellt einen wesentlichen Faktor für das Abheilen eines Infektes dar, was sowohl tierexperimentell als auch klinisch als gesichert gilt (ANDRIOLE et al. 1973; PASSL et al. 1984; KINZL und FLEISCHMANN 1992; KINZL und SUGER 1996).

Auch das Operieren in einem traumatisierten Weichteilgebiet erhöht das Infektionsrisiko; zudem ist jede offene Fraktur als potentiell kontaminiert anzusehen (SCHAUWECKER und WELLER 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992).

Ein Frühinfekt ist gekennzeichnet durch die klassischen Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerzen. Daneben treten Fieber sowie eine Erhöhung der Blutkörperchengeschwindigkeit und Leukozytose auf (WALDVOGEL et al. 1970; NEUGEBAUER 1990). Diese Anzeichen können unmittelbar nach dem operativen Eingriff,

aber auch erst nach einigen Wochen oder gar Monaten auftreten und sich dann in der beschriebenen Weise manifestieren (BURRI 1974; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002).

Kommt es nach einer Fraktur oder Osteosynthese zu einer ossären Früh- oder Spätinfektion, die durch gezielte allgemeine oder lokale Maßnahmen nicht innerhalb von Wochen zum Abklingen gebracht werden kann, so wird der Zustand als chronische posttraumatische Osteomyelitis bezeichnet (BURRI 1974). Derartige Infektionen neigen auch noch nach Jahren immer wieder zu Rezidiven mit plötzlich aufflammenden Entzündungsschüben und sind von einer manifesten Erstinfektion schwer zu unterscheiden. Bei einem akuten Schub stehen demgemäß die oben beschriebenen Symptome im Vordergrund, während bei der persistierenden Form das charakteristische Merkmal die Fisteleiterung ist (BURRI 1974; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002).

2.3.4 Therapie Implantat assoziierter Knocheninfektionen

Infizierte avitale Knochenfragmente (Sequester) werden vom Organismus nicht revitalisiert sondern demarkiert und stellen somit Fremdkörper dar. Keime, die an diesen Sequestern anhaften, werden weder durch die körpereigene Abwehr noch durch systemische oder lokale antibiotische Behandlung abgetötet. Fortbestehende eitrige oder rezidivierende Infektionen sind die Folge (SCHWEIBERER 1970; KLEMM 1989; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002).

Eine gründliche chirurgische Herdsanierung mit der Entfernung allen avitalen und nekrotischen Gewebes sowie die Schaffung einer möglichst frühzeitigen Belastungsstabilität stellen folglich die wichtigsten Maßnahmen in der Therapie von Knochen- und Weichteilinfektionen dar (BURRI 1974; HEPPERT et al. 2002). Eine Entfernung des Implantats ist oft nicht zu umgehen (HEPPERT et al. 2002). Es trägt auch, wenn es keine Stabilisierung mehr liefert, vielmehr zur Ausbreitung der Infektion bei (SCHWEIBERER 1970). Das chirurgische Vorgehen soll durch eine gezielte systemische antibiotische Therapie über vier bis sechs Wochen ergänzt werden (WALDVOGEL et al. 1970; ANDERS et al. 2002).

Zur Sanierung des Infektlagers bei septischen Prothesenlockerungen sind die Entfernung des gesamten Prothesenmaterials, des Knochenzementes und aller infizierten und nekrotischen Weichteile sowie anschließende antibiotische Lokalbehandlung notwendig. Die Bedeutung der Spül- und Drainage in der lokalen Infektbehandlung an Knochen und Gelenk ist heute zugunsten neuerer Verfahren in den Hintergrund getreten. Klare Indikationen für ihre Anwendung bestehen noch bei einem akut infizierten Kunstgelenk, bei einem akuten Gelenkinfekt, bei der

Markraumphlegmone sowie in speziellen Fällen als Grundreinigung großer Infekthöhlen (WÖRSDÖRFER 1989).

Der lokalen Applikation von Antibiotika oder Antiseptika kommt lediglich der Stellenwert einer therapeutischen Zusatzmaßnahme zu, wobei der Wirkstoff in Konzentrationen freigesetzt werden soll, wie sie bei systemischer Gabe nicht erreicht oder toleriert werden (ASCHERL et al. 1989). Antibiotikahaltiger Knochenzement und PMMA-Antibiotika-Ketten haben sich in der Therapie posttraumatischer Osteomyelitiden wie auch als Prophylaxe bei ein- und zweizeitigen Prothesenwechseln bewährt (BUCHHOLZ und ENGELBRECHT 1970; KLEMM 1989). Ein Nachteil dieser nicht-resorbierbaren Trägermaterialien besteht darin, dass sie in der Regel durch eine weitere Operation mit allen Risiken wieder entfernt werden müssen. Biologische Trägersysteme werden dagegen resorbiert, so dass eine spätere Entfernung des Trägermaterials umgangen werden kann. Bedeutung hat hier z.B. der Kollagen-Gentamicin-Verbund (STEMBERGER et al. 1997) erlangt. Zahlreiche weitere Trägersysteme sind bis heute entwickelt worden und in der Literatur beschrieben (DAHNER und FUNDERBURK 1987; KORKUSUZ et al. 1993; ITOKAZU et al. 1997). Zu ihnen zählen auch die biodegradierbaren Polymere, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird.

2.4 Problematik der Biofilmbildung

2.4.1 Erregerspektrum

Als ubiquitär vorkommender Keim kann *Staphylococcus aureus* in Verbindung mit metallischen Implantaten Weichteilinfektionen und Osteomyelitiden auslösen (GRISTINA 1987; GRISTINA 1994). Koagulase negative Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*) werden häufiger bei Infektionen von Gefäßprothesen, Herzklappen, intravasalen Kathetern, Blasenkatetern etc. nachgewiesen (GRISTINA 1987). Des Weiteren umfasst das Keimspektrum in geringerer Häufigkeit oder als Mischinfektion *Escherichia coli*, Klebsiellen, Micrococaceen, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptococcus* Spezies, *Proteus* Spezies sowie β -hämolyisierende Streptokokken (GRISTINA 1994, AN und FRIEDMAN 1996). In seltenen Fällen wird über Infektionen von Gelenkendothesen durch *Candida* Spezies, *Campylobacter fetus* oder *Mycobacterium tuberculosis* berichtet (AN und FRIEDMAN 1996). Infektionen durch *Staphylococcus aureus* zeigen einen schwereren Verlauf als solche durch *Staphylococcus epidermidis*, der als weniger virulent gilt (CUNNINGHAM et al. 1996; AN und FRIEDMAN 1996).

2.4.2 Bakterielle Adhäsion und Infektion

Jedes in den Körper eingebrachte Implantat wird unmittelbar postoperativ von einem proteinreichen Film überzogen, der Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Osteonectin, Vitronectin sowie Zellen wie Thrombozyten und andere Proteine enthält (BAIER et al. 1984; AN und FRIEDMAN 1996; HABASH und REID 1999). Dieser „conditioning film“ ist notwendig für die Adhäsion von Gewebezellen und damit für die erfolgreiche Integration eines Implantats. Metallische Implantate sind physiochemisch aktiv und können somit chemische Reaktionen katalysieren (GOMER 1982). Des Weiteren vermitteln sie durch ihre Oberflächenenergie und Oberflächenoxide die Interaktion mit Elementen des „conditioning films“ und Gewebezellen (GRISTINA 1987). Die Adhäsion von Bakterien an die Oberfläche von Biomaterialien, an traumatisiertes oder avitales Gewebe wird als der Initialschritt in der Pathogenese Implantat assoziierter Infektionen und nachfolgender chronischer Osteomyelitiden angesehen (GRISTINA et al. 1985).

Eine Infektion erfolgt entweder auf direktem Wege (Hautkeime des Patienten oder Chirurgen, kontaminiertes OP-Besteck, Luftkeime) oder auf hämatogenem oder lymphogenem Weg (DAVIS et al. 1999; AN und FRIEDMAN 1996).

Die bakterielle Adhäsion an Implantatoberflächen kann auch durch Plasmaproteine vermittelt werden. So bindet *Staphylococcus aureus* z. B. an Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen und in geringerem Ausmaß an Laminin, während *Staphylococcus epidermidis* nur an Fibronectin bindet (HERRMAN et al. 1988). Thrombospondin, Vitronectin, Elastin und Knochen-Sialoprotein wird ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Knochen- und Gelenkinfektionen zugesprochen (GRISTINA et al. 1991; CUNNINGHAM et al. 1996).

GRISTINA (1987) hat die komplexen Vorgänge, die nach der Implantation ablaufen, als „race for the surface“ konzipiert und beschreibt damit eine Art Wettlauf zwischen Bakterien und Gewebezellen um die Integration auf der Implantatoberfläche. Gewinnen die körpereigenen Zellen, so wird die Werkstoffoberfläche von einer Schicht vitaler Zellen bedeckt und ist somit gegenüber einer bakteriellen Besiedelung mehr oder weniger resistent. Ein antibiotischer Schutz in dieser kritischen Phase kann somit für den Erfolg eines Implantats von Bedeutung sein (GRISTINA et al. 1991). Die bakterielle Anheftung, Kolonisation und schließlich die sekundäre Biofilmbildung laufen in mehreren zeitabhängigen Schritten ab, die mittlerweile vielfach untersucht worden sind. Dabei kommt es ab einer kritischen Distanz von 1 nm zur irreversiblen Bindung durch sogenannte „short-range interactions“. Dazu zählen sowohl rezeptorvermittelte Interaktionen wie auch die Bildung bakterieller Exopolysaccharide

(GRISTINA 1987; BLENKIONSOPP und COSTERTON 1991; HABASH und REID 1999). Letztere vermitteln die Verankerung an der Implantatoberfläche wie auch die Zell-Zell-Adhäsion, so dass sich Mikrokolonien, bestehend aus nur einer oder aber mehreren Spezies, bilden (GRISTINA 1987; BLENKINSOPP und COSTERTON 1991; GRISTINA 1994).

Biofilme werden heute als strukturierte und organisierte Einheit verschiedener Bakterien angesehen, die in Symbiose miteinander innerhalb einer von ihnen selbst produzierten Matrix aus Exopolysacchariden an Substrate angeheftet leben (COSTERTON et al. 1999). Innerhalb dieses Biofilms herrscht für die Mikroorganismen ein für ihre rasche exponentielle Vermehrung hervorragendes Mikroklima. Sie können direkt an der Implantatoberfläche Metall- oder auch abgebaute Polymerbestandteile wie auch abgestorbene Gewebezellen als Nährstoffe verwenden (GRISTINA 1987). Freiwerdende Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} dienen der Stabilisierung des Biofilms, während für die aus den Legierungen der Implantate freigesetzten Ionen wie Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} und Cr^{2+} eine virulenzsteigernde Wirkung durch Inhibition der Makrophagenfunktion bekannt ist (GRISTINA 1987). Desweiteren bietet er Schutz vor der körpereigenen Immunabwehr und Antibiotika (BURET et al. 1991; AN und FRIEDMAN 1996).

Nekrotischer Knochen und traumatisiertes Gewebe im Rahmen von Osteomyelitiden stellen neben körperfremden Materialien ein geeignetes Substrat für die Entwicklung eines Biofilms dar, wobei die in der Primärphase anhaftenden Keime in diesen Schleimfilm eingeschlossen sind (MAYBERRY-CARSON et al. 1984). Für eine Eradikation dieser Keime sind Antibiotikakonzentrationen notwendig, die weit über der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) liegen, wie NAYLOR et al. in einer Studie zeigen konnten (NAYLOR et al. 1990). WEBB et al. (1994) konnten dieses Ergebnis belegen und wiesen zudem eine reversible Erhöhung der Antibiotikaresistenz bei Keimen nach, die an Knochen anhaften.

2.5 Die Beschichtung mit Poly-D,L-Laktid

2.5.1 Allgemeines

In den Fachbereichen Orthopädie und Unfallchirurgie hat der Einsatz von Biomaterialien als Wirkstoffträger immer größere Bedeutung gewonnen. Sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von Knochen- und Weichteilinfektionen haben sich diese Stoffe, die permanent oder vorübergehend am Infektionsort eingebracht werden, als Antibiotikaträger in der Klinik bewährt (WINCKLER et al. 1992). Neben nicht abbaubaren Materialien wie z.B. PMMA oder Siliconverbindungen haben mittlerweile biodegradierbare Polymere, insbesondere

polymere Verbindungen vom Typ der Milch- und Glykolsäure große Bedeutung erlangt (THOMA und SCHLÜTERMANN 1991; LENDLEIN 1999). Diese werden inzwischen als resorbierbares Naht- oder Osteosynthesematerial oder als parenteral zu applizierende Wirkstoffträger eingesetzt (THOMA und SCHLÜTERMANN 1991; MIDDLETON und TIPTON 2000).

Biokompatible oder biodegradierbare Polymere werden durch im Körper einsetzende chemische oder biologische Prozesse zu ausscheidbaren oder verstoffwechselbaren Substanzen wie z. B. Milch- und Glykolsäure abgebaut (THOMA und SCHLÜTERMANN 1991).

Als Laktid bezeichnet man die cyclischen Dimere der Milchsäure, die in zwei optischen Isomeren, D und L, vorliegt (LENDLEIN 1999; MIDDLETON und TIPTON 2000). Durch ringöffnende Polymerisation von Laktiden durch Katalysatoren, wie z. B. Zinkoxid, können höhermolekulare polymere Verbindungen, die Polylaktide, hergestellt werden (KULKARNI et al. 1971; LAURENCIN und LANE 1994; THOMA und SCHLÜTERMANN 1991).

Der Abbau von Polymeren erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen wie Hitze, Oxidation und enzymatische Vorgänge (LAURENCIN und LANE 1994). Aufgrund der hydrolytisch instabilen Bindungen im Polymergerüst der Biomaterialien ist der häufigste Abbauweg die Hydrolyse (MIDDLETON und TIPTON 2000). Polylaktide werden zu Milchsäure hydrolysiert, in den Zitratzyklus eingeschleust und enzymatisch zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut (ATHANASIOU et al. 1998; MIDDLETON und TIPTON 2000).

Man unterscheidet verschiedene Abbaumechanismen des Polymergerüsts. Das Wasseraufnahmevermögen ist sowohl für den Polymerabbau wie auch für die Wirkstofffreisetzung von Bedeutung (THOMA und SCHLÜTERMANN 1991). Nach LENDLEIN (1999) erfolgt bei der sogenannten „bulk erosion“, dem „Abbau in der Masse“, die Diffusion des Lösungsmittels in die Polymermatrix rascher als das Polymer abgebaut wird. Die hydrolysierbaren Bindungen im gesamten Polymergerüst werden gleichmäßig gespalten und die mittlere Molmasse des Polymers nimmt gleichmäßig ab. Beim Oberflächenabbau dagegen, der sogenannten „surface erosion“, ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser in die Polymermatrix kleiner als die Abbaugeschwindigkeit des Polymers und der Abbau findet in einer dünnen Oberflächenschicht statt.

Poly-D,L-Laktid ist ein amorphes Polymer das rascher abgebaut wird als das semikristalline Poly-L-Laktid (KULKARNI et al. 1971; LENDLEIN 1999). Es ist unlöslich in Wasser und Methanol und löslich in Aceton, Benzen, Dioxan, Tetrahydrofuran und chlorierten Kohlenwasserstoffen wie Chloroform und Methylenchlorid (THOMA und SCHLÜTERMANN 1991).

Die Resorptionsdauer beträgt nach PITT et al. (1981) bei Poly-D,L-Testkörpern mit einer molaren Masse von 14000 ca. 28 Wochen, bei einer Molmasse von 49000 dagegen 60 Wochen. Ab einer kritischen Molmasse von 10000 wird das Polymer löslich (SCHAKENRAAD und DIJKSTRA 1991) und letztlich vollständig vom Organismus metabolisiert (LAURENCIN und LANE 1994).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine hohe mechanische Stabilität der Beschichtung auf metallischen Implantaten (SCHMIDMAIER 2001a; GOLLWITZER 2002). Des Weiteren konnten in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe sowohl antibakterielle wie auch knochenheilungsfördernde Effekte der Poly-D,L-Laktid-Beschichtung allein nachgewiesen werden (SCHMIDMAIER 2001b; GOLLWITZER 2002).

2.5.2 Gewebereaktion

In der Literatur sind zahlreiche Studien beschrieben, die sich mit der Gewebeverträglichkeit von Polylaktiden sowie Polyglykoliden und ihren Copolymeren beschäftigen und deren gute Biokompatibilität bestätigen.

GETTER et al. (1972) untersuchten Platten und Schrauben aus Polylaktid zur Behandlung von Unterkieferfrakturen beim Hund und konnten keine negativen Auswirkungen auf den Knochen und die Frakturheilung feststellen. HOLLINGER (1983) therapierte knöcherne Defekte in Rattentibiae mit Implantaten aus einem 50:50 Polylaktid-Polyglykolid-Copolymer. Er konnte histomorphometrisch eine verbesserte Frakturheilung in den ersten 28 Tagen des Untersuchungszeitraumes und einen osteoinduktiven Effekt des Polymers nachweisen.

VISSCHER et al. (1985) untersuchten Mikropartikel aus Poly-D,L-laktid-co-glykolid, die in die Muskulatur implantiert wurden, auf ihre Gewebeverträglichkeit. Innerhalb von Tagen wurde nur eine subakute Entzündungsreaktion mit dem Auftreten von Neutrophilen und weiteren Leukozyten beobachtet. Nach Wochenfrist war die Bildung einer dünnen Bindegewebskapsel und das Auftreten von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen nachweisbar sowie ein deutlicher Rückgang chronischer Entzündungszellen.

PÄIVARINTA et al. (1993) untersuchten Schrauben aus Polylaktid oder Polyglykolid am osteotomierten Kaninchenfemur und wiesen ebenfalls nur milde Entzündungsreaktionen mit dem Auftreten von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen nach. SCHMIDMAIER et al. (2001b) untersuchten die vorliegende Poly-D,L-Beschichtung an einem Tibiafrakturmodell an der Ratte und konnten eine gute Biokompatibilität im Knochenlager sowie eine beschleunigte Frakturheilung feststellen.

Allerdings wird in der Literatur bei der Verwendung von Polymeren als Implantatwerkstoffe auch über das Auftreten von Osteolysen berichtet (SUGANUMA und ALEXANDAR 1993). Als mögliche Ursache werden Fremdkörperreaktionen oder eine lokale Änderung des pH-Wertes, bedingt durch den fortschreitenden Abbau des Polymers, angeführt. VERHEYEN et al. (1993) konnten in ihrer Studie nach einem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren kristalline Polymerpartikel in den Inguinallymphknoten der Ziege nachweisen.

2.5.3 Gentamicin

Gentamicin zählt zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika und ist ein hochwirksames Breitbandantibiotikum sowohl gegen gram-negative als auch gram-positive Bakterien. Gentamicin ist wasserlöslich, chemisch stabil und hitzebeständig. Typische Erregerspektren bei Implantat assoziierten Infektionen wie z.B. Staphylokokken, Enterobakteriaceen (z. B. *Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonellen*, *Klebsiellen* usw.) und *Pseudomonas aeruginosa* werden erfasst. Sein bakterizider Wirkmechanismus, sowohl auf ruhende als auch proliferierende Keime, beruht auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese durch irreversible Bindung an die 30 S-Einheit der Bakterienribosomen und unkorrekten Translation des genetischen Codes auf der mRNA. Als weiterer Wirkmechanismus wird eine Leckbildung in der Zellmembran vermutet (ESTLER 2000). Obligate und fakultativ anaerobe Erreger sind gentamicinresistent. Zur systemischen Therapie müssen Aminoglykoside parenteral (i.m., i.v.) verabreicht werden, da sie aufgrund ihrer hohen Hydrophilie kaum aus dem Magen-Darm-Trakt und nicht über die intakte Haut und Schleimhaut resorbiert werden. Die übliche Dosierung von Gentamicin liegt zwischen 2 und 5 mg/kg KG/d. Gentamicin wird kaum an Plasmaproteine gebunden und verteilt sich bei parenteraler Gabe nur auf den extrazellulären Raum. Die Ausscheidung erfolgt unverändert über die Nieren. Der Nachteil des Gentamicin liegt, wie bei allen Aminoglykosiden, in der geringen therapeutischen Breite. Als kritischer Spiegel gelten für Gentamicin erfahrungsgemäß 10 µg/ml Plasma. Bei Überdosierung wirkt es oto- und nephrotoxisch, daneben treten als weitere unerwünschte Wirkungen neuromuskuläre Blockaden (selten) und Allergien auf. Gentamicin findet seit langem in der Knochen-, Gelenk- und Weichteilchirurgie lokale Verwendung durch Einbringen in Knochenzement (Palacos®) oder als sogenannte Antibiotika-Ketten (Septotal®), z. B. zur chirurgischen Herdsanierung nach septischen Prothesenwechseln, Osteomyelitiden oder zur perioperativen Prophylaxe bei Kunstgelenksendoprothesen. Der Vorteil liegt in einer hohen Wirkstoff-

SCHRIFTTUM

konzentration am Ort des Infektgeschehens unter Vermeidung systemischer Nebenwirkungen (WHELTON 1984; FORTH et al. 1996; ESTLER 2000).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Eine effektive Infektprophylaxe ist oberstes Ziel zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen. Die Ausrüstung von Osteosynthesematerialien mit einer antiinfektiven Beschichtung kann als neue innovative Maßnahme zur Vorbeugung von Infektionen angesehen werden.

Das vorliegende resorbierbare Arzneistoffträgersystem muß hinsichtlich seiner Gewebeverträglichkeit und Wirksamkeit gemäß geltendem Medizinprodukte- und Arzneimittelgesetz in vivo getestet werden. Ein derartiges Trägersystem sollte mechanisch stabil und vollständig resorbierbar sein und darf im Organismus zu keinen unerwünschten Reaktionen führen. Das hier zu erprobende Verfahren ist als Präventivmethode gedacht, mit der die Infektionshäufigkeit drastisch reduzieren werden soll.

Die mechanische Stabilität, antiinfektive und antithrombogene Eigenschaften der Beschichtung sowie das Freisetzungsverhalten eingearbeiteter Wirkstoffe wurden bereits durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (GOLLWITZER 2002) belegt.

In der vorliegenden Studie soll diese Beschichtung hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen untersucht werden.

Es stehen Implantate aus medizinischem Stahl zur Verfügung, die durch Bohrungen im 90°Grad-Winkel einem Verriegelungsnagel vergleichbar sind. Die Marknägel werden unter sterilen Kautelen mit einem resorbierbaren Arzneistoffträger auf der Basis von Polymilchsäure (Resomer R203®) und dem Antibiotikum Gentamicin beschichtet.

Zunächst sollen in vitro die Sterilprüfung der Implantate, die Elution des Gentamicin und der Kapillarversuch zum Nachweis der bakteriziden Eigenschaften der Beschichtung durchgeführt werden.

In vivo werden gentamicinbeschichtete gegenüber unbeschichteten Marknägel getestet und dazu folgende Untersuchungen an zwei Gruppen von Kaninchen durchgeführt:

In der Biokompatibilitätsgruppe werden das Allgemeinbefinden der Tiere sowie das Blutbild kontrolliert, die Gentamicinkonzentration im Serum bestimmt und die Femora post mortem zum Nachweis der Gewebeverträglichkeit histologisch untersucht.

In der Osteomyelitisgruppe wird mit dem Einbringen der Implantate eine Bakteriensuspension von human-pathogenem *Staphylococcus aureus* injiziert und das Allgemeinbefinden der Tiere, das Blutbild und die Gentamicinkonzentration im Serum untersucht. Post mortem werden die explantierten Femora röntgenologisch, mikrobiologisch und histologisch ausgewertet.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8a des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 18.08.1986 bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Materialien

3.2.1.1 Arzneistoffträger/Polymer

Als Trägermaterial dient das in Pulverform vorliegende Poly-D,L-Laktid Resomer® R203 (Firma Boehringer, Ingelheim) mit einem Molekulargewicht von 29.500 Dalton und der chemischen Strukturformel $(C_2H_4O_2)^n$. Um einem hydrolytischen Abbau und einer Zerstörung des Polymergerüsts vorzubeugen, hat die Lagerung absolut kühl und trocken zu erfolgen.

3.2.1.2 Antibiotikum

In die Beschichtung wird als Antibiotikum Gentamicin (Gentamicinsulfat, COM Pharma, Hamburg) eingearbeitet.

3.2.1.3 Lösungsmittel

Als organisches Lösungsmittel wird Ethylacetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet.

3.2.1.4 Orthopädische Implantate

Als orthopädische Implantate werden Hohlnägel aus zertifiziertem rostfreien Stahl für medizinische Zwecke verwendet (Legierungstyp CrNi 878, Fa. aap Implantate AG, Berlin). Im 90°Grad-Winkel werden Bohrungen angebracht, die das Implantat einem Verriegelungsnagel vergleichbar machen. Das Implantat besitzt einen Außendurchmesser von 2,7 mm und einen Innendurchmesser von 1,1 mm (siehe Abbildung 1). Die Länge beträgt 80 mm und wird intra operationem der Länge des Kaninchenfemurs angepasst.

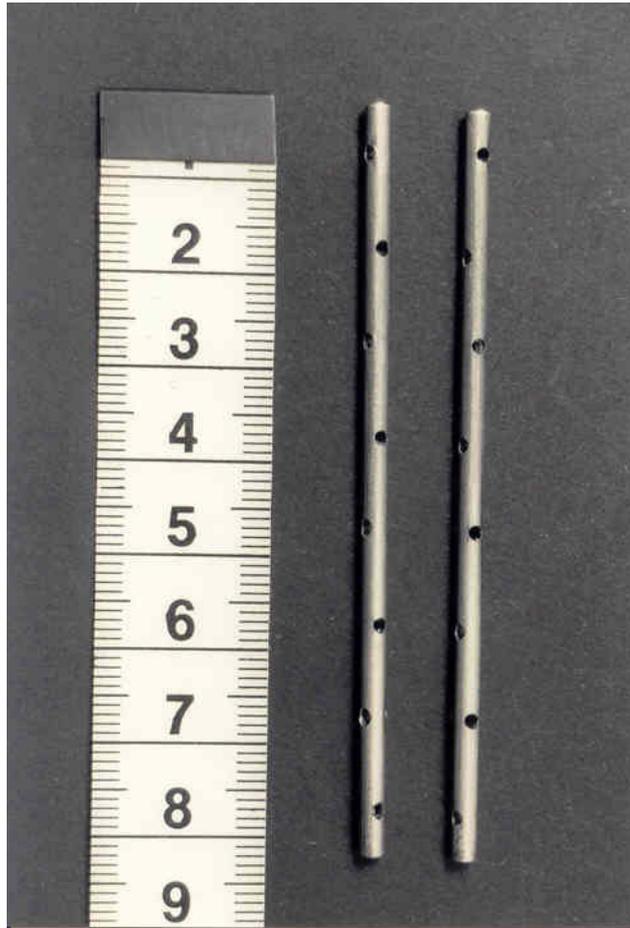


Abbildung 1: Gebodrter Hohnagel als Modell für einen Verriegelungsnagel

3.2.2 Beschichtungstechnologie

Die Beschichtung wird nach dem Kaltbeschichtungsverfahren, wie von GOLLWITZER (2002) beschrieben, durchgeführt.

Das in Pulverform vorliegende Polylaktid Resomer® R203 wird über Nacht in 12 ml Ethylacetat gelöst. Gentamicin wird in Aqua dest. gelöst und über einen Sterilfilter (0,23 µm, Fa. Peske oHG, Aindling-Pichl) in vorsterilisierte und vorverpackte Homogenisatorgefäße eingebracht. Die Gentamicinlösung wird dann unter sterilen Kautelen in einem Alkohol-Trockeneisgemisch unter leichtem Rühren an die Gefäßwand gefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Die Beschichtung der Implantate erfolgt unter „lamina-air-flow“-Bedingungen. In das Homogenisatorgefäß mit 176 mg lyophilisiertem Gentamicin wird über einen lösungsmittelresistenten Sterilfilter das vollständig aufgelöste Polymer (1600 mg) eingebracht. Das Gentamicin liegt somit in 10%-iger Konzentration vor und die Trägersubstanz ist maximal beladen. Mit einem sterilen Pistill wird gepottert bis sich eine homogene Suspen-

sion ergibt. Diese wird dann in ein steriles Reagenzglas mit Schliffstopfen überführt. Das zu beschichtende Implantat wird für mindestens fünf Sekunden in die Suspension eingelegt und anschließend mit einer Péan-Klemme als Halterung an der Luft getrocknet. Nach der Beschichtung von 30 Implantaten wird die Lösung verworfen und ein neuer Ansatz analog hergestellt. Demgemäß ergeben sich beschichtete Implantate der Reihe A und Reihe B. Die Implantate werden nach dem Trocknen einzeln in sterile Gläser mit Schraubdeckel verpackt und steril eingetütet. Die Lagerung erfolgt mit Kieselgel in Plastiktüten eingeschweißt im Kühlschrank.

3.2.3 In-vitro-Untersuchungen

3.2.3.1 Sterilprüfung der Implantate

Zur Sterilprüfung der Implantate wird stichprobenartig jeder zehnte Marknagel nach der Beschichtung einer Sterilitätsprüfung unterzogen. Dazu legt man die Implantate in Thioglycolate-Medium (BBL™ Enriched Thioglycollate Medium, 8 ml, Fa. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) und inkubiert sie bei 37°C für mindestens fünf Tage im Brutschrank. Eine Trübung der Nährlösung zeigt dabei ein Keimwachstum an. Aliquote von 100 µl werden auf Columbia-Schafblutagar (BBL™, Fa. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) ausgespatelt, 24 Stunden bebrütet und vorhandene Kolonien danach ausgezählt.

3.2.3.2 Elution von Gentamicin

Die Implantate wurden, wie oben angeführt, in zwei Ansätzen beschichtet. Zur Ermittlung der Elutionsrate von Gentamicin werden jeweils 2 x 6 Implantate (Doppelansatz) aus Reihe A sowie Reihe B untersucht. Dazu werden jeweils drei Hohnägel in ein steriles Reagenzglas gegeben und dieses mit 15 ml steriler phosphatgepufferter Saline (PBS) gefüllt. Die Reagenzgläser I und II enthalten je drei beschichtete Marknägel aus Reihe A, die Reagenzgläser III und IV je drei Implantate aus der Reihe B. Nach 15 Minuten, 1 Stunde, 6, 12, 48 und 96 Stunden werden Proben à 150 µl entnommen, tiefgefroren und im Labor der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar mittels Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (TDx®, Fa. Abbott, Wiesbaden) der Gentamicingehalt in der Probe bestimmt. Bei dieser Methode eines kompetitiven Immunoassays konkurrieren Fluorescein-markiertes Antigen und Probenantigen um die Bindungsstellen von spezifischen Antikörpermolekülen. Das markierte

Antigen wird mit monochromatischem, polarisiertem Licht angeregt. Anhand der für jede Probe aus dem Assay ermittelten Polarisationswerte werden die Wirkstoffkonzentrationen in der Patientenprobe mit einer gespeicherten Kalibrierungskurve berechnet und die Ergebnisse als Konzentrationswerte ausgedrückt. Die Nachweisgrenze für Gentamicin liegt bei $<0,5$ mg/l.

3.2.3.3 Kapillarversuch

Der Kapillarversuch dient dazu, das Infektionsmodell mit *Staphylococcus aureus* und die bakteriziden Eigenschaften der Beschichtung in vitro zu überprüfen. Es werden je drei Implantate (beschichtet bzw. unbeschichtet) untersucht. Je ein Implantat wird in eine sterile Glaskapillare (Länge 10 cm, Durchmesser aussen 0,7 mm, innen 0,3 mm), die den Kaninchenfemur modellhaft darstellen soll, gegeben. Die Glaskapillare wird mit der Keimsuspension (10^5 KBE/150 μ l *Staphylococcus aureus*, Stamm ATCC 49230) infiziert und Müller-Hinton-Bouillon als Nährsubstrat dazugegeben. Die Kapillare wird in einem sterilen Glasröhrchen 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Aliquote von 100 μ l werden auf Columbia-Schafblutagar (BBL™, Fa. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) ausgespatelt und bei 37°C 24 bis 48 Stunden im Brutschrank gelagert. Danach werden vorhandene Kolonien ausgezählt.

3.2.4 Versuchstiere

Die tierexperimentelle Studie wird mit 33 weiblichen Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von 2,9 kg (2,2 bis 4,8 kg) der Rasse Weiße Neuseeländer durchgeführt. Sie werden von einer zugelassenen Versuchstierzucht (Charles River, Sulzfeld) bezogen. Die Unterbringung der Tiere erfolgt in Einzelkäfigen aus Kunststoff in einem fensterlosen klimatisierten Raum (Raumtemperatur 20 bis 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 50 bis 60 %). Den Kaninchen steht ein spezielles Alleinfutter (Altromin Standard Diät, Altromin GmbH; Lage) sowie Wasser ad libitum zur Verfügung. Regelmäßig erhalten sie zudem hartes Brot, Karotten und Heu. Mit Hilfe eines automatischen Lichtprogramms wird der natürliche Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Dabei herrscht von 6.00 bis 18.00 Uhr eine Lichtintensität von max. 100 Lux, danach folgen 12 Stunden Dunkelheit. Die Auswahl der Tiere für die nachfolgenden

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Versuchsgruppen erfolgt randomisiert und unterliegt keinen bestimmten Kriterien (siehe Tabellen 7 und 8).

3.2.5 Versuchsplan

| Implantat ohne Beschichtung | Implantat mit Poly-D,L-Laktid-Gentamicin Beschichtung | Untersuchungsparameter | Untersuchungszeitraum |
|--|--|---|------------------------------|
| 6 Kaninchen (Tier Nr. 43, 44, 46, 52, 62, 90) | 6 Kaninchen (Tier Nr. 41, 45, 47, 51, 65, 89) | Klinik, Gentamicinspiegel im Serum, Blutbild, Röntgen, Histologie | 6 Wochen |

Tabelle 7: Versuchsplan zur Biokompatibilität der Beschichtung – Gruppe 1

| Implantat ohne Beschichtung | Implantat mit Poly-D,L-Laktid-Gentamicin Beschichtung | Infektion | Untersuchungsparameter | Untersuchungszeitraum |
|--|--|---------------------------------------|--|------------------------------|
| 10 Kaninchen (Tier Nr. 42, 53, 49, 88, 39, 57, 64, 302, 152, 149) | 10 Kaninchen (Tier Nr. 38, 40, 48, 50, 55, 63, 91, 150, 146, 151) | Staph. aureus, 10 ⁵ KBE | Klinik, Gentamicinspiegel im Serum, Blutbild, Blutkultur, Röntgen, Mikrobiologie, Histologie | 8 Wochen |

Tabelle 8: Versuchsplan zum Osteomyelitismodell – Gruppe 2

3.2.5.1 Induktion einer experimentellen Knocheninfektion

Für die Induktion einer Osteomyelitis wird ein human-pathogener Stamm der gram-positiven Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (Subspezies *aureus* Rosenbach, American Type Culture Collection (ATCC) 49230, Charité Berlin) verwendet. Dieser Stamm wurde von einem Patienten mit chronischer Osteomyelitis isoliert. Vom Institut für Infektionshygiene der TU München werden für den Tag der Operation standardisierte Suspensionen frisch hergestellt. Die Ausgangsbakterienkonzentration entspricht Mac Farland 0,5 (entsprechend $1,5 \times 10^8$ KBE/ml und einer optischen Dichte von 0,125 bei 550 nm). Von dieser Suspension wird mit 0,9%-iger steriler Kochsalzlösung eine 1:100 Verdünnung hergestellt (10^6 KBE/ml). Die gewünschte Bakteriensuspension enthält 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* in 150 μ l. Stichprobenartig erhalten sechs Tiere diese Keimmenge in einem Volumen von 50 μ l bzw. 100 μ l (siehe Tabelle 9).

| Kaninchen-Nr. | Keimdosis* |
|---|------------------------|
| 38, 39, 40, 42, 48, 49, 50, 53, 55, 57, 63, 64, 88, 91 | 10^5 KBE/150 μ l |
| 146, 302 | 10^5 KBE/50 μ l |
| 149, 150, 151, 152 | 10^5 KBE/100 μ l |

Tabelle 9: Infektionsdosis in der Osteomyelitisgruppe

*: Aufgrund der Problematik, eine klinisch manifeste Knocheninfektion zu erzeugen bzw. den Keimnachweis nach acht Wochen zu führen, wird bei sechs Tieren die Konzentration der eingebrachten Keime erhöht.

3.2.5.2 Operationsvorbereitung und Anästhesie

Die Tiere werden vor der Operation gewogen, klinisch untersucht und ein Blutbild angefertigt. Bei den zu infizierenden Kaninchen wird zusätzlich eine Blutkultur (BacT/Alert®PF Pädiatrie Blutkulturflaschen, Fa. Biomerieux, Nürtingen) angelegt

Die Anästhesie der Tiere erfolgt mit Medetomidin (Domitor®, Fa. Pfizer, Karlsruhe, 0,25 mg/kg) und Ketamin (Ketanest-S®, Fa. Parke-Davis GmbH, Berlin, 17 mg/kg) in einer Mischspritze i.m. verabreicht. Zusätzlich werden zur intra- und postoperativen Analgesie

Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer, Karlsruhe, 4 mg/kg i.m.) und Metamizol (Novaminsulfon®, Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland, 30 mg/kg i.v.) verabreicht. Auf die Kornea beider Augen wird Bepanthen® Augensalbe (Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen) aufgetragen. Die Tiere werden endotracheal intubiert (2,5er Magill-Tubus, Fa. Rüschi, Böblingen). Die Narkose wird je nach Bedarf mit einer Verdünnung von 70 mg Ketanest-S® und 1 mg Medetomidin auf 10 ml NaCl intravenös unter Spontanatmung aufrechterhalten. Im Bereich des rechten Oberschenkels und Beckens schert man das Fell aus und reinigt und desinfiziert die Haut (Cutasept®, Fa. Bade Chemie, Hamburg, Deutschland).

3.2.5.3 Operatives Vorgehen

3.2.5.3.1 Biokompatibilitätsgruppe

Narkose und Operationsvorbereitung werden wie unter 3.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Zunächst wird nach einem Haut- und Faszienschnitt der Trochanter major des rechten Femurs dargestellt. Durch diesen wird mit einem 3,2 mm-Bohrer die Markhöhle bis in den Bereich der distalen Diaphyse aufgebohrt und der Hohl Nagel unter Durchleuchtungskontrolle eingebracht. Der Trochanter major wird mit Knochenwachs (Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Anschließend erfolgt der Verschluss von Faszie und Muskulatur mit 3/0 Vicryl® (Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt). Die Haut wird mit 3/0 Prolene® (Fa. Ethicon) genäht und ein Sprühverband (Opsite®, Hull; England) aufgebracht. Der korrekte Sitz des Implantats wird röntgenologisch kontrolliert und dokumentiert (siehe Abbildung 2). Nach der Operation wird das Medetomidin mit Atipamezol (Antisedan®, Fa. Pfizer, 0,25 mg/kg i.m.) antagonisiert.

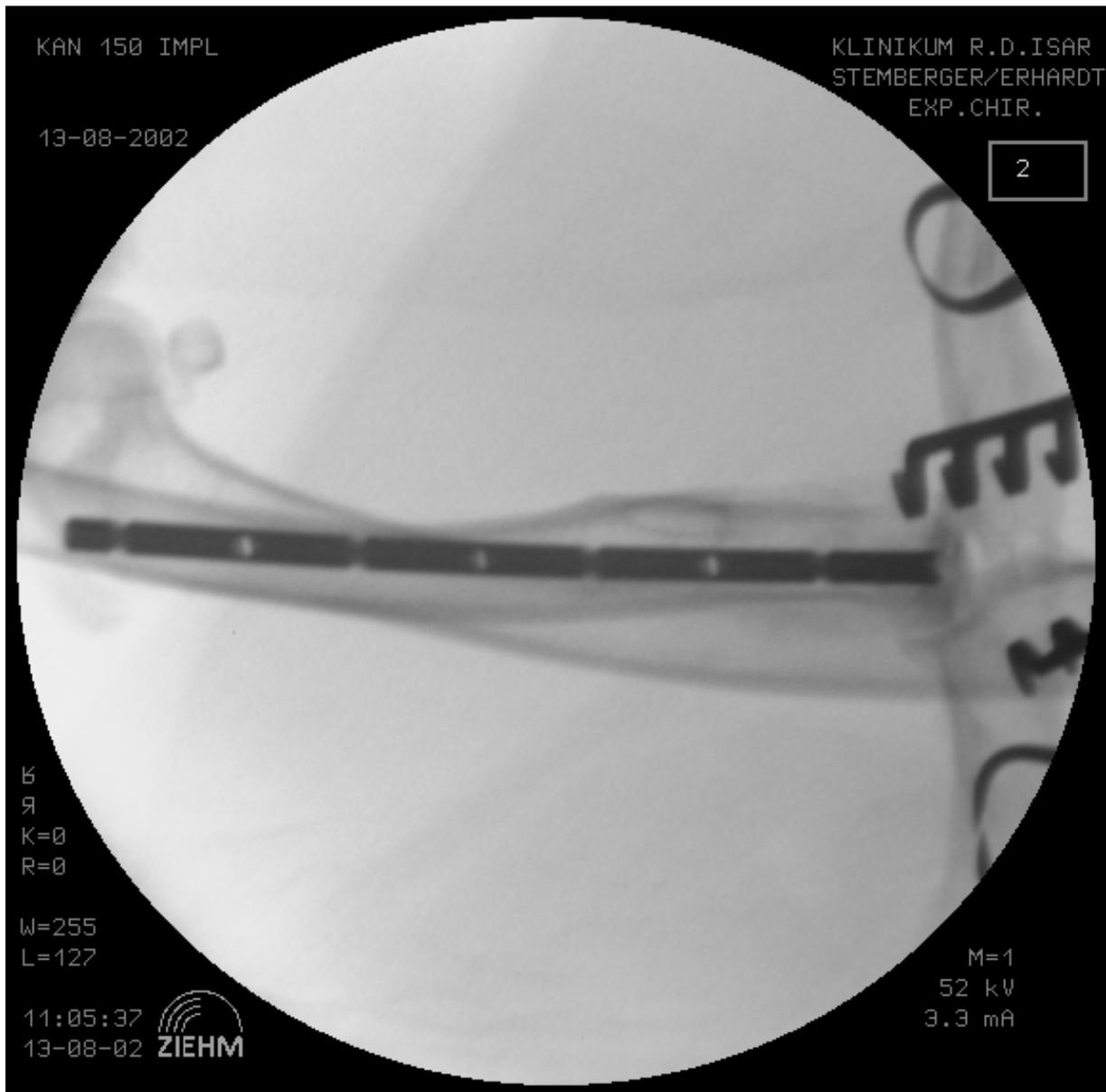


Abbildung 2: Darstellung des implantierten Hohl Nagels unter Röntgendurchleuchtung (Philipp BV 25, Fa. Philipps, München)

3.2.5.3.2 Osteomyelitisgruppe

Narkose, Zugang und Implantation des Marknagels erfolgen analog zur Biokompatibilitätsgruppe. Eine Kanüle (20 G, 0,9 mm x 20 mm) mit aufgesetzter 2 ml-Spritze wird durch das Implantat in den Femur eingeführt und ca. 1 ml Knochenmark abgesaugt. Anschließend wird mit einer neuen Kanüle (20 G) die Bakteriensuspension (siehe Tabelle 9) intramedullär eingebracht und das Bohrloch sofort mit Knochenwachs verschlossen. Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter 3.2.5.3.1 beschrieben.

3.2.5.4 Postoperatives Monitoring

Als postoperative Schmerztherapie erhalten die Tiere routinemäßig Buprenorphin (Temgesic®, Fa. Essex Pharma, München, 0,03 mg/kg s.c.) und Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg s.c.) über insgesamt vier Tage. Die Tiere werden täglich hinsichtlich ihres Allgemeinzustands, erhöhter Körpertemperatur und lokaler Entzündungsanzeichen (vermehrte Wärme, Schwellung und Schmerzhaftigkeit, Lahmheit) untersucht. Futter- und Wasserverbrauch werden täglich registriert, das Körpergewicht wird jeden dritten Tag kontrolliert. Die Bestimmung des Gentamicinspiegels im Serum erfolgt nach 12, 24 und 48 Stunden sowie anschließend in wöchentlichen Abständen. EDTA-Blut (S-Monovette, 2,7 ml KE, Fa. Sarstedt, Nürnberg) wird vor der Operation und in der ersten, zweiten, vierten und sechsten Woche bzw. am Versuchsende entnommen und die Leukozyten- und Erythrozytenwerte sowie der Hämatokrit (Hkt) und der Hämoglobinwert (Hb) überprüft.

Bei den Tieren der Osteomyelitisgruppe wird vor der Operation, in der dritten Woche und unmittelbar vor Versuchsende Blut für eine Blutkultur entnommen. Das Blutbild wird zusätzlich in der fünften und siebten Woche post OP kontrolliert.

Als Referenzbereiche für die untersuchten Blutwerte gelten beim Kaninchen folgende Werte (Tiermedizinisches Labor, Ingolstadt): Leukozyten 4000 bis 13000/l, Erythrozyten 4,0 bis 7,0 Mio/l; Hämatokrit 30 bis 41%, Hämoglobin 9,8 bis 13,6 g/dl.

3.2.5.5 Euthanasie und Sektion

Die Euthanasie der Tiere in der Biokompatibilitätsgruppe erfolgt nach sechs Wochen, die Tiere der Osteomyelitisgruppe werden nach acht Wochen euthanasiert. Die Euthanasie der Tiere erfolgt durch eine i.v. Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos, 50 mg/kg i.v.).

3.2.5.5.1 Biokompatibilitätsgruppe

Beide Femora werden entnommen, Muskulatur und Knochen auf pathologisch-anatomische Veränderungen hin untersucht und das Weichgewebe entfernt. Es wird eine Röntgenaufnahme angefertigt (Torr Radioflour, Torr Phillips Electronic Instruments, München). Anschließend werden die Femora mit einer Handsäge in der Mitte geteilt wobei das Implantat im rechten Femur belassen wird. Die Gewebe werden für die histologische Untersuchung aufgearbeitet.

3.2.5.5.2 Osteomyelitisgruppe

Beide Femora werden unter sterilen Kautelen entnommen und auf pathologische Veränderungen an Muskulatur und Knochen untersucht. Von Abszessen werden Abstriche (Oxoid Transport Swabs®, Fa. Copan, Brescia, Italien) entnommen. Anschließend wird das Weichgewebe entfernt und die Femora steril verpackt. Eine Röntgenaufnahme wird angefertigt (Torr Radioflour, Torr Phillips Electronic Instruments, München) und die Femora mikrobiologisch und histologisch aufgearbeitet.

3.2.5.6 Röntgenologische Untersuchung

Bei der Auswertung der Röntgenaufnahmen der explantierten Femora wird auf folgende Parameter geachtet:

- proliferative periostale Reaktionen
- Osteolysen im Bereich der Spongiosa und Kompakta
- Sequesterbildung
- Sklerosebildung im Bereich osteolytischer Herde

3.2.5.7 Mikrobiologische Verlaufskontrolle

Die Aufarbeitung der Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgt unter aseptischen Bedingungen an einem „laminar-air-flow“-Arbeitsplatz.

Zunächst wird der rechte Femur mit einer sterilen Handsäge in der Mitte geteilt, wobei das Implantat wiederum im Knochen verbleibt. Die trochanternahe Hälfte wird für die histologische Aufarbeitung in 10%-iges Formalin eingelegt. Aus der anderen Hälfte wird das verbleibende Implantat entfernt und in Thioglycolate-Medium (BBL™ Enriched Thioglycolate Medium, 8 ml, Fa. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) eingelegt. Der verbleibende Knochen wird bis auf den Kondylus mit einer sterilen Luer-Zange so gut als möglich zerkleinert und in einem sterilen Mörser mit insgesamt 5 ml steriler NaCl homogenisiert. Mit sterilen Instrumenten wird dann der linke Femur als unbehandelte Kontrolle aufgearbeitet.

Von den jeweiligen Homogenisaten werden 100 µl auf Columbia-Schafblutagar (BBL™ Fa. Becton Dickinson and Company) ausgespatelt. Mit weiteren 100 µl Homogenisat wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Verdünnungsstufen 1:10.000 und 1:100.000 auf

Columbia-Schafblutagar ausgespatelt. Von der Thioglykolatlösung werden ebenfalls 100 µl auf Columbia-Schafblutagar ausgestrichen. Alle Platten werden bei 37°C inkubiert und nach 24 und 48 Stunden auf vorhandene Kolonien ausgezählt.

Die Blutkulturen werden in einem vollautomatischen Blutkulturbestimmungssystem (BacTAlert, Fa. Organon Teknica, Durham, England) bei 37°C sieben Tage bebrütet. Nach positivem Signal streicht man eine Öse auf Columbia Schafblutagar aus und bebrütet sie über 24 Stunden. Parallel dazu wird ein Grampräparat angefertigt. Weitere Differenzierungsmethoden erfolgen entsprechend dem Keimnachweis.

3.2.5.8 Histologische Verlaufskontrolle

Die Femora werden mindestens zwei Tage in 10%-iger Formalinlösung fixiert und anschließend über 14 Tage mit Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) entkalkt. Der Knochen wird längsgeteilt und das Implantat schonend entfernt. Anschließend bettet man das Knochengewebe in Paraffin ein und stellt 6 µm dicke Längsschnitte her. Die Schnitte werden mit Hämatoxyllin Eosin (H.E.), Giemsa und Elastica van Gieson gefärbt.

Lichtmikroskopisch werden die Proben der Biokompatibilitätsgruppe auf das Vorhandensein von Leukozytenansammlungen, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Nekrosen, Sequestern, Fibrinausschwitzungen, Rundzellinfiltraten und Granulationsgewebe untersucht. Zur histologischen Beurteilung der Proben der Osteomyelitisgruppe dient eine nach ADLER (1983) modifizierte Einteilung in die Stadien einer akuten oder chronischen Osteomyelitis. Die Proben der Osteomyelitisgruppe werden auf Merkmale einer akuten bzw. chronischen Osteomyelitis untersucht und dem jeweiligen histologischen Stadium zugeordnet. Die akute Osteomyelitis ist histologisch gekennzeichnet von einem entzündlichen Knochenmarksödem und Fibrinexsudationen, massiven Ansammlungen von Entzündungszellen (v.a. Leukozyten), Markabszessen, zellreichem Granulationsgewebe, Knochensequestern, Osteolysen, gelegentlich sind auch Bakterienherde nachweisbar. Eine chronische Osteomyelitis wird durch eine fortschreitende Fibrosierung des Markraums, gefäß- und faserreiches Granulationsgewebe, fortschreitende Osteosklerose sowie Ansammlungen von Rundzelleninfiltraten (Plasmazellen, Lymphozyten) gekennzeichnet.

3.2.5.9 Statistische Auswertung und Dokumentation

Die Daten der mikrobiologischen Untersuchung werden einer statistischen Prüfung unterzogen. Dazu werden die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung (Keimnachweis: ja oder nein) in einer Vierfeldertafel angeordnet und die Überzufallswahrscheinlichkeit berechnet. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wird der exakte Test nach Fisher herangezogen. Die übliche Signifikanzgrenze liegt bei $p < 0,05$.

Eine statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse kann aufgrund der zu kleinen Fallzahlen und der Anzahl der möglichen Variablen nicht erfolgen (Gespräch mit Prof. Osterkorn, Institut für Tierzucht, Tiermedizinische Fakultät München).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen

Die Beschichtung der Hohnägel wird wie im Methodenteil beschrieben mit guter Reproduzierbarkeit durchgeführt.

3.3.1.1 Sterilprüfung

Nach Bebrütung der beschichteten Implantate in Thioglycollate-Medium über mindestens fünf Tage bei 37°C sind bei keinem der Hohnägel Keime nachweisbar. Eine sterile Vorgehensweise bei der Herstellung ist somit belegt.

3.3.1.2 Elution von Gentamicin

Um die Freisetzung von Gentamicin und die Homogenität der Beschichtung zu überprüfen, wird ein Elutionsversuch durchgeführt. Wie unter 3.2.3.2 angegeben, werden dazu im Doppelansatz drei Implantate aus Reihe A (I und II) und B (III und IV) in 15 ml steriler Kochsalzlösung im Reagenzglas (I bis IV) über einen Zeitraum von 96 Stunden eluiert. Nach 15 min, 1, 6, 12, 48, 72, und 96 Stunden werden Proben à 150 µl entnommen und der Gentamicingehalt in µg/ml bestimmt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

| Zeitpunkt der Probenentnahme | Reihe A | | Reihe B | |
|------------------------------|------------|-------------|--------------|-------------|
| | I µg/ml | II µg/ml | III µg/ml | IV µg/ml |
| 0 min | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 min | 12,6 | 10,4 | 15,6 | 29,9 |
| 1 h | 21,7 | 12,4 | 17,0 | 27,9 |
| 6 h | 28,6 | 31,6 | 35,2 | 48,7 |
| 12 h | 30,5 | 30,8 | 39,3 | 48,3 |
| 24 h | 21,7 | 34,4 | 43,3 | 54,3 |
| 48 h | 32,6 | 31,5 | 44,7 | 51,8 |
| 72 h | 31,1 | 35,3 | 45,5 | 54,8 |
| 96 h | 33,54 | 33,5 | 45,4 | 56,4 |

Tabelle 10: Freisetzung von Gentamicin (µg/ml) im Versuchszeitraum von 96 Stunden (Reihe A bzw. B = Beschichtungsansatz; I, II, III, IV = Elution mit drei Implantaten)

Aus den in Tabelle 10 angeführten Werten wird zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten die Menge an verfügbarem Gentamicin in µg pro Versuchsansatz mit drei Marknägeln wie folgt berechnet und in Tabelle 11 angeführt:

$$I + II / 2 \times 15\text{ml} = \mu\text{g verfügbares Gentamicin (drei Marknägeln)}$$

$$III + IV / 2 \times 15\text{ml} = \mu\text{g verfügbares Gentamicin (drei Marknägeln)}$$

Tabelle 11 zeigt die eluierten Mengen Gentamicin zu den ausgewählten Entnahmezeitpunkten in beiden Versuchsansätzen:

| Zeitpunkt der Probenentnahme | µg verfügbares Gentamicin in Reihe A | µg verfügbares Gentamicin in Reihe B |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 Std. | 0 | 0 |
| 0,25 Std. | 172,5 | 341,2 |
| 1 Std. | 255,7 | 336,7 |
| 6 Std. | 451,5 | 609,0 |
| 12 Std. | 459,7 | 657,0 |
| 24 Std. | 420,7 | 732,0 |
| 48 Std. | 480,7 | 723,7 |
| 72 Std. | 498,0 | 752,2 |
| 96 Std. | 502,5 | 763,5 |

Tabelle 11: Gentamicin Elution in µg pro Versuchsansatz mit drei Marknägeln

Daten des Elutionsversuches zeigen, dass in 96 Stunden in Reihe A 502,5 µg und in Reihe B 763,6 µg Gentamicin freigesetzt werden. Die Implantate der Reihe B enthalten in der Beschichtung mehr Gentamicin und werden somit für die Tierversuche eingesetzt.

Auf einen Hohnagel der Reihe B konnte damit eine Menge von 254,5 µg Gentamicin aufgebracht werden.

Abbildung 3 zeigt die anfangs verzögerte Freisetzung von Gentamicin in Reihe B. Nach einem anfänglichen Peak im Verlauf von 24 Stunden bleibt der Gentamicinspiegel über weitere 96 Stunden konstant.

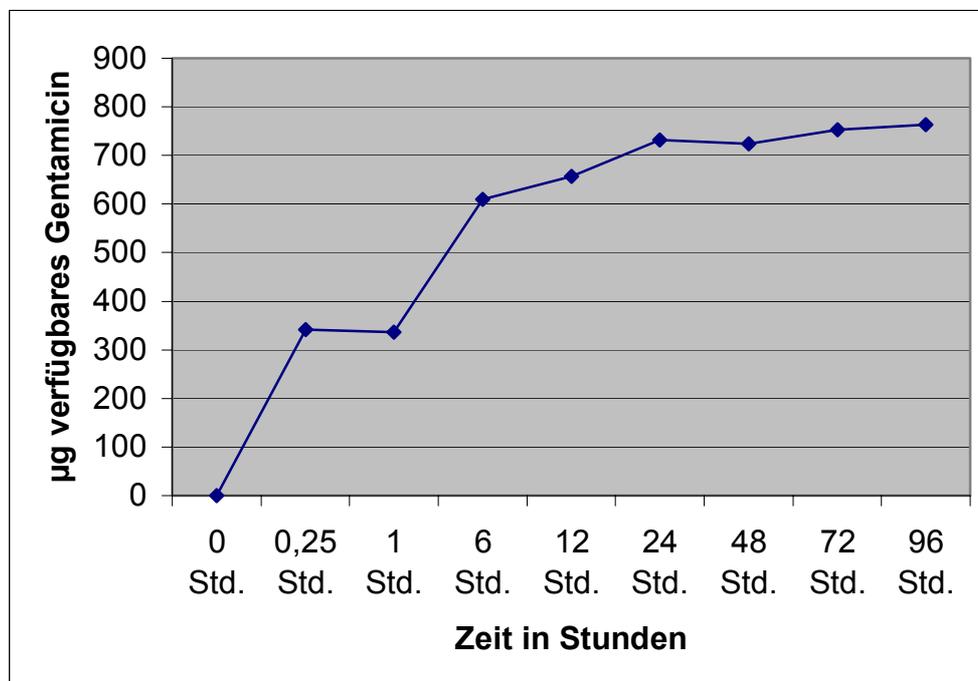


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Freisetzung von Gentamicin in Reihe B für den Versuchsansatz mit drei Marknägeln

3.3.1.3 Kapillarversuch

Der Kapillarversuch dient dazu, das Infektionsmodell und die bakteriziden Eigenschaften der Beschichtung in vitro zu überprüfen. Nach Bebrütung über 48 Stunden bei 37°C werden bei den unbeschichteten Implantaten durchschnittlich 4×10^8 KBE Staphylococcus aureus ausgezählt. Die Inkubationslösung der gentamicinbeschichteten Implantate ist steril.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.2 Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen

3.3.2.1 Postoperative Versuchsphase

Die Versuche werden mit 33 Kaninchen durchgeführt. Ein Tier wird aufgrund einer Spiralfaktur des Femurs, die durch das Aufbohren des Knochens entstand, noch in der Narkose euthanasiert und nicht in die Studie mitaufgenommen.

Die Auswahl der Tiere für die verschiedenen Versuchsgruppen (siehe Tabelle 12 und 13) erfolgt randomisiert.

| Versuchstiere mit unbeschichtetem Implantat | Versuchstiere mit Implantat mit Poly-D,L-Laktid-Gentamicin-Beschichtung |
|--|--|
| Kaninchen Nr. | Kaninchen Nr. |
| 43,44,46,52,62*,90 | 41,45,47,51,65,89 |

*: vorzeitige Euthanasie wegen Fraktur

Tabelle 12: Übersicht zur Biokompatibilitätsgruppe – Kaninchen-Nr.

| Versuchstiere mit unbeschichtetem Implantat + Infektion der Markhöhle | Versuchstiere mit Implantat mit Poly-D,L-Laktid-Gentamicin-Beschichtung + Infektion der Markhöhle |
|--|--|
| Kaninchen Nr. | Kaninchen Nr. |
| 42*,53°,49,88*,39,57,64,302,152,149 | 38,40,48,50,55,63,91,150*,146,151 |

*: vorzeitige Euthanasie wegen Fraktur

°: vorzeitige Euthanasie wegen Sepsis

Tabelle 13: Übersicht zur Osteomyelitisgruppe – Kaninchen-Nr.

| Kaninchen-Nr. | Keimdosis* |
|---|------------------------|
| 38, 39, 40, 42, 48, 49, 50, 53, 55, 57, 63, 64, 88, 91 | 10^5 KBE/150 μ l |
| 146, 302 | 10^5 KBE/50 μ l |
| 149, 150, 151, 152 | 10^5 KBE/100 μ l |

Tabelle 14: Infektionsdosis in der Osteomyelitisgruppe

*: Aufgrund der Problematik, eine klinisch manifeste Knocheninfektion zu erzeugen bzw. den Keimnachweis nach acht Wochen zu führen, wurde bei sechs Tieren die Konzentration der eingebrachten Keime erhöht.

3.3.2.2 Biokompatibilitätsgruppe – Implantat ohne Beschichtung

Zu dieser Gruppe zählen sechs Tiere, die ein unbeschichtetes Implantat erhielten. Ein Tier (Kaninchen 62) muss wegen einer Femurfraktur fünf Tage nach der Operation euthanasiert werden. Vier Kaninchen zeigen während des Untersuchungszeitraumes keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Futter- und Wasseraufnahme sind normal. Die Tiere haben kein Fieber. Lokale Schwellung und vermehrte Wärme am operierten Femur bilden sich bei allen Tieren innerhalb von fünf bis 14 Tagen post OP vollkommen zurück.

Bei einem Tier (Kaninchen 52) kommt es nach einer Nahtdehiszenz zu einer Wundheilungsstörung. Das Tier wird über acht Tage mit Trimethoprim-Sulfonamid (Borgal® 2,5%, Fa. Intervet, Unterschleißheim, 1 ml/kg s.c.) versorgt. Als Schmerztherapie erhält es zusätzlich Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg s.c.). Die Wunde wird mit Nebacetin®-Salbe (Fa. Yamanoichi Pharma GmbH, Heidelberg) bis zum sekundären Wundverschluss versorgt. Das Tier zeigt jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum eine reduzierte Futteraufnahme und Gewichtszunahme. Bei der Sektion erscheint der rechte Femur rötlich verfärbt und der Knochen insgesamt gegenüber dem linken Femur verdickt. Das Knochenmark ist gelblich verfärbt und von zäher Konsistenz.

Bei den Tieren dieser Gruppe liegen die untersuchten Blutwerte über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg im Referenzbereich.

Im Serum ist kein Gentamicin nachweisbar.

Bei der Sektion erscheint die Muskulatur und der Knochen unauffällig.

3.3.2.3 Biokompatibilitätsgruppe – Implantat mit Beschichtung

Zu dieser Gruppe gehören sechs Kaninchen, die ein gentamicinbeschichtetes Implantat erhielten. Bei einem Tier (Kaninchen 65) wird intraoperativ die Kortikalis des Femurs aufgebrochen. Dieses Tier wird über zehn Tage mit Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg s.c.) versorgt und ist bereits nach wenigen Tagen beschwerdefrei. Bei den übrigen Tieren ist der Heilungsverlauf unauffällig. Bei drei Kaninchen (Nr. 41, 51 und 65) müssen die Nähte zusätzlich geklammert werden und verheilen dann komplikationslos. Alle Kaninchen zeigen über den Untersuchungszeitraum ein gutes Allgemeinbefinden. Futter- und Wasseraufnahme sind normal. Bei zwei Tieren mit sekundärer Wundheilung (Kaninchen 51 und 65) kommt es am ersten Tag post OP zum Anstieg der Körpertemperatur.

Ein Tier mit einer bereits vor der Operation erhöhten Leukozytenzahl (Kaninchen 47) zeigt auch noch in den ersten beiden Wochen des Untersuchungszeitraumes über dem Normbereich liegende Werte. Das Tier ist ansonsten klinisch unauffällig. Bei allen übrigen Tieren liegen die Blutwerte im Normbereich.

Ein systemischer Gentamicinspiegel ist nicht nachweisbar. Alle Werte befinden sich unterhalb der methodenspezifischen Nachweisgrenze.

Muskulatur und Knochen weisen bei der Sektion keine pathologischen Veränderungen auf.

Die Abbildungen 4 bis 7 stellen die untersuchten Parameter des kleinen Blutbildes grafisch dar. Signifikante Unterschiede sind nicht feststellbar.

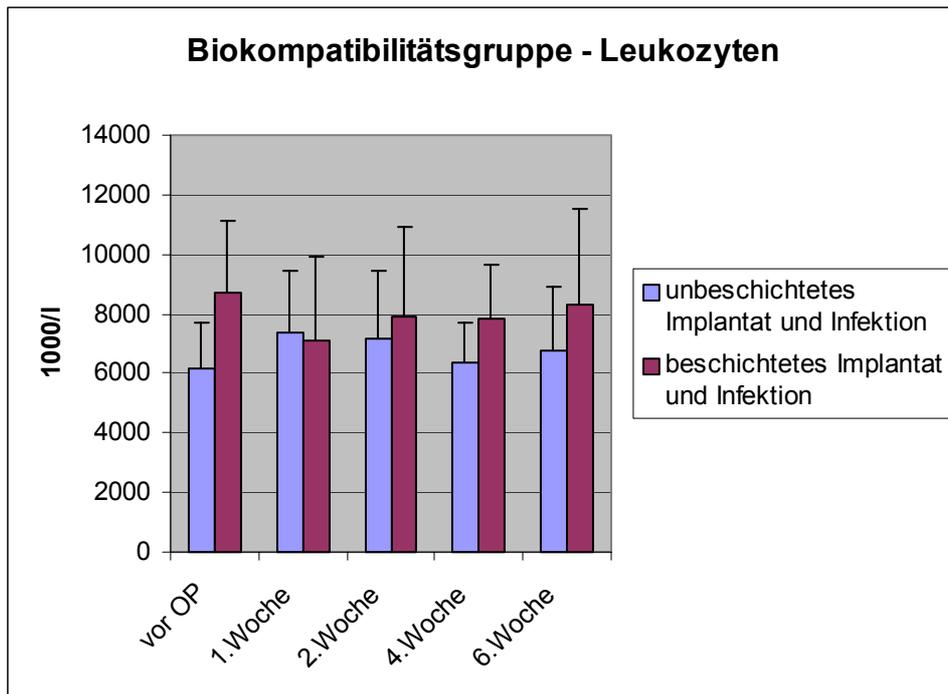


Abbildung 4: Leukozytenwerte der Biokompatibilitätsgruppe

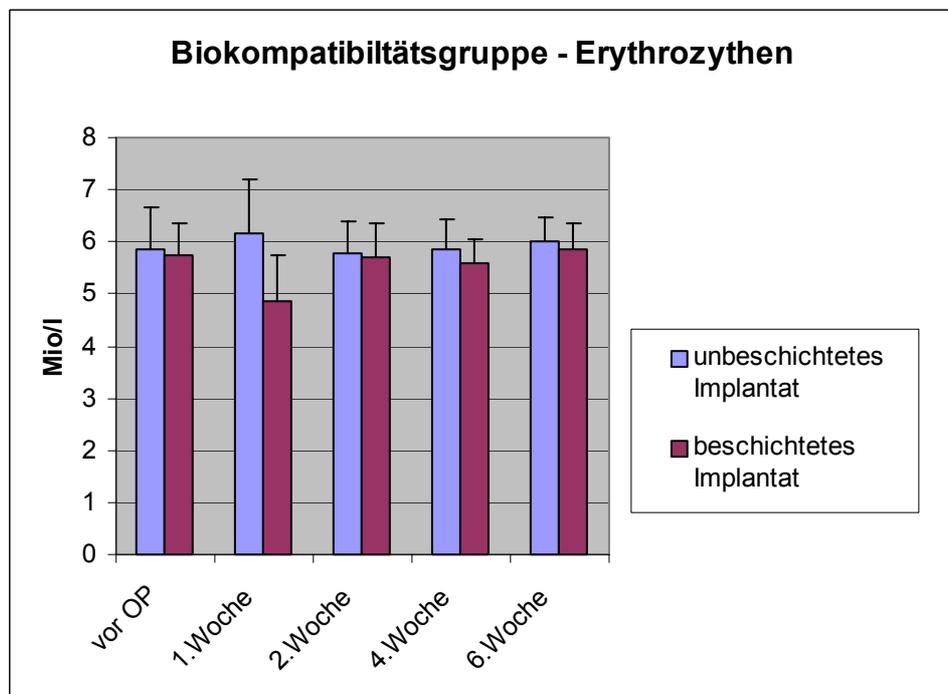


Abbildung 5: Erythrozytenwerte der Biokompatibilitätsgruppe

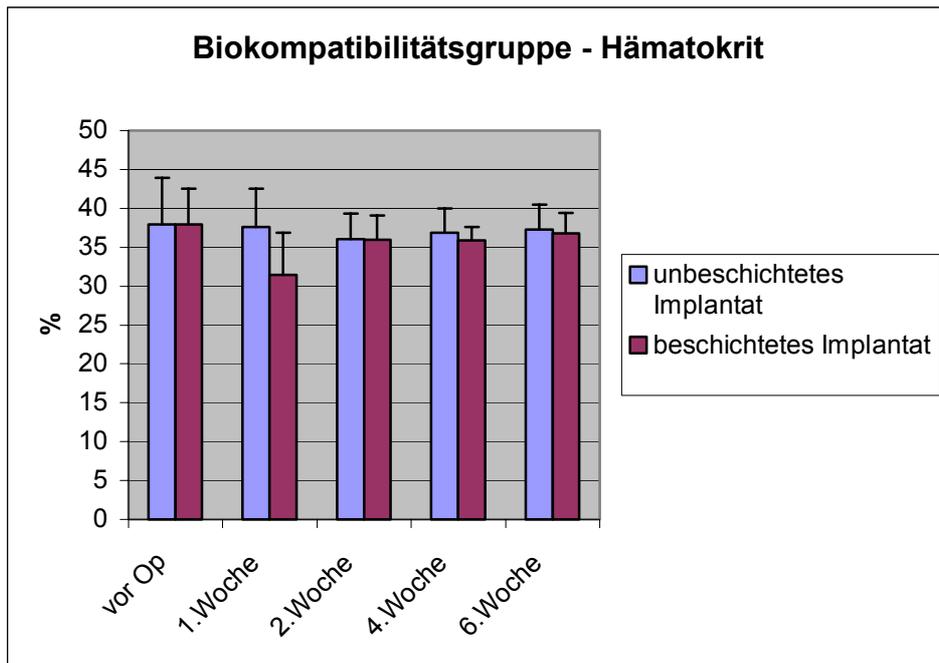


Abbildung 6: Hämatokritwerte der Biokompatibilitätsgruppe

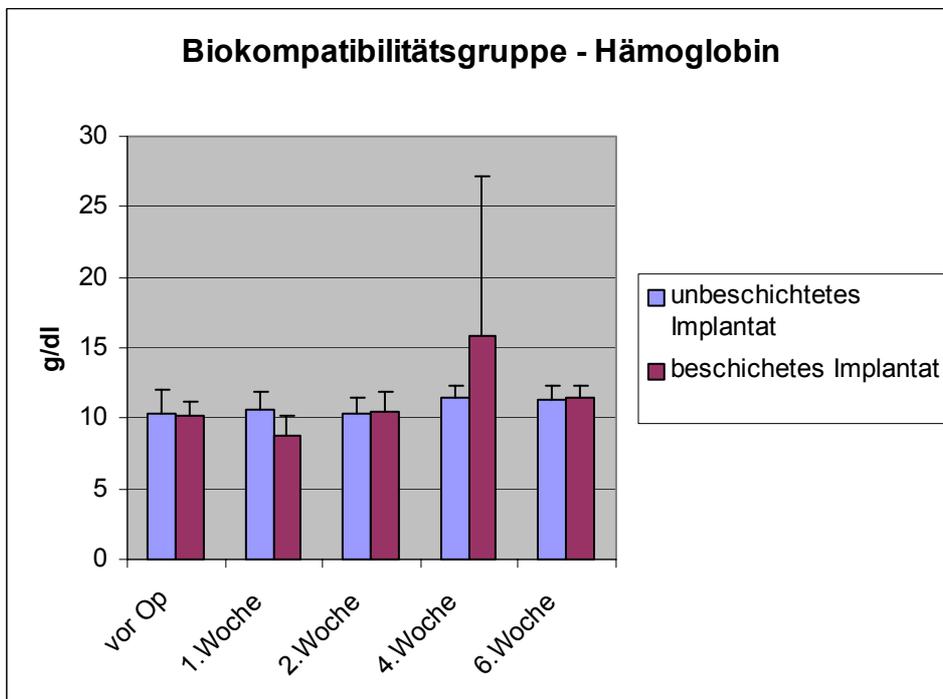


Abbildung 7: Hämoglobinwerte der Biokompatibilitätsgruppe

3.3.2.4 Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat

Zu dieser Gruppe zählen insgesamt zehn Tiere, die mit einem unbeschichteten Implantat intramedullär versorgt und mit der Bakteriensuspension infiziert wurden. Wie oben erwähnt (siehe Tabelle 14), werden sieben Tiere mit 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* in 150 μ l infiziert. Kaninchen 302 erhält die Keimdosis in einem Volumen von 50 μ l, Kaninchen 149 und 152 in einem Volumen von 100 μ l.

Mit Ausnahme von Kaninchen 302 und 149 zeigen die übrigen Tiere nach der Operation ein geringgradig gestörtes Allgemeinbefinden mit Fieber während der ersten vier Tage post OP und Apathie. 14 Tage später sind bei allen Tieren vermehrte Wärme und Schwellung kaum mehr feststellbar.

Alle Tiere mit Ausnahme von Kaninchen 302 und 149 entwickeln Abszesse am operierten Bein im Bereich des Trochanter major. Diese bilden sich im Verlauf des Untersuchungszeitraumes zurück.

Kaninchen 57 zeigt zudem über den gesamten Beobachtungszeitraum einen Druckschmerz im Bereich des Trochanter major.

Das Allgemeinbefinden der Tiere ist im weiteren Verlauf von acht Wochen ungestört. Futter- und Wasseraufnahme sind normal. Keines der Tiere zeigt Lahmheit.

Kaninchen 53 wird aufgrund eines zunehmend gestörten Allgemeinbefindens mit stark reduzierter Futteraufnahme nach sechs Wochen euthanasiert. Am Trochanter major bildet sich hier ein etwa 5 x 5 cm großer Abszess. Die Blutkultur erbringt bei der Euthanasie des Tieres den Nachweis von *Staphylococcus aureus*.

Kaninchen 42 und 88 werden zehn Tage post OP aufgrund einer Fraktur des rechten Femurs euthanasiert. Am Trochanter major sowie an der Frakturstelle befinden sich bei beiden Tieren mehrere Abszesse.

Erhöhte Leukozytenwerte finden sich nur bei 4 Tieren. Kaninchen 49 und 39 zeigen in der ersten bzw. zweiten Woche erhöhte Werte, Kaninchen 64 in der siebten Woche. Bei Kaninchen 42 ist der Wert innerhalb des Untersuchungszeitraumes ebenfalls erhöht. Die Abbildungen 8 bis 11 stellen die Blutwerte grafisch dar. Ein Anstieg der Leukozytenwerte über den Referenzbereich ist nur in der zweiten Woche festzustellen. Signifikante Unterschiede sind nicht feststellbar.

Mit Ausnahme von Kaninchen 53 sind die Blutkulturen bei allen Tieren negativ.

Im Serum der Tiere dieser Gruppe wird kein Gentamicin nachgewiesen.

Bei der Sektion werden bei allen Tieren mit Ausnahme von Kaninchen 149 und 302 Abszesse in der Muskulatur um den Trochanter major festgestellt. Bei Kaninchen 64, 88 und 42 haben diese Verbindung zum Knochen.

Das Knochenmark des rechten Femurs erscheint bei allen Tieren makroskopisch stark verändert, gelblich verfärbt und ist von zäher Konsistenz.

3.3.2.5 Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat

In diese Gruppe gehören zehn Tiere, die mit einem gentamicinbeschichteten Implantat intramedullär versorgt und mit der Bakteriensuspension infiziert wurden. Wie oben angeführt (Tabelle 14), wird Kaninchen 146 mit 10^5 KBE Staphylococcus aureus in 50 μ l infiziert und die Kaninchen 150 und 151 mit der gleichen Keimdosis in 100 μ l. Die übrigen Tiere erhalten ein Volumen von 150 μ l.

Bei acht Tieren verläuft der achtwöchige Beobachtungszeitraum ohne Komplikationen. Futter- und Wasseraufnahme sind normal. Drei Kaninchen (Nr. 40, 48 und 91) zeigen nach der Operation für ein bis vier Tage Fieber.

Nach acht bis zehn Tagen ist bei keinem der Tiere mehr vermehrte Wärme oder Schwellung am operierten Femur festzustellen. Die Tiere belasten lahmheitsfrei. Eine Abszessbildung wird nicht festgestellt.

Bei Kaninchen 63 kommt es intra operationem zur Fraktur des Trochanter major, so dass das Implantat im Femur wandert. Das Tier zeigt während der ersten drei Tage Fieber. Schwellung oder vermehrte Wärme sind nicht festzustellen, jedoch eine hochgradige Lahmheit, Beckenschiefstellung und Atrophie der Muskulatur des rechten Oberschenkels. Das Tier wird über 19 Tage mit Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg s.c.) therapiert. In der Futteraufnahme und Gewichtszunahme bleibt es in deutlich hinter den übrigen Tieren dieser Gruppe zurück.

Ein Kaninchen (Nr. 150) wird drei Tage nach der Operation aufgrund einer Femurfraktur vorzeitig aus dem Versuch genommen.

Die Leukozytenwerte liegen bei allen Tieren im Referenzbereich.

Alle Blutkulturen sind negativ und ein systemischer Gentamicinspiegel ist nicht nachweisbar.

Bei der Sektion erscheinen Muskulatur und Knochen unauffällig.

Die Abbildungen 8 bis 11 stellen die Blutwerte der Osteomyelitisgruppe bei den Kontrolltieren und den Tieren mit gentamicinbeschichtetem Implantat grafisch dar. Erythrozytenwerte, Hämatokrit und Hämoglobin liegen innerhalb der Norm.

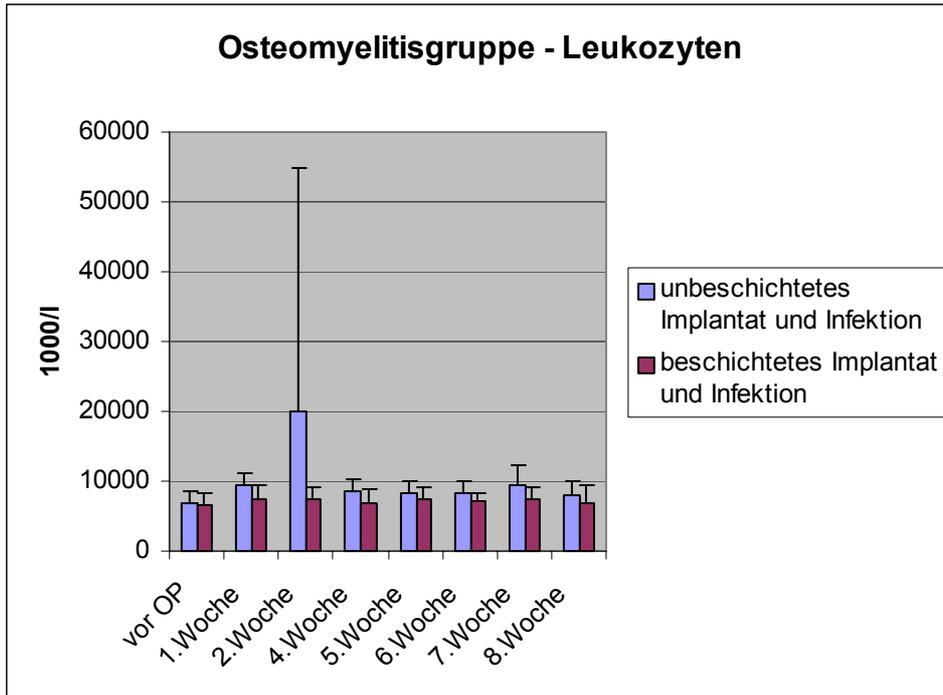


Abbildung 8: Leukozytenwerte der Osteomyelitisgruppe

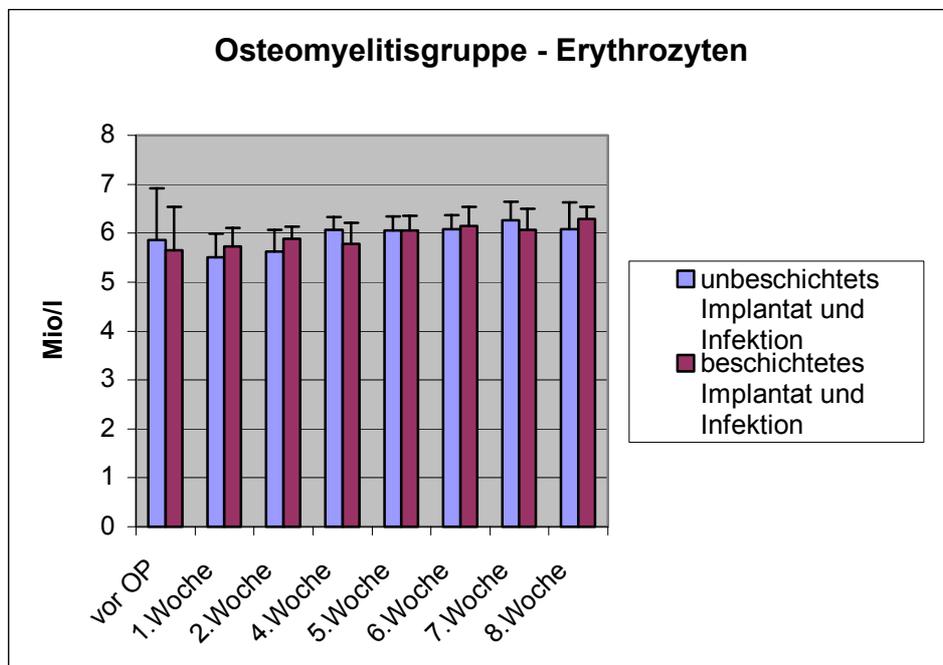


Abbildung 9: Erythrozytenwerte der Osteomyelitisgruppe

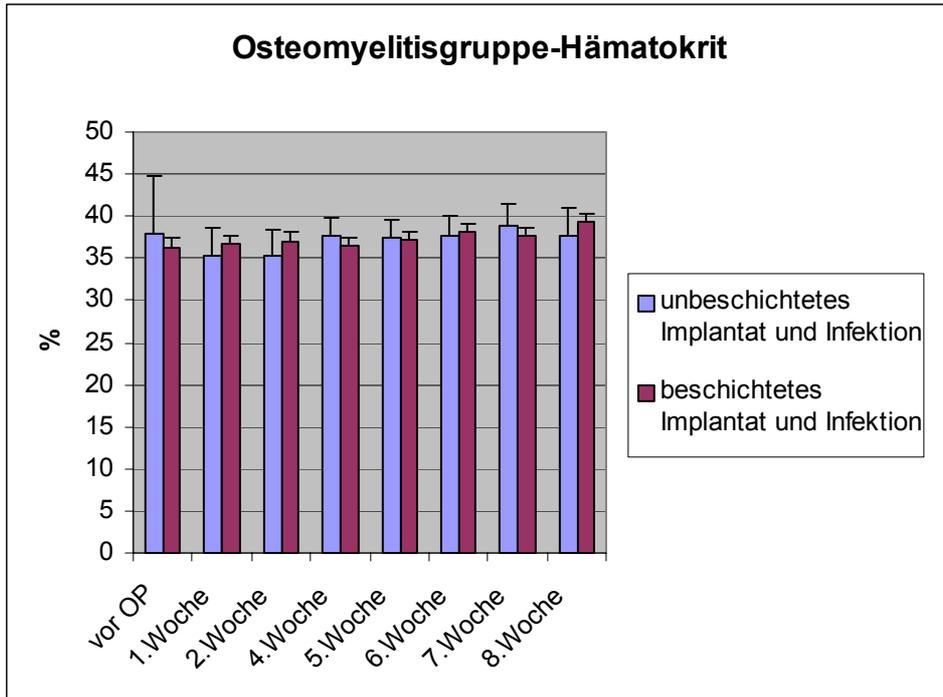


Abbildung 10: Hämatokritwerte der Osteomyelitisgruppe

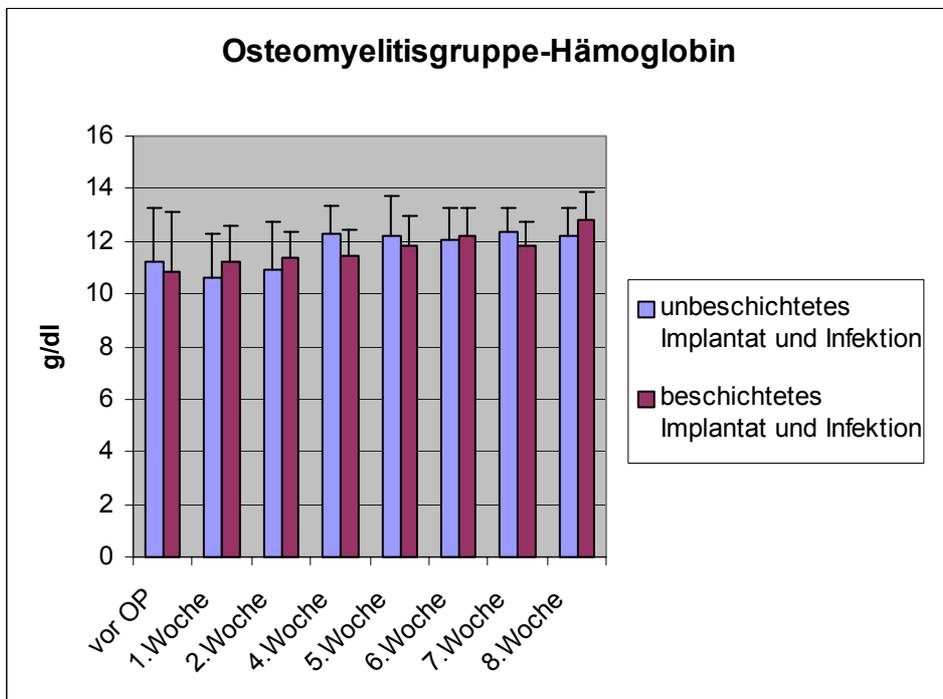


Abbildung 11: Hämoglobinwerte der Osteomyelitisgruppe

3.3.3 Röntgenologische Auswertung

Bei der Beurteilung der post mortem angefertigten Röntgenaufnahmen fällt auf, dass es bei fast allen Tieren am distalen Ende des Implantats zu einer leichten Sklerose kommt. Im oberen Drittel des Femurs zeigt sich eine Kortikalisverdickung. Bei zwei Kaninchen der Osteomyelitisgruppe (Nr. 64, 63) zeigen sich um das Implantat stellenweise osteolytische Herde (siehe Abbildung 12). Bei Kaninchen 63, das ein gentamicinbeschichtetes Implantat erhielt, können auch sklerotische Veränderungen festgestellt werden. Typische radiologische Befunde einer Osteomyelitis werden bei keinem der Tiere festgestellt. Die Aufnahmen der Biokompatibilitätsgruppe weisen mit Ausnahme von Kaninchen 52, bei dem um das Implantat stellenweise osteolytische als auch sklerotische Herde zu finden sind, keine pathologischen Veränderungen auf.

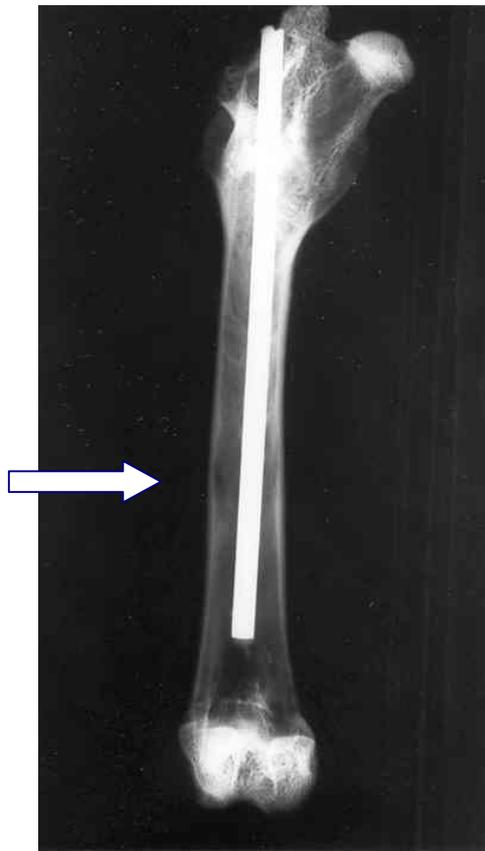


Abbildung 12: Osteolytischer Herd (→) bei einem Tier der Osteomyelitisgruppe (unbeschichtetes Implantat und Infektion)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3.4 Mikrobiologische Auswertung der Kontrollgruppe

3.3.4.1 Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat und Infektion

| Kaninchen-Nr. | Abstrich | Implantat | rechter Femur | linker Femur | Blutkultur |
|----------------------|--------------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| 53 | Abszess + | steril | steril | steril | positiv |
| 49 | Abszess + | steril | steril | steril | steril |
| 39 | Abszess + | steril | steril | steril | steril |
| 57 | Abszess + | steril | steril | steril | steril |
| 64 | Abszess + Knochen + | positiv | positiv | steril | steril |
| 302 | steril | steril | steril | steril | steril |
| 152 | Abszess + | positiv | positiv | steril | steril |
| 149 | steril | steril | steril | steril | steril |
| 88 (Fraktur) | Knochen + Abszess+ | positiv | positiv | steril | steril |
| 42 (Fraktur) | Knochen + Abszess + | positiv | positiv | steril | steril |

Tabelle 15: Mikrobiologische Auswertung der Kontrolltiere (+ bzw. positiv entspricht dem Nachweis des inokulierten Staphylococcus aureus)

Tabelle 15 zeigt den mikrobiologischen Befund der Osteomyelitisgruppe. Bei acht Tieren der Kontrollgruppe wird Staphylococcus aureus aus Abszessen um den Trochanter major nachgewiesen. Ein Keimnachweis aus dem Femur und am Implantat ist bei vier Tieren (Kaninchen 64, 152, 88, 42) neben den Abszessabstrichen positiv.

Bei Kaninchen 149 und 302 ist ein Keimnachweis aus dem Knochen oder am Implantat nicht möglich. Diese beiden Tiere haben auch keinerlei Abszesse; es sei hier auf die histologische Auswertung verwiesen.

Der linke Femur ist bei allen Tieren mikrobiologisch negativ.

Die Blutkultur ist nur bei Kaninchen 53 positiv und erbringt den Nachweis von Staphylococcus aureus.

3.3.4.2 Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat und Infektion

| Kaninchen-Nr. | Abszesse | Implantat | rechter Femur | linker Femur | Blutkultur |
|----------------------|-----------------|------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| 38 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 40 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 48 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 50 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 55 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 63 | negativ | positiv | positiv | steril | steril |
| 91 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 146 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 151 | negativ | steril | steril | steril | steril |
| 150 (Fraktur) | negativ | steril | steril | steril | steril |

Tabelle 16: Mikrobiologische Auswertung der Osteomyelitisgruppe mit Gentamicin beschichtetem Implantat

Die mikrobiologische Untersuchung der Tiere, die ein gentamicinbeschichtetes Implantat erhielten, erbringt bei neun von zehn Tieren ein negatives Ergebnis. Bei keinem der Kaninchen dieser Gruppe bilden sich Abszesse. Kaninchen 150, das wie oben erwähnt bereits drei Tage nach der Operation euthanasiert wurde, ist mikrobiologisch ebenfalls negativ.

Lediglich bei Kaninchen 63 wird *Staphylococcus aureus* aus dem rechten Femur und am Implantat nachgewiesen.

Die Blutkulturen sind bei allen Tieren negativ (siehe Tabelle 16).

Die gentamicinhaltige Poly-D,L-Laktid-Beschichtung der Hohl Nägel reduziert signifikant die Bildung von Abszessen und den Keimnachweis aus dem Femur ($p=0,00034$; exakter Test nach Fisher).

3.3.5 Histologische Auswertung

3.3.5.1 Biokompatibilitätsgruppe – Implantat ohne Beschichtung

Die Kaninchen dieser Gruppe erhielten ein unbeschichtetes Implantat und wurden nicht infiziert. Das histologische Bild zeigt bei allen Tieren leichte bis deutliche Entzündungserscheinungen. Stellenweise werden Fibrininseln gefunden. Um das Implantat finden sich Blutungen sowie Bindegewebszubildungen. Das Knochenmark erscheint aufgrund des hohen

Anteils an Megakaryozyten und anderen Vorläuferzellen der Blutzellen reaktiv. Bei zwei Kaninchen (Nr. 43 und 90) fällt eine Inhomogenität des Knochenmarks auf, mit teils dicht zellinfiltrierten Bereichen und Abschnitten mit zellarmem Fettmark. Eine leichte Reizung der Kortikalis mit endostaler und periostaler Knochenzubildung lässt sich bei Kaninchen 46 feststellen; zudem finden sich kleinere Sequester und fibrinöse Durchtränkungen. Bei einem Tier (Kaninchen 52) ist der gesamte Markraum fibrinös durchtränkt. Neben Sequestern und nekrotischen Anteilen finden sich auch ein bindegewebig abgegrenzter Markabszess sowie Granulationsgewebe. Die histologischen Befunde der Tiere dieser Gruppe sprechen für eine noch akute Entzündung. Der linke Femur ist histologisch unauffällig.

3.3.5.2 Biokompatibilitätsgruppe – Implantat mit Beschichtung

Histologisch erscheinen die Präparate in der Gruppe mit gentamicinbeschichtetem Implantat ähnlich der Kontrollgruppe. Auch hier finden sich Blutungen um das Implantat sowie eine entzündliche Ödematisierung des Markraums, die v.a. bei Kaninchen 45 und 47 ausgeprägt ist. Bei einem Tier (Kaninchen 41) erscheint der Markraum ausgesprochen zellarm. Bei Kaninchen 45, 47 und 89 finden sich Histiozyten (=Gewebsmakrophagen). Lymphozytenansammlungen oder sogenannte Markknötchen lassen sich bei Kaninchen 41, 45 und 47 finden. Auffällig ist die bei allen Präparaten auftretende deutliche Fibrosierung des Markraums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der linke Femur ist histologisch unauffällig.

3.3.5.3 Osteomyelitisgruppe – unbeschichtetes Implantat und Infektion

Von den zehn Kaninchen dieser Gruppe (Kontrollen) können lediglich von sechs Tieren histologische Präparate ausgewertet werden: Zwei Tiere werden aufgrund einer Femurfraktur nicht in die histologische Auswertung aufgenommen, zwei weitere werden nur mikrobiologisch und nicht histologisch ausgewertet.

In allen Präparaten lassen sich Merkmale einer akuten oder chronischen Osteomyelitis nachweisen. Treten akute und chronische Merkmale nebeneinander auf und ist eine exakte Zuordnung zu einem der beiden Stadien nicht möglich, so wird dies als Übergangsform gewertet. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Zuordnung der einzelnen Tiere zu den verschiedenen Stadien.

| Osteomyelitisgruppe-unbeschichtetes Implantat | | |
|--|-----------------------|---------------------------------|
| Akute Osteomyelitis | Übergangsform | Chronische Osteomyelitis |
| Kaninchen-Nr. 57, 152 | Kaninchen-Nr. 149, 39 | Kaninchen-Nr. 64, 302 |

Tabelle 17: Überblick über die histomorphologischen Stadien in der Kontrollgruppe

Bei Kaninchen 57 und 152 ist die Osteomyelitis in ihrer Erscheinungsform akut. Der Markraum ist hier entzündlich ödematisiert, stellenweise finden sich auch ausgedehnte Fibrinexsudationen. Im Markraum können dicht gepackte Ansammlungen von Entzündungszellen (v.a. neutrophile Granulozyten) aber auch Makrophagen festgestellt werden (Abbildung 13). Neben den bereits erwähnten pathologischen Veränderungen finden sich bei Kaninchen 64, 149 und 57 auch bindegewebig abgegrenzte Markabszesse. Bei Kaninchen 39 und 57 werden Osteolysen in der Kortikalis festgestellt. Nekrotische Gewebeanteile und Sequester treten in allen Präparaten auf. Bei zwei Tieren (Kaninchen 39 und 149) bestehen akute und chronische Osteomyelitism征kmale nebeneinander. Auffallend ist hier die Ausbildung von Granulationsgewebe und das Einsprossen von Kapillaren in den Markraum. Bei Kaninchen 39 finden sich neben den erwähnten osteolytischen Herden in der Kortikalis auch Knochenanbauzonen.

Die histologischen Schnitte von Kaninchen 64 und 302 sprechen für eine chronische Osteomyelitis. Bei Kaninchen 64 finden sich mehrere von Narbengewebe abgekapselte Markabszesse. Stellenweise finden sich ausgedehnte Ansammlungen von Entzündungszellen einschließlich Lymphozyten und Plasmazellen, an anderen Stellen ist der Markraum deutlich fibrosiert und von blutgefüllten Kapillaren durchzogen. Bei Kaninchen 302 finden sich nur noch wenig zelluläre Reaktionen und ein ausgedehntes faserreiches Narbengewebe (Abbildung 14).

Die histologische Untersuchung des linken Femurs zeigt bei allen Tieren fokale Nekrosen, Sequester sowie Fibrindurchtränkungen. Bei Kaninchen 39 findet sich ein Markabszess. Bei Kaninchen 64 und 302 ist der Markraum auffallend zellarm.

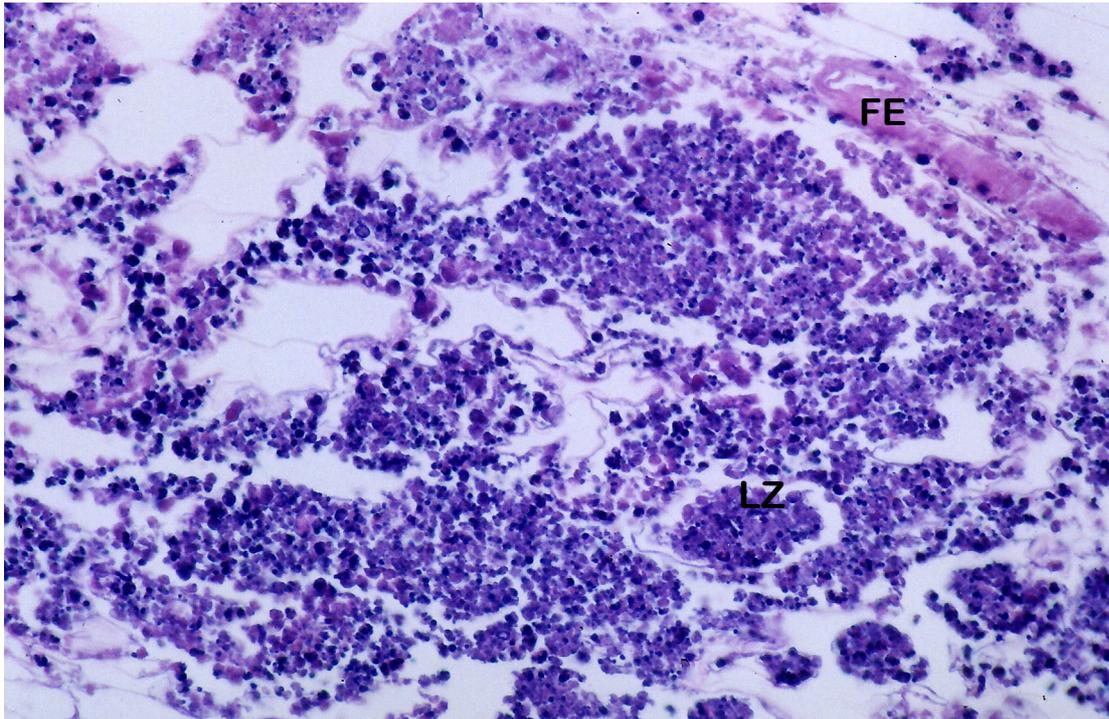


Abbildung 13: Akute Osteomyelitis bei einem Tier mit unbeschichtetem Implantat, mit dichten Ansammlungen leukozytärer Zellen (LZ) und Fibrinexsudationen (FE) (H.E.-Färbung, x80)

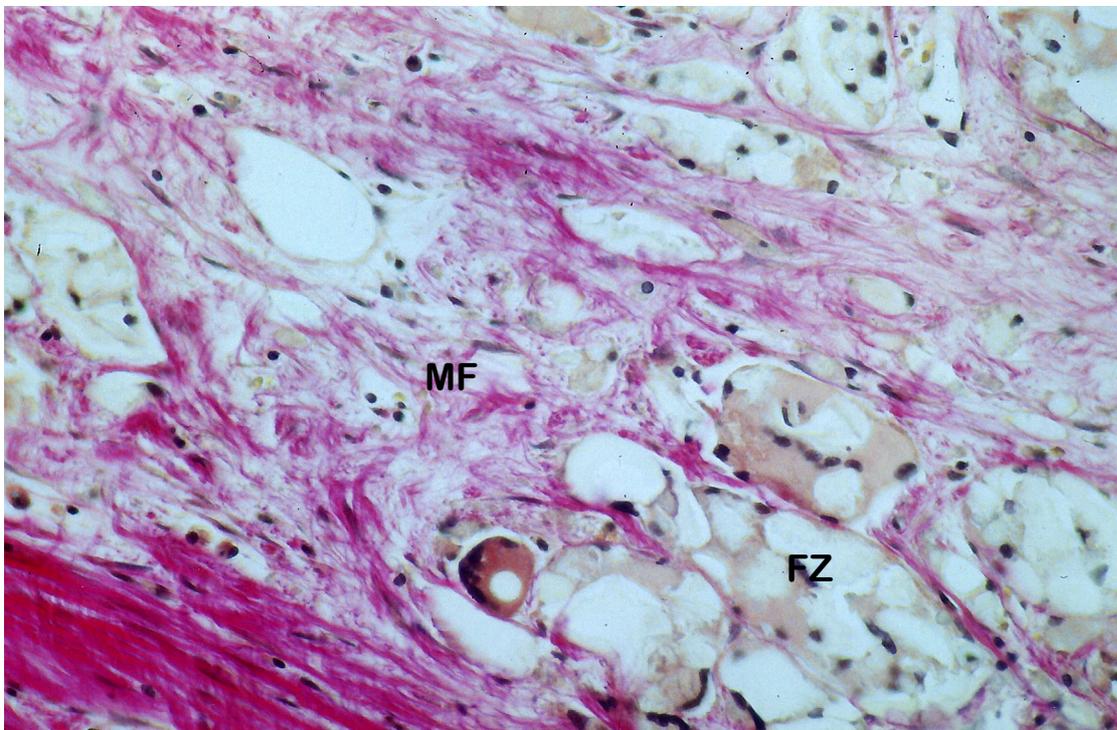


Abbildung 14: Chronische Osteomyelitis bei einem Tier mit unbeschichtetem Implantat, mit deutlicher Fibrosierung des Markraums (MF), kaum mehr zelluläre Infiltrate, kernarmes Gewebe, Fettzellen (FZ) (Elastica van Gieson, x80)

3.3.5.4 Osteomyelitisgruppe – beschichtetes Implantat und Infektion

Von den zehn Tieren dieser Gruppe, die ein gentamicinbeschichtetes Implantat erhielten und mit der Staphylokokkensuspension infiziert wurden, wird ein Kaninchen nur mikrobiologisch ausgewertet, ein anderes aufgrund einer Femurfraktur vorzeitig aus dem Versuch genommen. Es kommen somit acht Tiere zur histologischen Auswertung. Tabelle 18 zeigt die Zuordnung der einzelnen Versuchstiere zu den verschiedenen Entzündungsstadien. Auch hier wird ein Auftreten akuter und chronischer histopathologischer Merkmale nebeneinander festgestellt und als Übergangsform eingeteilt.

| Osteomyelitisgruppe- beschichtetes Implantat | | |
|---|-----------------------|---------------------------------|
| Akute Osteomyelitis | Übergangsform | Chronische Osteomyelitis |
| Kaninchen-Nr. 55, 91, 63 | Kaninchen-Nr. 50, 146 | Kaninchen-Nr. 40, 48, 151 |

Tabelle 18: Überblick über die histomorphologischen Stadien in der Osteomyelitisgruppe mit Gentamicin beschichtetem Implantat

Bei Kaninchen 55 und 91 sprechen die histopathologischen Befunde für eine noch akute Osteomyelitis. Es fallen ausgedehnte Ansammlungen von Leukozyten, eine entzündliche Ödematisierung des Markraums und Fibrinexsudationen sowie Sequester auf. Bei Kaninchen 55 kann jedoch im Markraum bereits ein Einsprossen von Fibrozyten festgestellt werden. Bei den übrigen Tieren (Kaninchen 50, 146, 48, 151) treten neben Fibrinexsudationen, nekrotischen Gewebeanteilen und Sequestern die Fibrosierung und Kapillarisation des Markraums deutlich in Erscheinung. Das Knochenmark erscheint inhomogen (siehe Abbildung 16) mit sehr zellreichen Abschnitten (sowohl Entzündungszellen als auch Zellen des aktiven hämatopoetischen Knochenmarks) aber auch, v.a. zum gentamicinbeschichteten Implantat hin, nur noch Fettmark bzw. kernarmem Gewebe. Kaninchen 50 weist Osteolysen in der Kortikalis auf. Bei keinem der Tiere in dieser Gruppe finden sich aber im Gegensatz zur Kontrollgruppe bindegewebig abgegrenzte Markabszesse. Auch treten in dieser Gruppe Knochenmarksabschnitte auf, die weitgehend frei von Entzündungserscheinungen sind (Abbildung 15).

Bei Kaninchen 63 ist das histologische Bild geprägt von einer massiven Ansammlung von Entzündungszellen (polymorphkernige Leukozyten), einem fibrindurchtränkten Markraum sowie teils bindegewebig abgegrenzten Sequestern. Außerdem können bei diesem Tier im

Gegensatz zur restlichen Gruppe mehrere von Narbengewebe abgegrenzte Markabszesse festgestellt werden.

Der linke Femur erscheint, mit Ausnahme von Kaninchen 63 bei dem ausgedehnte Ansammlungen von Entzündungszellen festgestellt werden, unauffällig. Zellarme Abschnitte fallen bei 4 Tieren (Kaninchen 48, 50, 55, 151) auf.

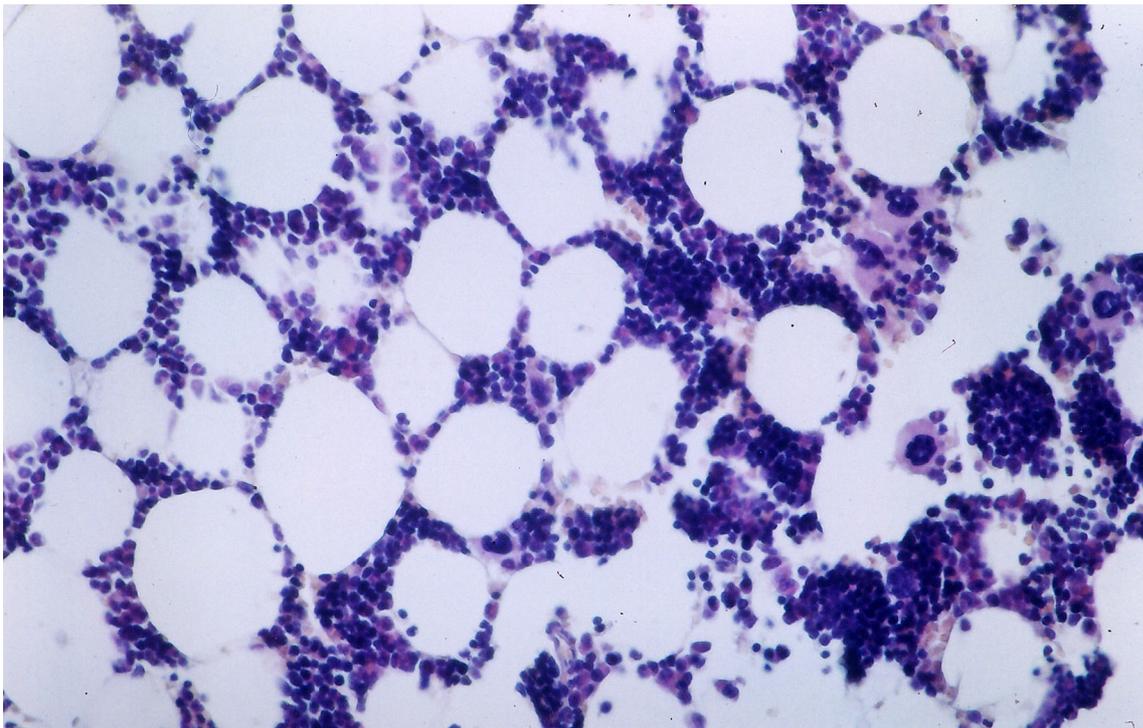


Abbildung 15: Unverändertes Knochenmark (hämatopoetisches Knochenmark, Fettzellen) bei einem Tier mit Gentamicin-Poly-D,L-Laktid-beschichtetem Implantat (H.E.-Färbung, x80)

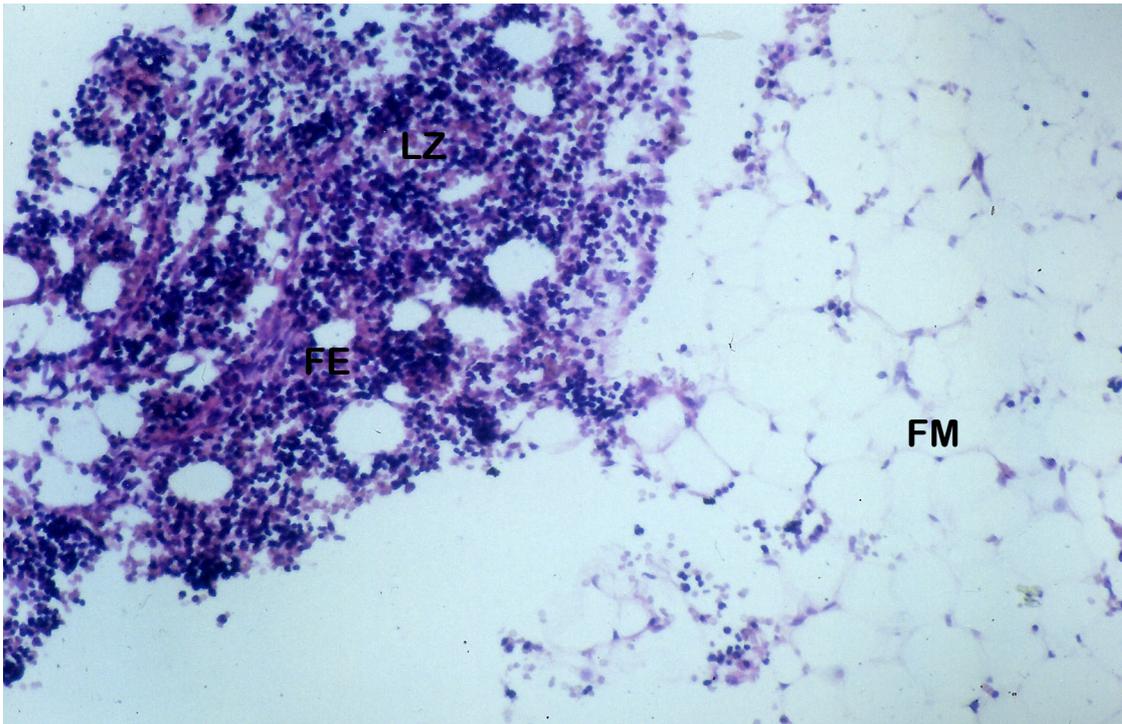


Abbildung 16: Inhomogenes Knochenmark mit zellichten Bereichen (dichte Ansammlungen von Entzündungszellen und Fibrinexsudationen) und zellarmem Fettmark (FM) (H.E.-Färbung, x80)

4 DISKUSSION

Die Infektion von Osteosynthesematerialien oder Endoprothesen ist trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der operativen Medizin, der Entwicklung moderner Antibiotika und Biomaterialien weiterhin eine gefürchtete und schwerwiegende Komplikation.

Der Initialschritt in der Entstehung Implantat assoziierter Infektionen ist die bakterielle Adhäsion und Besiedelung des Fremdmaterials.

Der Grundgedanke der vorliegenden Studie ist, prophylaktisch bereits am Initialschritt durch eine antimikrobielle Beschichtung des Implantatmaterials zu intervenieren. Eine wirksame antimikrobielle Prophylaxe erscheint angesichts der weitreichenden Folgen dieser Erkrankungen gerechtfertigt. Antibiotikhaltiger Knochenzement oder Gentamicin-PMMA-Ketten zählen seit langem zum Standard in der Endoprothetik, in der Prophylaxe septischer Prothesenwechsel und auch zur Herdsanierung chronischer posttraumatischer Osteomyelitiden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine abriebstabile und bioresorbierbare Beschichtung (Poly-D,L-Laktid kombiniert mit dem Antibiotikum Gentamicin) von Osteosynthesematerialien hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens von Gentamicin zu überprüfen sowie ihre Verträglichkeit und Wirksamkeit bei experimentell induzierten Knocheninfektionen am Kaninchenmodell zu untersuchen.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Beschichtung der Marknägel

Mit der sogenannten Kaltbeschichtungstechnologie, bei der das in Ethylacetat gelöste Poly-D,L-Laktid Resomer R203® mit Gentamicinpulver kombiniert und lackartig auf die Implantate aufgebracht wird, hat die Arbeitsgruppe ein aseptisches Verfahren zur antiinfektiven Beschichtung von Osteosynthesematerialien entwickelt.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten eine hohe mechanische Stabilität dieser ca. 10 µm dicken Beschichtung sowohl bei der Implantation von Kirschner-Drähten in Rattentibiae wie auch von Tumorendoprothesen im humane Leichenfemora. Der Beschichtungsverlust betrug dabei lediglich 4 %, so dass die Beschichtung stabil auf den Implantaten gebunden bleibt. Ein Dehnungsversuch zeigte eine Belastungsstabilität von 7,8 % und bestätigt damit weiterhin die ausgezeichnete Haftung der Beschichtung. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten sowohl eine bakteriostatische Wirkung des reinen Poly-D,L-Laktids wie auch eine

DISKUSSION

knochenheilungsfördernde Wirkung und gute Biokompatibilität im Knochenlager (SCHMIDMAIER et al. 2001a; SCHMIDMAIER et al. 2001b; GOLLWITZER 2002).

Die Freisetzung eingearbeiteter Antibiotika aus Poly-D,L-Laktid wurde bereits in der Studie von GOLLWITZER (2002) eingehend behandelt. Er konnte für eine Einarbeitung von Gentamicin in 5%-iger Konzentration in das Polymer nach einem anfänglichen Peak eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über 96 Stunden nachweisen.

In der vorliegenden Studie wurden die Implantate mit einer 10%-igen Gentamicinsuspension beschichtet. Damit ist das Polymer als Trägersubstanz maximal beladen.

Im vorliegenden Versuch wurden die Homogenität der Beschichtung sowie die Freisetzung des Gentamicin kontrolliert. Wie die Ergebnisse des Elutionsversuchs zeigen, wird von den Implantaten des Beschichtungsansatzes der Reihe B mehr Gentamicin im Versuchszeitraum von 96 Stunden eluiert. Während in Reihe A nur 502,5 µg Gentamicin verfügbar sind, werden in Reihe B 763,5 µg Gentamicin freigesetzt. Dieser Unterschied ist auf den noch nicht ausreichend standardisierten Herstellungsvorgang zurückzuführen. Den größten Einfluß hat hier vermutlich das Pottern, wodurch das Lösen und Verteilen des Gentamicin im Ethylacetat erreicht wird und sich eine homogene Suspension ergibt.

Eine hohe lokale bakterizide Wirkung, die auch über einen genügend langen Zeitraum anhält, wird aber sowohl durch das Ergebnis des Kapillar- als auch des Elutionsversuchs bestätigt. Der Kapillarversuch beweist die In-vitro-Wirksamkeit der Beschichtung und die Abtötung der in die Nährlösung eingebrachten Keime.

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nur Implantate der Reihe B eingesetzt. Wie die Freisetzungsversuche von Gentamicin zeigen, ist im Versuchszeitraum von 96 Stunden für die Marknägel der Reihe B eine Menge von 763,5 µg/ml Gentamicin annähernd konstant verfügbar. Auf einen Hohnagel dieser Reihe konnte eine Menge von ca. 255 µg Gentamicin aufgebracht werden. Gemäß den Richtlinien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2000) beträgt die minimale Hemmkonzentration (MIC) von Gentamicin gegenüber *Staphylococcus aureus* 4 µg/ml. Die Menge an Gentamicin in der Beschichtung liegt damit weit über der MIC, so dass eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration in der unmittelbaren Implantatumgebung gewährleistet ist. Da sich Bakterien an nekrotischen Knochen bzw. in der Frühphase nach der Operation an ein metallisches Implantat anheften und einen sekundären Biofilm ausbilden können (MAYBERRY-CARSON 1984 et al.; GRISTINA 1987), in dem sie vor der körpereigenen Immunabwehr wie auch vor Antibiotika geschützt sind, muss die Antibiotikakonzentration für eine Eradikation solcher Bakterien um ein Vielfaches höher sein (NAYLOR et al. 1990). Dies ist durch den Antibiotikagehalt in der

Poly-D,L-Laktid-Beschichtung gegeben. Das in der eigenen Studie angewandte System der lokalen Antibiotikaaanwendung ermöglicht damit am Wirkort Konzentrationen, die systemisch vom Organismus ohne das Auftreten von Nebenwirkungen nicht zu tolerieren wären.

Neben der systemischen perioperativen Antibiotikaphylaxe haben sich in der Therapie und Prävention posttraumatischer Osteomyelitiden und bei ein- und zweizeitigen Endoprothesenwechseln gentamicinhaltiger Knochenzement sowie Gentamicin-PMMA-Ketten bewährt (BUCHHOLZ und ENGELBRECHT 1970; KLEMM 1989). In Verbindung mit diesen nicht-resorbierbaren Trägersubstanzen wurde in der Literatur mittlerweile aber über die Selektion sogenannter Small Colony Variants, SCVs, von *Staphylococcus aureus* bei Osteomyelitis-Patienten, die mit Gentamicin-PMMA-Ketten behandelt wurden, berichtet. Bei SCVs handelt es sich um langsam wachsende Subpopulationen von *Staphylococcus aureus*, die durch die langsame Freisetzung von Gentamicin in die Implantatumgebung selektiert werden und zu rekurrierenden Infektionen führen können (VON EIFF et al. 1997; VON EIFF et al. 1998; HÄUBLER 2003). Zu niedrige Antibiotikaspiegel fördern die Selektion resistenter Bakterienstämme. Für Weichteilinfektionen hat sich besonders der Gentamicin-Kollagen-Schwamm etabliert, der sich durch seine Abbaubarkeit und Freisetzung hoher Gentamicinspiegel über einen nur begrenzten Zeitraum auszeichnet (STEMBERGER et al. 1997). Seine Anwendung ist jedoch aufgrund seiner mechanischen Belastbarkeit limitiert. Implantatmaterialien sind besonders in der frühen postoperativen Phase gegenüber einer bakteriellen Besiedelung sehr empfindlich und das Immunsystem des Patienten durch den Eingriff wie auch das Einbringen des Implantats geschwächt (SOUTHWOOD et al. 1985; GRISTINA et al. 1985; GRISTINA et al. 1991). Ein zusätzlicher lokaler antibiotischer Schutz gerade in dieser vulnerablen Phase ist daher sinnvoll. Die mechanisch stabile antiinfektive Beschichtung kann direkt auf das Implantatmaterial aufgebracht werden und dieses somit vor einer bakteriellen Besiedelung wirkungsvoll schützen. Sie greift damit bereits am Initialschritt einer möglichen Infektion durch die Verhinderung der bakteriellen Besiedelung des Fremdmaterials an. Die Beschichtung wird hydrolytisch gespalten und in Abhängigkeit vom initialen Molekulargewicht über Wochen vollständig resorbiert.

Für die vorliegende Studie wurde als einzuarbeitendes Antibiotikum Gentamicin ausgewählt, da dieses sich seit langem auf dem Gebiet der Knochen-, Gelenk- und Weichteilchirurgie bewährt hat. Sein Wirkspektrum schließt die meisten Erreger Implantat assoziierter Infektionen ein und sein bakterizider Wirkmechanismus, der sowohl proliferierende wie auch ruhende Keime umfasst, erweist sich für eine lokale Anwendung vorteilhaft (ESTLER 2000).

4.1.2 Tiermodell

In der vorliegenden Studie sollte die prophylaktische Wirkung einer gentamicinhaltigen Beschichtung von Osteosynthesematerialien untersucht werden. Das gewählte Tiermodell sollte gut reproduzierbar sein und eine lokalisierte Osteomyelitis ohne septikämische Krankheitserscheinungen erzeugt werden.

Wie bereits im Schrifttum tabellarisch dargestellt, sind in der Literatur eine Vielzahl an Osteomyelitismodellen an Hunden, Schafen, Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen beschrieben. Die Wahl des Versuchstiermodells wird von der Vergleichbarkeit pathologischer osteomyelitischer Erscheinungen bei Tier und Mensch bestimmt, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sicherzustellen (WORLOCK et al. 1988; EERENBERG et al. 1994). Bei der Auswahl der Versuchstierspezies hat sich das Kaninchen seit langem als Versuchstier auf dem Gebiet der Osteomyelitis etabliert. Die Tierart ist groß genug, um auch kompliziertere operative Eingriffe durchführen zu können. Das Kaninchen ist sensitiv für das gewünschte bakterielle Keimspektrum und wurde für die vorliegende Studie nicht zuletzt auch aufgrund seiner vergleichsweise kostengünstigen Haltung ausgewählt.

Das in dieser Studie verwendete Implantat, ein Hohl Nagel, wird auch in der Humanmedizin zur intramedullären Fraktur stabilisierung routinemäßig angewendet. Das Design wurde aber im eigenen Modell durch Bohrungen im 90°-Winkel zur Längsachse modifiziert. Die inokulierte Bakteriensuspension sollte durch die seitlichen Bohrungen in den Knochen austreten und so die ganze Markhöhle infizieren.

Aufgrund des einfachen operativen Zugangs und der Größe des Knochens wurde der Femur ausgewählt. Als problematisch erwies sich hier die leichte Frakturneigung zum einen aufgrund der leichten Krümmung des Femurschaftes, die ein Einbringen des Implantats ohne stärkeres Aufbohren und somit Schwächen des Kortikalis erschwerte, zum anderen sind die Knochen beim Kaninchen relativ spröde und splintern leicht. Zudem kam es im Bereich des Trochanter major stets zu unterschiedlich starken Blutungen, die ein Einbringen der Keime ohne Kontamination der Bohrstelle erschwerte.

Der Untersuchungszeitraum für die Osteomyelitisgruppe wurde auf acht Wochen festgesetzt. In diesem Zeitraum sind manifeste Anzeichen der Erkrankung zu erwarten und sollten anhand der ausgewählten Untersuchungsparameter zu erfassen sein. Gerade mit dem Auftreten radiologischer Erscheinungen ist bei Osteomyelitiden frühestens nach 14 Tagen zu rechnen (NORDEN 1970; KINZL und FLEISCHMANN 1992; EERENBERG et al. 1994).

Eine Osteomyelitis kann durch das Einbringen von Fremdkörpern (metallische Implantate oder PMMA), die Beeinträchtigung der intraossären Blutversorgung durch sklerosierende

DISKUSSION

Substanzen oder Frakturierung sowie die Inokulation von Bakterien induziert werden (NORDEN 1970; PASSL et al. 1984; PETTY et al. 1985; SCHULZ et al. 2001). Die Inokulation einer sehr hohen Dosis von Bakterien allein führt nicht zwangsläufig zu einer Osteomyelitis (NORDEN 1970; ANDRIOLE 1973). Durch die Anwesenheit von Fremdkörpern lässt sich die notwendige Infektionsdosis reduzieren. Die niedrigere Dosierung der Keime ermöglicht die Induktion osteomyelitischer Veränderungen ohne systemische Erscheinungen (PASSL et al. 1984; WORLOCK et al. 1988).

So konnten beispielsweise ANDRIOLE et al. (1973) zeigen, dass die Inokulation von 2×10^8 KBE *Staphylococcus aureus* in die unbehandelte Tibia von Kaninchen nicht zu einer mikrobiologisch oder röntgenologisch fassbaren Infektion führte, während sich in Anwesenheit eines Implantats durch eine Dosis von 2×10^6 KBE *Staphylococcus aureus* eine chronische Osteomyelitis erzeugen ließ. PETTY et al. (1985) konnten an Hunden ebenfalls zeigen, dass die Implantation von Fremdkörpern wie PMMA oder Metallen die notwendige Infektionsdosis gegenüber unbehandelten Kontrolltieren senkt ($2,4 \times 10^5$ KBE *Staphylococcus aureus* für Stahlimplantate im Vergleich zu $1,7 \times 10^8$ KBE in Kontrolltieren ohne Implantat). Eine Verödung der Markraumgefäße durch sklerosierende Substanzen ermöglicht ebenfalls eine Reduktion der Keimdosis. SCHULZ et al. (2001) gelangen unter Verwendung von 5%-igem Natrium morrhuate und einem Inokulat von nur $0,3 \times 10^6$ KBE *Staphylococcus aureus* die Erzeugung einer chronischen Osteomyelitis bei 100 % der eingesetzten Kaninchen. Für die Induktion einer klinisch fassbaren Osteomyelitis ist jedoch eine minimalinfektive Dosis notwendig. RODEHEAVER et al. (1983) konnten in ihrer Studie zur Wirksamkeit von antibiotikahaltigem Knochenzement mit einer Dosis von 10^3 KBE *Staphylococcus aureus* keine Osteomyelitis erzeugen. Eine Dosis von 10^5 KBE führte in 75 % der Fälle zu einer Infektion, eine Dosis von 10^6 KBE dagegen zum Tod der Tiere durch Sepsis vor Ende des Untersuchungszeitraumes. ARENS et al. (1996) verwendeten in ihren Untersuchungen zur Infektanfälligkeit von Stahl- oder Titanplatten Infektionsdosen zwischen 4×10^3 und 4×10^6 KBE *Staphylococcus aureus* pro 100 μ l. Die ID₅₀ betrug für Stahl 2×10^4 KBE und für Titan 2×10^5 KBE *Staphylococcus aureus* und bewies somit, dass Implantate aus Stahl eine größere Infektproblematik mit sich bringen als solche aus Titan.

Unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse entschied man sich im eigenen Modell für eine Keimdosis von 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* in einem Volumen von 150 μ l. Diese Dosis liegt damit niedriger als die der meisten Modelle in der Literatur. In der eigenen Studie sollte weniger die Pathogenese einer Osteomyelitis untersucht (NORDEN 1970; PASSL et al. 1984; EERENBERG et al. 1994) noch eine bereits manifeste Osteomyelitis therapiert (EVANS und

NELSON 1993; BELMATOUG et al. 1996; NIE et al. 1998; YAGMURLU et al. 1999; KANELLAKOPOULOU et al. 2000) werden. Vielmehr wollte man ein Prophylaxemodell bei reduzierter Keimzahl etablieren. Auf weitere Manipulationen wie die Zerstörung der Markraumgefäße durch sklerosierende Substanzen (Osteonekrose) oder Frakturierung des Knochens wurde verzichtet, um die klinische Situation möglichst genau zu imitieren und das Implantat in das Zentrum des Infektgeschehens zu stellen.

Als problematisch erwies sich bei der eigenen gewählten Operationstechnik die Standardisierung der eingebrachten Keimmenge. Bei der Implantation kam es stets zu unterschiedlich starken Blutungen aus dem Femur, so dass letztlich nicht die gesamte Menge an Bakterien-suspension in den Femur eingebracht werden konnte. Die osteomyelitischen Erscheinungen waren demzufolge bei den Kontrolltieren weniger stark ausgeprägt als erwünscht und klinisch schwer fassbar. Auch eine stichprobenartige Konzentrationserhöhung der bakteriellen Suspension durch Verringerung des eingebrachten Volumens unter Beibehaltung der Keimdosis von 10^5 KBE führte nur bei einem von drei Kontrolltieren zu einem mikrobiologisch positiven Keimnachweis aus dem rechten Femur. Aufgrund einer gewissen Selbstheilungstendenz und bei einem guten Immunstatus scheinen die Tiere eine Infektion speziell bei einer niedrigen Keimdosis überwinden zu können. Diese Beobachtung lässt sich auch an anderen Osteomyelitsmodellen bestätigen (ANDRIOLE 1973; RIEGELS-NIELSEN et al. 1995).

4.2 In-vivo-Ergebnisse

4.2.1 Biokompatibilitätsgruppe

Die Tiere dieser Gruppe erhielten randomisiert ein beschichtetes oder ein unbeschichtetes Implantat und wurden nicht infiziert. Klinisch, radiologisch und histologisch sollte die Verträglichkeit der Beschichtung untersucht werden. Bei keinem der Tiere waren über den Untersuchungszeitraum von sechs Wochen Störungen des Allgemeinbefindens zu beobachten. Die Blutwerte lagen bei allen Tieren im Referenzbereich. Die radiologischen Befunde waren lediglich dem mechanischen Reiz der Operation zuzuordnen. Auch histologisch ließen sich keine Anzeichen für eine Unverträglichkeit feststellen. Die bei der Implantation eines Biomaterials in den Knochen auftretende Gewebereaktion entspricht im wesentlichen den pathophysiologischen Vorgängen der Wundheilung nach einem Trauma. Durch das Operationstrauma entsteht ein Hämatom sowie nekrotisches Gewebe um das Implantat, worauf der Organismus mit einer klassischen Entzündungsreaktion antwortet (ANDERSON 1988). Die akute Entzündung ist durch das Auftreten eines eiweißreichen Exsudates mit poly-

morphkernigen Leukozyten gekennzeichnet. Später folgen diesen aus dem Blut Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen oder Histozyten differenzieren. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose von Fremdkörpern, Zellresten und nekrotischem Gewebe. Das fibrinöse Exsudat wird schließlich durch ein gefäßreiches Granulationsgewebe und schließlich fibröses Gewebe ersetzt (WHEATER et al. 1987; LENDLEIN 1999). Die chronische Entzündung ist morphologisch gekennzeichnet durch das Nebeneinander von akuter entzündlicher Exsudation und Organisation des Entzündungsprozesses. Die dominierenden Zellen sind dabei Lymphozyten und Plasmazellen als Träger der Immunantwort (WHEATER et al. 1987). Nach ANDERSON (1988) ist die Ausbildung von Granulationsgewebe und das vereinzelte Auftreten von Makrophagen und Fremkörperriesenzellen Teil der normalen Fremdkörperreaktion auf ein Implantat. Ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen spricht aber für eine Unverträglichkeit, was in der vorliegenden Studie nicht der Fall war. Die in beiden Vergleichsgruppen erhobenen Befunde wie das Auftreten chronischer Entzündungszellen, kleinerer Nekrosen, Histozyten, inhomogenes Mark und die Fibrosierung des Markraums treten im Rahmen reparativer Vorgänge auf. Da der linke Femur histologisch unauffällig erscheint, werden diese Befunde dem mechanischen Reiz der Operation zugeschrieben. MILLAR et al. (1990) untersuchten die Reaktion des Knochengewebes auf Schrauben aus Stahl und Titan am Hundemodell und erhielten ähnliche histologische Ergebnisse. Das in der vorliegenden Arbeit festgestellte feingewebliche Bild stimmt mit den Studien zur Verträglichkeit von Polylaktiden in der Literatur überein (GETTER et al. 1972; VISSCHER et al. 1985). SCHMIDT et al. (1995) implantierten gentamicinhaltige Poly-D,L-Laktid-Glykolid-Zylinder in die Rückenmuskulatur der Ratte und untersuchten das Freisetzungsverhalten von Gentamicin und die Gewebeverträglichkeit. Sie stellten ebenfalls Makrophagen und Histozyten in ihren Gewebeschnitten im Rahmen der Resorptionsvorgänge fest. Abweichend von den Ergebnissen in der Literatur werden in der vorliegenden Arbeit bei den Kaninchen mit beschichtetem Implantat in vier von sechs Fällen Ansammlungen von Rundzellen bemerkt. Diese werden als Zeichen für die Chronizität des Entzündungsvorganges und als Reaktion des Immunsystems gewertet.

Bei einem Tier in den eigenen Untersuchungen mit unbeschichtetem Implantat wurde der Heilungsverlauf durch eine Nahtdehiszenz beeinträchtigt. Im Röntgenbild konnten hier leichte sklerotische Veränderungen sowie histologisch Anzeichen einer chronischen Osteomyelitis festgestellt werden, obwohl das Tier nicht mit der Keimsuspension infiziert wurde. Als Ursache für diesen Befund ist hier das Übergreifen der Weichteilinfektion auf den Knochen zu sehen (WALDVOGEL et al. 1970; BURRI 1974).

Mögliche negative Auswirkungen der Beschichtung auf den Knochen oder den Gesamtorganismus konnten somit weder klinisch, radiologisch noch histologisch festgestellt werden. Sowohl das beschichtete als auch das unbeschichtete Implantat sind gut verträglich.

4.2.2 Osteomyelitisgruppe

Den Kaninchen dieser Gruppe wurde ein unbeschichteter oder gentamicinbeschichteter Hohl Nagel eingesetzt und die Markhöhle des Femurs mit 10^5 KBE Staphylococcus aureus infiziert. Die Verträglichkeit und Wirksamkeit der Beschichtung in der Prophylaxe einer bakteriellen Knocheninfektion sollte anhand eines Osteomyelitismodells überprüft werden. Die klinischen Anzeichen der Osteomyelitis waren bei den Kontrolltieren nur schwer fassbar. Acht von zehn Kontrolltieren entwickelten als Anzeichen einer Osteomyelitis Abszesse im Bereich des Trochanter major, aus denen der inokulierte Keim nachgewiesen wurde. Eindeutige Unterschiede im Allgemeinbefinden der beiden Vergleichsgruppen waren im Verlauf des Untersuchungszeitraum von acht Wochen nicht festzustellen. Bei den Kaninchen mit gentamicinbeschichtetem Implantat traten keine Abszesse auf.

Die Leukozytenwerte konnten in der vorliegenden Arbeit als eindeutiger und signifikanter Entzündungsparameter, im Gegensatz zu anderen Studien, nicht herangezogen werden (NORDEN 1970; EERENBERG et al. 1994). Ein deutlicher Anstieg über den Referenzbereich war bei den Kontrolltieren nur in der zweiten Woche nach der Operation festzustellen. Innerhalb des Normbereiches lagen die Leukozytenwerte bei den Kontrolltieren etwas höher. Die Werte der Tiere mit beschichtetem Implantat näherten sich gegen Ende des Untersuchungszeitraum wieder dem Wert vor der Operation an. Erythrozyten-, Hämatokrit- und Hämoglobinwerte entsprachen ebenfalls der Norm. Ein systemischer Gentamicinspiegel konnte bei den Tieren mit beschichtetem Implantat nicht festgestellt werden. Blutkulturen waren nur in einem Fall in der Kontrollgruppe positiv. Dieses Tier wurde aufgrund einer chronischen Sepsis euthanasiert.

Nach der Euthanasie der Tiere wurden von den explantierten Femora Röntgenaufnahmen angefertigt. Nur bei zwei Tieren konnten als radiologische Kriterien einer Osteomyelitis osteolytische und sklerotische Herde festgestellt werden. RODEHEAVER et al. (1983) konnten nach zwei Wochen röntgenologische Anzeichen einer Osteomyelitis bei den Kontrolltieren feststellen. FITZGERALD (1983), JACOB et al. (1991), ITOKAZU et al. (1997), CALHOUN und MADER (1997) sowie YAGMURLU et al. (1999) gelang dies ebenfalls.

DISKUSSION

In der vorliegenden Studie waren die röntgenologische Befunde in beiden Gruppen nur dem mechanischen Reiz der Operation zuzuschreiben.

Als problematisch erwies sich die mikrobiologische Diagnostik. Obwohl acht von zehn Tieren der Kontrollgruppe Abszesse ausbildeten, gelang ein Keimnachweis aus dem Femur und am Implantat nur bei vier dieser acht Tiere. Das Problem der Diagnostik stellt sich jedoch auch in der Humanmedizin bei Endoprotheseninfektionen oder subklinisch verlaufenden Osteomyelitiden. Hier fehlen oft klinische Entzündungsanzeichen (Fieber, schlechtes Allgemeinbefinden, Leukozytose) und auch der Nachweis von Bakterien kann nicht immer erbracht werden (ADLER 1983; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002). Rezidivierende Verläufe chronischer posttraumatischer Osteomyelitiden äussern sich ebenfalls häufig nur anhand einer lokalen Symptomatik (KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002). Die Diagnostik einer infizierten Endoprothese kann eine regelrechte Herausforderung darstellen, da keine der in der Humanmedizin angewendeten Untersuchungen (z. B. Erythrozytensenkungsreaktion, C-reaktives Protein, Gewebeproben für die mikrobiologische Untersuchung) zu 100 % sensitiv oder spezifisch für eine Infektion ist (SPANGEHL et al. 1998; SPANGEHL et al. 1999). Ein Keimnachweis durch Punktion gelingt nur in 60 % der Fälle (KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002). Ein Auftreten von Abszessen bei Endoprotheseninfektionen wird aber trotz möglicher klinisch unauffälliger Symptomatik als eindeutiges Infektionsanzeichen gewertet (SPANGEHL et al. 1998). Das Auftreten von Abszessen in dem eigenen Modell belegt damit, dass eine Infektion vorliegt. In der Gruppe der Kontrolltiere wurde *Staphylococcus aureus* bei acht von zehn Tieren aus Abszessmaterial, in vier Fällen neben Abszessmaterial auch aus dem Femur und am Implantat nachgewiesen. Die Keimnachweise der Kaninchen mit beschichtetem Implantat waren demgegenüber in neun von zehn Fällen negativ. Diese Tiere bildeten auch keine Abszesse aus. Anhand des Auftretens von Abszessen kann in dem eigenen Modell belegt werden, dass eine Infektion vorliegt und die Poly-D,L-Laktid-Gentamicin-Beschichtung von Osteosynthesematerialien die Infektionshäufigkeit signifikant um 90 % senkt.

Nur bei einem Tier mit frakturiertem Trochanter major und dadurch bedingtem instabilen Sitz des Implantats war der mikrobiologische Keimnachweis aus dem Femur positiv. Durch die Instabilität des Implantats im Femur wird ein ständiger chronischer Reiz ausgeübt, der das Infektgeschehen fördert und unterhält und das Immunsystem des Tieres zusätzlich schwächt, so dass die Beschichtung eine Infektion in diesem Fall nicht wirkungsvoll verhindern kann. Dieser Befund verdeutlicht zudem die Pathogenese der posttraumatischen Osteomyelitis. Instabilität und Infekt begünstigen und unterhalten sich stets gegenseitig, so dass das be-

troffene Knochenareal letztlich zu einem wenig resistenten und instabilen Hohlraumssystem wird, in dem die Wirksamkeit der zellulären wie humoralen körpereigenen Abwehr deutlich vermindert ist (KINZL und SUGER 1996).

Bei der Bewertung der histologischen Schnitte ist zu beachten, dass die Entzündungsreaktion als solche nicht eine spezifische Antwort des Organismus auf einen bestimmten Reiz darstellt, sondern in ihrem Ablauf für jeden Reiz gleich ist. Mechanische Reize oder chemische Noxen sind geeignet, am Knochengewebe die pathologisch-anatomischen Veränderungen einer Osteomyelitis hervorzurufen, die von einer bakteriellen Infektion nicht zu unterscheiden sind (KÖNN und POSTBERG 1970; PLAUE 1970). Die Abwehrlage des Organismus und der zeitliche Verlauf bestimmen als weitere Parameter die Ausprägung der Entzündungserscheinungen. In der vorliegenden Studie stellen das operative Trauma, das Setzen einer Knocheninfektion, die Beschichtung und nicht zuletzt die Abwehrlage des Organismus die Variablen dar, die Einfluss auf den unterschiedlichen Ausprägungsgrad der Entzündungserscheinungen nehmen. Histologisch ist im Übrigen ein Nebeneinander akuter und chronischer Osteomyelitisstadien möglich. Der Nachweis von Bakterien gelingt aber nur selten (ADLER 1983).

Makroskopisch erschien das Knochenmark bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den Tieren mit antiinfektiv beschichtetem Implantat bereits stark verändert, so dass eine positive Wirkung der Beschichtung bereits mit bloßem Auge erkennbar war.

Feingeweblich traten in beiden Gruppen ähnliche Erscheinungsbilder auf mit fibrin-durchtränkten Abschnitten, Nekrosen und Sequestern. Akute und chronische Osteomyelitismerkmale konnten damit in beiden Vergleichsgruppen festgestellt werden. In beiden Gruppen traten auch Übergangsformen auf, die weder einem akuten noch chronischen Stadium eindeutig zugeordnet werden konnten. Zwei Tiere der Kontrollgruppe waren sowohl klinisch als auch mikrobiologisch unauffällig. Histologisch konnten hier aber Anzeichen einer Osteomyelitis festgestellt werden, die bei einem der beiden Tiere aufgrund der ausgeprägten Fibrosierung des Markraums chronisch war.

Bei den sechs Tieren der Kontrollgruppe, die histologisch ausgewertet wurden, traten in drei Fällen bindegewebig abgegrenzte Markabszesse auf. Bei der Gruppe mit gentamicinbeschichtetem Implantat konnten keine Markabszesse festgestellt werden. Nur bei dem Tier mit instabilem Implantat, bei dem auch der mikrobiologische Keimnachweis positiv ausfiel, fand sich auch ein von fibrotischem Gewebe umgebener Markabszess. Anhand der Literatur lässt sich das Auftreten von Markabszessen als Infektionskriterium belegen (AN und FRIEDMAN 1998).

Ein Auftreten von akuten und chronischen Osteomyelitisstadien nebeneinander, trotz therapeutischer oder prophylaktischer Intervention, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt. DAROUICHE et al. (1998) untersuchten in einem Tibiafrakturmodell am Kaninchen die antiseptische Beschichtung von Kirschnerdrähten mit Chloroxylenol und Chlorhexidin. Sie stellten trotz negativem mikrobiologischem Befund der Gruppe mit beschichtetem Implantat ähnliche histopathologische Erscheinungsbilder im Vergleich mit der Kontrollgruppe fest. Auch radiologisch ließ sich kein eindeutiger Unterschied zwischen beiden Gruppen erkennen. NIE et al. (1998) untersuchten an einem Osteomyelitismodell am Kaninchen die Wirkung von antibiotikahaltigen Polymeren. Trotz erfolgreicher Therapie ließen sich histologisch noch Anzeichen einer Osteomyelitis feststellen.

In der vorliegenden Studie konnten in den Präparaten von fünf Tieren aus der Gruppe mit gentamicinbeschichtetem Implantat zellreiche Abschnitte neben Abschnitten mit zellarmem, „leerem“ Mark gerade in der unmittelbaren Implantatumgebung festgestellt werden. Diese Inhomogenität des Knochenmarks wird als Anzeichen für eine beginnende Chronizität des Entzündungsvorgangs und Beruhigung des Infektgeschehens gewertet.

In der Osteomyelitisgruppe wurden auch die linken Femora als unbehandelte Kontrolle histologisch untersucht. Im Sinne einer Herdinfektion sind pathologische Erscheinungen am linken unbehandelten Femur durchaus zu erwarten. Dabei wurden in der Kontrollgruppe im linken Femur Entzündungsanzeichen und bei einem Tier ein Markabszess festgestellt, während in der Gruppe mit beschichtetem Implantat das Knochenmark weitgehend unauffällig erschien. Durch die antibiotikahaltige Beschichtung wurde die Keimzahl reduziert, so dass letztlich weniger Keime endogen in den linken Femur gelangten und dort pathologische Veränderungen hervorriefen. Dieser Befund belegt ebenfalls die positive Wirkung der gentamicinhaltigen Beschichtung und geht mit der auch klinisch und mikrobiologisch belegten antiinfektiven Wirkung einher.

In der vorliegenden Studie lässt sich histologisch somit eine Tendenz zu einer Stabilisierung des Infektgeschehens bei den Tieren mit gentamicinbeschichtetem Implantat feststellen. Unverträglichkeitserscheinungen im Sinne einer vermehrten Fremdkörperreaktion wurden nicht festgestellt.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der Orthopädie, Unfallchirurgie und Endoprothetik werden im Zuge der modernen Medizin in zunehmendem Maße Implantate eingesetzt, die in Abhängigkeit vom Material aber auch

ihrem Design mit einer erhöhten Infektanfälligkeit behaftet sind (PETTY et al. 1985; MELCHER et al. 1994). In Verbindung mit metallischen Implantaten wird als häufigster Erreger *Staphylococcus aureus* bei Weichteilinfektionen und Osteomyelitiden isoliert (GRISTINA 1987; 1994). Bei einer Knocheninfektion nach einer Fraktur oder nach der Implantation einer Gelenkendoprothese kann es sich sowohl um eine akute hämatogene Besiedelung im Rahmen einer Bakteriämie handeln, oder um einen Spätinfekt und damit eine exogene Inokulation der Bakterien zum Zeitpunkt der Fraktur oder Operation (AN und FRIEDMAN 1996; KUTSCHA-LISSBERG et al. 2002). Nach KUTSCHA-LISSBERG et al. (2002) werden entsprechend der Empfehlung des Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) Erstmanifestationen von Infekten in Gegenwart von Implantaten innerhalb von 12 Monaten nach der Operation als exogen (nosokomial) gewertet. Die Grenzzone zwischen Implantat und Gewebe, das sogenannte Interface, stellt dabei stets den locus minoris resistenciae dar. Die sich hier abspielenden Vorgänge sind entscheidend für die erfolgreiche Einheilung eines Implantates. Ein Implantat bedeutet immer einen wesentlichen pathogenetischen Faktor zur Schwächung der wirtseigenen Infektabwehr (HEPPERT et al. 2002). Durch das Aufbringen der Beschichtung soll die Implantatoberfläche peri- und postoperativ wirkungsvoll geschützt, eine mögliche bakterielle Besiedelung bereits initial unterbunden, das wirtseigene Immunsystem unterstützt und der Einheilungsprozess des Implantats begünstigt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die abriebstabile, bioresorbierbare gentamicin-haltige Poly-D,L-Laktid-Beschichtung von Marknägeln geeignet ist, das Auftreten von Knocheninfektionen bei einer Keimdosis von 10^5 KBE am Kaninchenmodell signifikant zu reduzieren. Unverträglichkeitserscheinungen gegenüber der Poly-D,L-Laktid-Gentamicin-Kombination konnten in keiner der Versuchsgruppen festgestellt werden. Eine hohe lokale bakterizide Wirkung ist gerade in den ersten Stunden nach der Operation wichtig, um das empfindliche Interface zu schützen, was durch das Ergebnis der vorliegenden Studie bestätigt wurde. Der Effekt und die Wirksamkeit der lokalen Antibiotikatherapie und -prophylaxe lassen sich anhand zahlreicher Tiermodelle belegen (PETTY et al. 1985; EVANS und NELSON 1993; GARVIN et al. 1994; RIEGELS-NIELSEN et al. 1995; NIE et al. 1998; NICOLAU et al. 1998; KANELLAKOUPOULOU et al. 2000; GÜRSEL et al. 2001) und werden auch durch die vorliegende Studie bestätigt. An dem eigenen Modell könnte die Applikation der Bakteriensuspension durch einen zusätzlichen lateralen Zugang zum Femur besser standardisiert werden (EERENBERG et al. 1994).

DISKUSSION

Die Kaltbeschichtungstechnologie erlaubt ein maßgeschneidertes Einarbeiten von Wirkstoffen und damit eine Erweiterung des Anwendungsprofils für den Patienten. So könnte beispielsweise beim Prothesenwechsel je nach Antibiogramm eine gezielte Antibiotikaphylaxe im infektionsgefährdeten Implantatlager durchgeführt werden. Die Beschichtung wird sich damit gerade für Risikopatienten (Prothesenwechsel nach Vorinfekten, immunsupprimierte Patienten, Tumorendoprothesen) als wirkungsvolle Zusatzmaßnahme zur systemischen antibiotischen Abdeckung anbieten.

Die eigene Arbeitsgruppe versucht derzeit, diese Fragen praxisnah zu realisieren und verschiedene Anwendungsmöglichkeiten im klinischen Einsatz bei beschichteten zementfreien Endoprothesen und Osteosynthesematerialien vorzubereiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Knocheninfektionen zählen trotz moderner, perioperativer Antibiotikaphylaxe noch immer zu gefürchteten Komplikationen in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Der Initialschritt derartiger Infektionen liegt in der bakteriellen Besiedelung des Fremdmaterials.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine neue biodegradierbare, abriebstabile und antiinfektiv wirksame Poly-D,L-Laktid-Beschichtung mit integriertem Gentamicin zur Beschichtung von Osteosynthesematerialien zu überprüfen. In vitro sollte die Freisetzungskinetik von Gentamicin und in vivo die Verträglichkeit sowie die Wirksamkeit in der Verhinderung von Implantat assoziierten Osteomyelitiden untersucht werden.

Kommerzielle Stahlimplantate wurden unter aseptischen Bedingungen mit einer Kaltbeschichtungstechnologie beschichtet. Als Trägersubstanz diente dabei das Polymer Poly-D,L-Laktid Resomer® R203, in die das Antibiotikum Gentamicin in 10%-iger Konzentration (w/w) eingearbeitet wurde.

Das Freisetzungsverhalten von Gentamicin wurde in vitro über 96 Stunden getestet.

In der Biokompatibilitätsgruppe mit elf Kaninchen wurde den Tieren ein unbeschichtetes (n=5) oder ein beschichtetes (n=6) Implantat in den rechten Femur implantiert. Der Gentamicinspiegel im Serum wurde nach 12, 24, 48 Stunden sowie in wöchentlichen Abständen bestimmt. Die Opferung erfolgte nach sechs Wochen. Post mortem wurde der Femur geröntgt und histologisch untersucht.

In einer zweiten Gruppe von 20 Tieren wurde die Markhöhle nach Implantation eines beschichteten (n=10) oder unbeschichteten (n=10) Implantats mit 10^5 KBE Staphylococcus aureus infiziert. Klinischer Verlauf und der Gentamicinspiegel im Serum wurden analog zur ersten Gruppe kontrolliert. Die Opferung erfolgte nach acht Wochen. Post mortem wurden die Femora röntgenologisch, mikrobiologisch und histologisch untersucht.

Das in die Beschichtung integrierte Antibiotikum Gentamicin zeigte eine kontinuierliche Freisetzung über 96 Stunden mit einer hohen Freisetzungsrate während der ersten 24 Stunden. In der Biokompatibilitätsgruppe waren keine negativen Auswirkungen der Beschichtung auf den Knochen feststellbar.

In der Osteomyelitisgruppe entwickelten alle Kontrolltiere Abszesse sowie histologische Anzeichen einer Osteomyelitis.

Bei den Kaninchen mit gentamicinbeschichtetem Implantat wurden bei neun von zehn Tieren keine Abszesse festgestellt. Histologische Anzeichen der Infektion waren vermindert.

ZUSAMMENFASSUNG

Klinisch und röntgenologisch konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

In dem von uns durchgeführten Tiermodell mit einer Infektionsdosis von 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* war das Auftreten Implantat assoziierter Knocheninfektionen unter Verwendung Gentamicin-Poly-D,L-Laktid-beschichteter Marknägel signifikant reduziert.

Die Anwendung einer gentamicinhaltigen Poly-D,L-Laktid-Beschichtung könnte somit eine sinnvolle Ergänzung für die Prophylaxe Implantat assoziierter Infektionen in der Orthopädie und Unfallchirurgie sein.

6 SUMMARY

Induction and prophylaxis of implant-related bone infections using an antibacterial-coated intramedullary nail – an experimental rabbit model

Despite modern peri-operative antimicrobial prophylaxis, bone infections still represent dangerous complications in orthopedic and trauma surgery. Bacterial colonization of implanted material is the first step in pathogenesis of these infections.

The objective of this study was to evaluate the effectiveness from a new biodegradable, stable, antibacterial gentamicin-loaded poly-(D,L-lactide) (PDLLA) coating of orthopedic devices. In vitro, elution kinetics of gentamicin and furthermore, biocompatibility and effectiveness in preventing implant-related osteomyelitis should be studied in vivo.

Coating of commercial steel implants was performed by a so-called cold coating technique under aseptic conditions. The carrier was the polymer poly-(D,L-lactide) Resomer® R 203 and gentamicin was incorporated in a 10 % (w/w) concentration.

Release kinetics of gentamicin were tested in vitro for 96 hours.

To study the biocompatibility, in a group of eleven rabbits nails uncoated (n=5) or nails coated with PDLLA and gentamicin (n=6) were implanted into the femur. Serum gentamicin was determined after 12, 24, 48 hours and then weekly. Follow-up was six weeks. After sacrifice the femora were examined by histologic and radiologic means.

In a second group of 20 rabbits, the medullary cavities of femora were contaminated with 10^5 CFU *Staphylococcus aureus* after implantation of uncoated (n=10) or coated (n=10) nails. Serum gentamicin, blood samples and clinical presentation were examined. Follow-up was eight weeks. After sacrifice the femora were evaluated by microbiological, histological and radiological analysis.

The incorporated gentamicin was released continuously over a period of at least 96 hours with an initial peak of release in the first 24 hours.

In the biocompatibility group, radiological and histological studies revealed no adverse effects on bone contributed to the PDLLA coating.

In the osteomyelitis group, all controls developed abscesses and histological signs of osteomyelitis.

In nine of ten rabbits which had an implant coated with gentamicin abscesses were not detected. Histological signs of infection were reduced. No significant differences in clinical and radiological presentation were observed between the groups.

SUMMARY

In our animal model with an infective dosis of 10^5 CFU *Staphylococcus aureus*, local application of nails coated with PDLLA and gentamicin significantly reduced implant-related bone infections. The use of the gentamicin-PDLLA-coating could be an effective supplement for prophylaxis of implant-related infections in orthopedic and trauma surgery.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adler, C.-P.

Knochenentzündung.

In: Adler C. P. (Hrsg.): Knochenkrankheiten. Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. Thieme Verlag Stuttgart, 1983: 101-127

Adler, C.P., Riede, U.-N.

Entzündliche Läsionen. Osteomyelitis.

In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E- (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1993: 1126-1129

An, Y.H., Friedman, R.J.

Prevention of sepsis in total joint arthroplasty.

J Hosp Inf 1996, 33: 93-108

An, Y., Friedman, R.

Animal models of orthopedic implant infection.

J Invest Surg 1998, 11:139-146

Anders, A., Anders, S., Gatermann, S.G.

Mikrobiologische Diagnostik und Antibiotikatherapie der Osteitis.

Trauma Berufskrankh 2002, 4: 314-320

Anderson, J.M.

Inflammatory response to implants.

Am Soc Artif Intern Organs Trans 1988, 34: 101-107

Andriole, V.T., Nagel, D.A., Southwick, W.O.

A paradigm for human chronic osteomyelitis.

J Bone Joint Surg 1973, 55-A: 1511-5

Arden, S.

The pathology of osteomyelitis.

J Am Pod Ass, 1977, 67: 702-705

Arens, S.

Osteitis-Immer noch ein Problem?

Trauma Berufskrankh 2002, 4: 295-296

Arens, S., Schlegel, U., Printzen, G., Ziegler, W., Perren, S.M., Hansis, M.

Influence of materials for fixation implants on local infection.

J Bone Joint Surg 1996, 78-B:647-651

Ascherl, R., Stemberger, A., Lechner, F., Blümel, G.

Lokale Infektbehandlung mit Kollagen-Gentamicin.

In: Burri, C., Neugebauer, R. (Hrsg.): Infektion von Knochen und Gelenken. Huber Verlag, Bern, 1989 (Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie; Bd. 34), 67-75

Athanasiou, K.A., Agrawal, C.M., Barber, F.A., Burkhart, S.S

Current concepts. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers.

Arthroscopy 1998, 14: 726-737

Baier, R.E., Meyer, A.E., Natiella, J.R., Natiella, R.R., Carter, J.M.

Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results.

J Biomed Mat Res 1984, 18: 337-355

Bauer, T.W., Schils, J.

The pathology of total joint arthroplasty. II. Mechanisms of implant failure.

Skeletal Radiol 1999, 28: 483-497

Belmatoug, N., Crémieux, A. C., Bleton, R., Volk, A., Saleh-Mghir, A., Grossin, M., Garry, I., Carbon, C.

A new model of experimental prosthesis joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization.

J Infect Dis 1996, 174: 414-417

Bengtson, S.

Prosthetic osteomyelitis with special reference to the knee: risks, treatment and costs.

Ann Med 1991, 25: 523-529

Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W.

Understanding bacterial biofilms.

Elsevier Science Publishers Ltd (UK), 1991

Blomgren, G., Lindgren, U.

Late hematogenous infection in total joint replacement: studies of gentamicin and bone cement in the rabbit.

Clin Orthop 1981, 155: 244-248

Böhm, E.

Unterschiedliche Merkmale der hämatogenen, posttraumatischen und fortgeleiteten Osteomyelitis.

Unfallchirurg, 1987, 90: 59-66

Buchholz, H.W., Engelbrecht, H.

Über die Depotwirkung einiger Antibiotica bei der Vermischung mit dem Kunstharz Palacos.

Chirurg 1970, 41: 511-515

Buret, A., Ward, K.H., Olson, M.E., Costerton, J.W.

An in vivo model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces.
J Biomed Mat Res 1991, 25: 865-874

Burri, C.

Posttraumatische Osteitis.

In: Saegesser, M. (Hrsg): Aktuelle Probleme in der Chirurgie, Bd. 18, Huber Verlag, Bern, 1974: 73-84, 94-98, 127-128, 169-176

Calhoun, J.H., Mader, J.T.

Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant.

Clin Orthop 1997, 341: 206-214

Clasper, J.C., Parker, S.J., Simpson, W., Watkins, P.E.

Contamination of the medullary canal following pin-tract infection.

J Orthop Res 1999, 17: 947-952

Contzen, H

Abakterielle Osteitis durch Metallose.

In: Hierholzer, G., Rehn, J. (Hrsg.): Posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970: 35-38

Cordero, J., Munuera, L., Folgueira, M.D

Influence of metal implants on incidence of infection: an experimental study in rabbits.

J Bone Joint Surg 1994, 76-B:717-720

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.

Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.

Science 1999, 284: 1318-1322

Cunningham, R., Cockayne, A., Humphreys, H.

Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of Staphylococcus aureus bone and joint infections.

J Med Microbiol 1996, 44: 157-64

Dahners, L.E., Funderburk, C.H.

Gentamicin-loaded plaster of paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits.

Clin Orthop 1987, 219: 278-282

Darouiche, R.O., Farmer, J., Chaput, C., Mansouri, M., Saleh, G., Landon, G.C.

Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails.

J Bone Joint Surg 1998, 80-A: 1336-1340

Davis, N., Curry, A., Gambhir, K., Panigrahi, H., Walker, C.R.C., Wilkins, E.G.L., Worsley, M.A., Kay, P.R.

Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement.
J Bone Joint Surg 1999, 81-B: 886-889

De Lalla, F.

Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications.
J Chemotherapy 1999, 11: 440-445

DeJong, E.S., DeBerardino, T.M., Brooks, D.E., Nelson, B.J., Campbell, A.A., Bottoni, C.R., Pusateri, A.E., Walton, R.S., Guymon, C.H., McManus, A.T.

Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatite-chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model.
Trauma 2001, 50: 1008-1014

Eerenberg, J.P., Patka, P., Haarman, H.J., Dwars, B.J.

A new model for posttraumatic osteomyelitis in rabbits.
J Invest Surg 1994, 7: 453-465

Eiff v., C., Bettin, D., Proctor, R.A., Rolaufts, B., Lindner, N., Winkelmann, W., Peters, G.

Recovery of small colony variants of Staphylococcus aureus following Gentamicin bead placement for osteomyelitis.
Clin Inf Dis 1997, 25: 1250-1251

Eiff v., C., Lindner, N., Proctor, R.A., Winkelmann, W., Petres, G.

Auftreten von Gentamicin-resistenten Small Colony Variants von S. aureus nach Einsetzen von Gentamicin-Ketten bei Osteomyelitis als mögliche Ursache für Rezidive.
Z Orthop 1998, 136: 268-271

Elek, S.D., Conen, P.E.

The virulence of Staphylococcus pyogenes for man: a study of the problems of wound infection.
Br J Exp Pathology 1957, 38: 573-586

Estler, C.-J.

Aminoglykoside.
In: Estler, C.-J. (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie. Lehrbuch für Studierende der Medizin, Pharmazie und Naturwissenschaften., Schattauer Verlag, Stuttgart, 2000: 613-615

Evans, R.P., Nelson, C.L

Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis.
Clin Orthop 1993, 295: 37-42

Fitzgerald, R.H.

Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis.

J Bone Joint Surg 1983, 65-B: 371-380

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie – Aminoglykoside.

In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996: 708-713

Garvin, K.L., Miyano, J.A., Robinson, D., Giger, D., Novak, J., Radio, S.

Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis.

J Bone Joint Surg 1994, 76-A: 1500-1506

Gerhart, T.N., Roux, R.D., Hanff, P.A., Horowitz, G.L., Renshaw, A.A., Hayes, W.C.

Antibiotic-loaded biodegradable bone cement for prophylaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats.

J Orthop Res 1993, 11: 250-255

Getter, L., Cutright, D.E., Bhaskar, S.N., Augsberg, J.K.

A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures.

J Oral Surg 1972, 30: 344-348

Gollwitzer, H.

Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate. Mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie.

Med. Diss. TU München, 2002

Gomer, R.

Surface diffusion.

Sci Am 1982, 247: 98-109

Gracia, E., Laclériga, A., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza C., Amorena B.

Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms.

J Surg Res 1998, 79: 146-153

Gristina, A.G., Oga, M., Webb, L., Hobgood, C.

Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis.

Science 1985, 228: 990-993

Gristina, A.G.

Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.
Science 1987, 237: 1588-1595

Gristina, A.G., Naylor, P.T., Myrvik, N.

Mechanisms of musculoskeletal sepsis.
Orthop Clin North Am, 1991, 22: 363-371

Gristina, A.G.

Implant Failure and the Immuno-Incompetent Fibro-Inflammatory Zone.
Clin Orthop 1994, 298: 106-18

Gürsel, I., Korkusuz, F., Türesin, F., Alaeddinoglu, N.G., Hasirci, V.

In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis.
Biomaterials 2001, 22: 73-80

Gustilo, R.B., Merkow, R.L., Templeman, D.

The management of open fractures
J Bone Joint Surg 1990, 72-A: 299-304

Habash, M., Reid, G.

Microbial biofilms: their development and significance for medical-device related infections.
J Clin Pharmacol, 1999, 39: 887-898

Häußler, S.

Morphologische Varianten bakterieller Erreger und chronische Infektionen.
Die gelben Hefte, 2003, Suppl.2: 17-24

Heitemeyer, U., Hax, P.-M.

Wirtschaftliche Aspekte bei der Knocheninfektion.
In: Burri, C., Neugebauer, R. (Hrsg.): Infektionen von Knochen und Gelenken. Prophylaxe-Therapie-soziale, wirtschaftliche und rechtliche Aspekte. Huber Verlag, Stuttgart, 1990: 162-164

Heppert, V., Wagner, C., Glatzel, U., Wentzensen, A.

Prinzipien der operativ-chirurgischen Therapie der Osteitis.
Trauma Berufskrankh 2002, 4: 321-328

Herrmann, M., Vadaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, D.P. Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Waldvogel, F.A.

Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material.
J Infect Dis 1988, 158: 693-701

Hollinger, J.O.,

Preliminary report on the osteogenetic potential of a biodegradable copolymer of polylactid (PLA) and polyglycolide (PGA).

J Biomed Mat Res 1983, 17: 71-82

Itokazu, M., Ohno, T., Tanemori, T., Wada, E., Kato, N., Watanabe, K.

Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats.

J Med Microbiol 1997, 46: 779-783

Jacob, E., Setterstrom, J.A., Bach, D.E., Heath, J.R., McNiesh, L.M, Cierny, G.

Evaluation of biodegradable Ampicillin anhydrate microcapsules for local treatment of experimental staphylococcal osteomyelitis.

Clin Orthop 1991, 267: 237-244

Josefsson, G., Gudmundsson, G., Kolmert, L., Wijkström, S.

Prophylaxis with systemic antibiotics versus Gentamicin bone cement in total hip arthroplasty: A five-year survey of 1688 hips.

Clin Orthop 1990, 253: 173-178

Kanellakopoulou, K., Halamakis, N., Giamarellos-Bourboulis, E.V., Rifotis, C., Papakostas, K., Andreopoulos, A., Dounis, E., Karagianakos, P., Giamarellou, H.

Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staph. aureus with a biodegradable system of lactid acid polymer releasing pefloxacin

J Antimicrob Chemotherap 2000, 46: 311-314

Kinzl, L., Fleischmann W.

Knocheninfektionen.

In: Jäger, M., Wirth, C.J. (Hrsg.): Praxis der Orthopädie; Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1992, 576-592

Kinzl, L., Suger, G.

Infizierte Pseudarthrose.

Orthopäde 1996, 25: 478-483

Klemm, K.

Lokale Infektbehandlung mit Gentamicin-PMMA-Ketten und –Miniketten

In: Burri, C., Neugebauer, R. (Hrsg.): Infektion von Knochen und Gelenken; Huber Verlag, Bern, Stuttgart, Toronto 1989 (Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie; Bd. 34), 47-59

Könn, G., Postberg, B

Zur Abgrenzung der posttraumatischen Osteomyelitis gegenüber anderen Knocheninfektionen vom Standpunkt des Pathologen.

In: Hierholzer, G., Rehn, J. (Hrsg.): Posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York (1970), 3-10

Korkusuz, F., Uchida, A., Shinto, Y., Araki, N., Inoue, K., Ono, K.

Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites.

J Bone Joint Surg 1993, 75-B: 111-114

Kulkarni, R.K., Moore, E.G., Hegyeli, A.F.

Biodegradable poly (lactid acid) polymers.

J Biomed Mat Res 1971, 5: 169-181

Kutscha-Lissberg, F., Hebler, U., Kälicke, T., Wingenfeld, C., Arens, S.

Inzidenz, Diagnose, Manifestations- und Verlaufsformen der Osteitis.

Trauma Berufskrankh 2002, 4: 297-305

Laurencin, C., Lane, J.M.

Poly(lactid acid) and Poly(glycolic acid): orthopaedic surgery applications.

In: Brighton C., Friedlaender G., Lane, J.M. (Hrsg.) Rosemont: Am Acad Orthop Surg 1994, 325-339

Lendlein, A.

Polymere als Implantatwerkstoffe.

Chemie in unserer Zeit, 1999, 33: 279-295

Lew, D.P., Waldvogel, F.A.

Current concepts: osteomyelitis.

N Engl J Med 1997, 336: 999-1007

Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B., Smith, J.K., Lambe, D.W., Costerton, J.W.

Bacterial adherence and glycocalix formation in osteomyelitis experimentally induced with Staph. aureus.

Inf Im 1984, 43: 825-833

Melcher, G.A., Claudi, B., Schlegel, U., Perren, S.M., Printzen, G., Munzinger, J.

Influence of type of medullary nail on the development of local infection: an experimental study of solid and slotted nails in rabbits.

J Bone Joint Surg 1994, 76-B:955-9

Middleton, J.C., Tipton, A. J.

Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices.

Biomaterials 2000, 21: 2335-2346

Millar, B.G., Frame, J.W., Browne, R.M.

A histological study of stainless steel and titanium screws in bone.

Br J Oral Surg 1990, 28: 92-95

Naylor, P.T., Myrvik, Q.N., Gristina, A.

Antibiotic resistance of biomaterial-adherent coagulase-negative and coagulase-positive Staphylococci.

Clin Orthop 1990, 261: 126-133

NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards.

MIC Interpretive Standards for Staph. spp..

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; NCCLS, Wayne, Pennsylvania, 5. Auflage, 2000: 22-26

Neugebauer, A.

Therapie der akuten Osteitis.

In: Burri, C., Neugebauer, R. (Hrsg.): Infektionen von Knochen und Gelenken. Prophylaxe-Therapie-soziale, wirtschaftliche und rechtliche Aspekte. Huber Verlag, Stuttgart, 1990: 39-43

Nicolau, D.P., Nie, L., Tessier, P.R., Kourea, H.P., Nightingale, C.H.

Prophylaxis of acute osteomyelitis with absorbable Ofloxacin-impregnated beads.

Antimicrob Agents Chemother 1998, 42: 840-842

Nie, L., Nicolau, D.P., Tessier, P., Kourea, H.P., Browner, B.D., Nightingale, C.H.

Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of Ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment.

J Orthop Res 1998, 16: 76-79

Nijhof, M. W., Stallmann, H. P., Vogely, H. C., Fleer, A., Schouls, L. M., Dhert, W. J. A., Verbout, A.

Prevention of infection with tobramycin-containing bone cement or systemic cefazolin in an animal model.

J Biomed Mater Res (2000), 52: 709-715

Norden C.W.

Experimental osteomyelitis. I. Description of a model.

J Infect Dis 1970, 122: 410-418

Päivarinta, U., Böstman, O., Majola, A., Toivonen, T., Törmälä, P., Rokkanen, P.

Intraosseous cellular response to biodegradable fracture fixation screws made of polyglycolide or polylactide.

Arch Orthop Trauma Surg 1993, 112: 71-74

Passl, R., Müller, Ch., Zielinski, C.C., Eibl, M.M.

A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs.
Trauma 1984, 24(4): 323-326

Perdreau-Remington, F., Stefanik, D., Peters, G., Ludwig, C., Rütt, J., Wenzel, R., Pulverer, G.

A four-year prospective Study on microbial ecology of explanted prosthetic hips in 52 patients with „aseptic“ prosthetic joint loosening.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996, 15:160-165

Petty, W., Spanier, S., Shuster J.J., Silverthorne, C.

The incidence of skeletal implants on incidence of infection: experiments in a canine model.
J Bone Joint Surg 1985, 67-A:1236-1244

Pitt, C.G., Gratzl, M.M., Kimmel, G.L., Surles, J., Schindler, A.

Aliphatic polyesters II. The degradation of poly(DL-lactide), poly(e-caprolactone) and their copolymers in vivo.
Biomaterials 1981, 2: 215-220

Plaue, R.

Über die Beziehung zwischen Ursachen und Morphologie der exogenen Osteomyelitis.
In: Hierholzer, G., Rehn, J. (Hrsg.): Posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1970: 25-30

Plaue, R.

Maßnahmen zum Nachweis des Erregerspektrums.
In: Cotta, H., Braun, A. (Hrsg.): Knochen- und Gelenkinfektionen. Diagnose und Therapie. 5. Heidelberger Orthopädie-Symposium. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo 1988, 31-36

Remmele, W.

Entzündliche Knochenerkrankungen.
In: Remmele, W. (Hrsg.): Pathologie 3. Berlin: Springer Verlag, 1984, 671-688

Riegels-Nielsen, P., Espersen, F., Rosenkrantz Hölmich L., Frimodt-Møller, N.

Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection.
Acta Orthop Scand 1995, 66 (1): 69-72

Rissing, J.P., Buxton, T.B., Weinstein, R.S., Shockley, R. K.

Model of experimental osteomyelitis in rats.
Infect Immun 1985: 581-586

Rodeheaver, G.T., Rukstalis, D., Bono, M., Bellamy, W.

A new model of bone infection used to evaluate the efficacy of antibiotic-impregnated polymethylmetacrylate cement.

Clin Orthop 1983, 178: 303-11

Sanzén, L., Linder, L.

Infection adjacent to titanium and bone cement implants: an experimental study in rabbits.

Biomaterials 1995, 16: 1273-1277

Schakenraad, J.M., Dijkstra, P.J.

Biocompatibility of Poly (DL-lactid acid/glycine) copolymers.

Clin Materials 1991, 7: 253-269

Schauwecker, F., Weller, S.

Ursachen der knöchernen Infektion nach Osteosynthesen.

In: Hierholzer, G., Rehn, J. (Hrsg.): Posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1970: 31-34

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M.

Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors.

J Biomed Mater Res Appl Biomat 2001a, 58: 449-455

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N.P., Raschke, M.

Local application of growth factors (IGF-I and TGF- β 1) from a biodegradable

poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats.

Bone 2001b, 28: 341-350

Schmidt, C., Wenz, R., Nies, B., Moll, F.

Antibiotic in vivo/in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactid acid polymers and copolymers.

J Contr Rel, 1995, 37: 83-94

Schulz, S., Steinhart, H., Mutters, R.

Chronic osteomyelitis in a new rabbit model.

J Invest Surg 2001, 14: 121-131

Schurman, D.J., Trindade, C., Hirshman, H.P., Moser, K., Kayiyama, G., Stevens, P.

Antibiotic-acrylic bone cement composites: studies of gentamicin and palacos.

J Bone Joint Surg 1978, 60-A: 978-84

Schweiberer, L.

Behandlungsmaßnahmen bei der akuten posttraumatischen Knocheninfektion.

In: Hierholzer, G., Rehn, J. (Hrsg.): Posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1970: 73-78

Southwood, R.T., Rice, J.L., McDonald, P.J., Hakendorf, P.H., Rozenbils, M.A.

Infection in experimental hip arthroplasties.

J Bone Joint Surg 1985,37-B: 229-231

Spanghel, M.J., Younger, A.S.E., Masri, B.A., Duncan, C.P.

Diagnosis of infection following total hip arthroplasty.

AAOS Instructional Course Lectures, 1998, 47: 285-295

Spanghel, M.J., Masri, B.A., O'Connell, J.X., Duncan, C.P.

Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties.

J Bone Joint Surg 1999, 81-A: 672-683

Stemberger, A., Grimm, H., Bader, F., Rahn, H.D., Ascherl, R.

Local treatment of bone and soft tissue infections with the Collagen-gentamicin Sponge.

Eur J Surg 1997, Suppl 578: 17-26

Suganuma, J., Alexandar, H.

Biological response of intramedullary bone to poly(L-lactid acid).

J Appl Biomater 1993, 4: 13-27

Thoma, K., Schlütermann, B.

Biodegradierbare Polymere als Retardierungsprinzip für Arzneistoffe.

Pharmazie 1991, 46: 821-830

Verheyen, C.C.P.M., de Wijn, J.R., van Blitterswijk, C.A., Rozing, P.M., de Groot, K.

Technical note. Examination of efferent lymph nodes after 2 years of transcortical implantation of poly (L-lactide) containing plugs: a case report.

J Biomed Mat Res, 1993, 27: 1115-1118

Visscher, G.E., Robinson, R.L., Maulding, H.V., Fong, J.W., Pearson, J.E., Argentieri, G.J.

Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules.

J Biomed Mat Res 1985, 19: 349-365

Waldvogel, F.A., Medoff, G., Swartz M.N.

Osteomyelitis. A review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects.

N Engl J Med 1970, 282: 198-206; 260-266

Webb, L.X., Holman, J., de Araujo, B., Zaccaro, D.J., Gordon, E.S.

Antibiotic resistance in Staphylococci adherent to cortical bone.

J Orthop Trauma 1994, 8: 28-33

Whelton, A.

The aminoglycosides.

Clin Orthop 1984, 190: 66-74

Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Stevens, A., Love, J.S.

Skelettsystem.

In: Wheeler, P.R., Burkitt, H.G., Stevens, A., Love, J.S., Cremer, H. (Hrsg.): Grundlagen der Histopathologie, Atlas und Lehrbuch; Enke Verlag, Stuttgart, 1987, 2-19

Winckler, S., Brug, E., Meffert, R., Teupe, C., Ritzerfeld, W., Törmälä, P.

Resorbierbare Antibiotikumträger zur lokalen Behandlung der chronischen Osteitis-Polyglykolsäure/Poly-L-Laktid als Träger. Experimentelle Untersuchungen in vitro. Langenbecks Arch Chir 1992, 377: 112-117

Worlock, P., Slack, R., Harvey, L., Mawhinney R.

An experimental model of post-traumatic osteomyelitis in rabbits.

Br J Exp Pathol 1988, 69: 235-44

Wörsdörfer, O.

Die Spül Drainage in der lokalen Infektbehandlung an Knochen und Gelenk.

In: Burri, C., Neugebauer, R. (Hrsg.): Infektion von Knochen und Gelenken; Huber Verlag, Bern, Stuttgart, Toronto 1989 (Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie; Bd. 34), 38-46

Yagmurlu, M.F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Örs, Ü., Hasciri, V.

Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related osteomyelitis.

J Biomed Mater Res 1999, 46: 494-503

8 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Modelle zur Infektion von Gelenkendoprothesen beim Kaninchen | 4 |
| Tabelle 2: Modelle zur Pin-Tract-Infektion beim Schaf | 5 |
| Tabelle 3: Tiermodelle zur Osteomyelitispathogenese | 6 |
| Tabelle 4: Modelle zur chronischen posttraumatischen Osteomyelitis unter Berücksichtigung verschiedener Implantatmaterialien | 8 |
| Tabelle 5: Osteomyelitismodelle mit metallischen Implantaten und nachfolgender Therapie .. | 9 |
| Tabelle 6: Weitere Osteomyelitismodelle mit nachfolgender Therapie..... | 11 |
| Tabelle 7: Versuchsplan zur Biokompatibilität der Beschichtung – Gruppe 1 | 29 |
| Tabelle 8: Versuchsplan zum Osteomyelitismodell – Gruppe 2..... | 29 |
| Tabelle 9: Infektionsdosis in der Osteomyelitisgruppe..... | 30 |
| Tabelle 10: Freisetzung von Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$) im Versuchszeitraum von 96 Stunden (Reihe A bzw. B = Beschichtungsansatz; I, II, III, IV = Elution mit drei Implantaten)... | 37 |
| Tabelle 11: Gentamicin Elution in μg pro Versuchsansatz mit drei Marknägeln..... | 37 |
| Tabelle 12: Übersicht zur Biokompatibilitätsgruppe – Kaninchen-Nr. | 39 |
| Tabelle 13: Übersicht zur Osteomyelitisgruppe – Kaninchen-Nr. | 39 |
| Tabelle 14: Infektionsdosis in der Osteomyelitisgruppe..... | 40 |
| Tabelle 15: Mikrobiologische Auswertung der Kontrolltiere (+ bzw. positiv entspricht dem Nachweis des inokulierten <i>Staphylococcus aureus</i>)..... | 49 |
| Tabelle 16: Mikrobiologische Auswertung der Osteomyelitisgruppe mit Gentamicin beschichtetem Implantat..... | 50 |
| Tabelle 17: Überblick über die histomorphologischen Stadien in der Kontrollgruppe | 52 |
| Tabelle 18: Überblick über die histomorphologischen Stadien in der Osteomyelitisgruppe mit Gentamicin beschichtetem Implantat | 54 |

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gebohrter Hohnagel als Modell für einen Verriegelungsnagel 26

Abbildung 2: Darstellung des implantierten Hohnagels unter Röntgendurchleuchtung
(Philipps BV 25, Fa. Philipps, München)..... 32

Abbildung 3: Grafische Darstellung der Freisetzung von Gentamicin in Reihe B für den
Versuchsansatz mit drei Marknägeln 38

Abbildung 4: Leukozytenwerte der Biokompatibilitätsgruppe 42

Abbildung 5: Erythrozytenwerte der Biokompatibilitätsgruppe 42

Abbildung 6: Hämatokritwerte der Biokompatibilitätsgruppe..... 43

Abbildung 7: Hämoglobinwerte der Biokompatibilitätsgruppe..... 43

Abbildung 8: Leukozytenwerte der Osteomyelitisgruppe 46

Abbildung 9: Erythrozytenwerte der Osteomyelitisgruppe 46

Abbildung 10: Hämatokritwerte der Osteomyelitisgruppe 47

Abbildung 11: Hämoglobinwerte der Osteomyelitisgruppe 47

Abbildung 12: Osteolytischer Herd (→) bei einem Tier der Osteomyelitisgruppe
(unbeschichtetes Implantat und Infektion)..... 48

Abbildung 13: Akute Osteomyelitis bei einem Tier mit unbeschichtetem Implantat, mit
dichten Ansammlungen leukozytärer Zellen (LZ) und Fibrinexsudationen (FE)
(H.E.-Färbung, x80)..... 53

Abbildung 14: Chronische Osteomyelitis bei einem Tier mit unbeschichtetem Implantat, mit
deutlicher Fibrosierung des Markraums (MF), kaum mehr zelluläre Infiltrate,
kernarmes Gewebe, Fettzellen (FZ) (Elastica van Gieson, x80)..... 53

Abbildung 15: Unverändertes Knochenmark (hämatopoetisches Knochenmark, Fettzellen) bei
einem Tier mit Gentamicin-Poly-D,L-Laktid-beschichtetem Implantat (H.E.-
Färbung, x80)..... 55

Abbildung 16: Inhomogenes Knochenmark mit zelldichten Bereichen (dichte Ansammlungen
von Entzündungszellen und Fibrinexsudationen) und zellarmem Fettmark
(FM) (H.E.-Färbung, x80) 56

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| d | Tag |
| dl | Deziliter |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| E. coli | Escherichia coli |
| Fa. | Firma |
| i.m. | intramuskulär |
| i.v. | intravenös |
| H.E. | Hämalaun Eosin |
| Hb | Hämoglobin |
| Hkt | Hämatokrit |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| KG | Kommanditgesellschaft |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| MIC | minimal inhibitorische Konzentration |
| Mio. | Million |
| µm | Micrometer |
| µl | Microliter |
| mg | Milligramm |
| mm | Millimeter |
| ml | Milliliter |
| nm | Nanometer |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PMMA | Polymethylmetacrylat |
| s.c. | subkutan |
| Staph. aureus | Staphylococcus aureus |
| Staph. epidermidis | Staphylococcus epidermidis |
| Tab. | Tabelle |
| v.a. | vor allem |

11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. R. Köstlin danke ich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. B. Gänsbacher für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München anfertigen zu können.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die stets gewährte freundliche Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, der Anfertigung dieser Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts danken.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Stemberger für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Beratung und fachliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie, die Mithilfe bei der Beschichtung der Implantate und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Weiterhin möchte ich ganz besonders herzlich Frau Dr. med. vet. B. Eißner für die Durchsicht des Manuskripts, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und Beratung und die allzeit aufmunternden Worte danken.

Frau Dr. med. vet. M. Schmeller danke ich für ihre engagierte Unterstützung bei der Konzeption dieser Studie und Auswertung der histologischen Präparate. Frau S. Ganz und Frau C. Heinze danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate und die allzeit aufmunternden Worte.

Frau V. Vadou danke ich herzlich für die stets gewährte freundliche Hilfe bei der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Mitdotorandin Frau E. Kennerknecht, ohne deren gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung die reibungslose Durchführung der Tierversuche nicht möglich gewesen wäre. Allen anderen Doktoranden, die mir an den Operationstagen hilfreich zur Seite standen, sei an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

DANKSAGUNG

Den OP-Schwestern Frau B. Pichotka, Frau V. Pohlheimer und Frau R. Hertel sowie den Tierpflegern Frau R. Bergmaier, Frau I. Kratzer, Herrn St. Wallasch und Herrn H. Ebner danke ich ganz besonders herzlich, da ohne ihre Mithilfe die Durchführung dieses Versuchs nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. med. H. Gollwitzer, der jederzeit für Rückfragen zur Verfügung stand, sei ebenfalls herzlich gedankt.

Herrn W. Regnet und Herrn G. Gürtner gilt mein herzlicher Dank für das aufwendige Bohren der Implantate. Bei Frau S. Brand und Herrn V. Riedl möchte ich mich herzlich für die Mithilfe bei der Beschichtung der Implantate bedanken. Allen übrigen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums Rechts der Isar danke ich für ihre Unterstützung und stets aufmunternden Worte sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. med. Richter und allen Mitarbeitern des Walter-Straub-Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterbringung der Kaninchen.

Herrn Prof. Dr. med. vet. K. Osterkorn danke ich für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin danke ich meinem Bruder Christoph Rössner und meinem Cousin Florian Höhensteiger, die mir beide bei allen Computerproblemen stets hilfreich zur Seite standen. Bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, bei meinen Verwandten und den Freunden, die mich in dieser Zeit stets unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sei an dieser Stelle von ganzem Herzen gedankt.

12 LEBENS LAUF

| | |
|-----------------------|--|
| Name | Michaela Rössner |
| Geburtsdatum | 17.09.1975 |
| Geburtsort | Rosenheim |
| Eltern | Marie-Luise Rössner, geb. Hirsch Werner Rössner |
| 1982 – 1986 | Besuch der Grundschule in Riedering |
| 1986 – 1995 | Besuch des Ignaz-Günther-Gymnasiums in Rosenheim |
| 30. Juni 1995 | Abitur |
| Nov. 1995 – Feb. 2001 | Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München |
| 22. Feb. 2001 | Beendigung des 3. Abschnitts der Tierärztlichen Prüfung |
| 5. April 2001 | Approbation als Tierärztin |
| seit Mai 2001 | Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums Rechts der Isar in München |