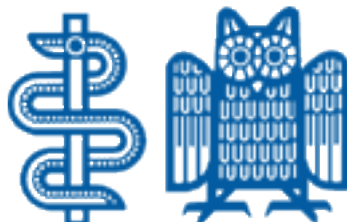


Aus der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kohn



# Pharmakokinetische Eigenschaften von antibiotikabeladenen Knochentransplantaten in vitro

**Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2011**

vorgelegt von: Hanna Berger, geb. am 26.11.1984 in Trier



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2 Summary</b>	<b>6</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>4 Material und Methodik</b>	<b>14</b>
4.1 Knochen . . . . .	14
4.2 Medium . . . . .	15
4.3 Antibiotika . . . . .	16
4.3.1 Gentamicin . . . . .	16
4.3.2 Vancomycin . . . . .	19
4.4 Beladungsprozess der Knochentransplantate mit Antibiotika . . . . .	22
4.4.1 Knochenchips . . . . .	23
4.4.2 Knochenblöcke . . . . .	24
4.5 Probenentnahme . . . . .	24
4.6 Messung . . . . .	25
4.7 Zu erhebende Parameter . . . . .	30
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
5.1 Pulverbeladung . . . . .	31
5.1.1 Absolute Tageswerte . . . . .	31
5.1.2 Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmenge . . . . .	32
5.1.3 Minimale Hemmkonzentration . . . . .	34

---

5.1.4	Mathematische Formel zur Freisetzungskinetik . . . . .	35
5.2	Lösungsbeladung . . . . .	40
5.2.1	Absolute Tageswerte . . . . .	40
5.2.2	Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmenge . . . . .	41
5.2.3	Minimale Hemmkonzentration . . . . .	42
5.2.4	Mathematische Formel zur Freisetzungskinetik . . . . .	43
5.3	Vergleich . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$ .....	Mikrogramm
$\mu\text{l}$ .....	Mikroliter
Abb. ....	Abbildung
bzw. ....	beziehungsweise
cm .....	Zentimeter
$\text{cm}^3$ .....	Kubikzentimeter
d .....	Tag
et al. ....	und andere
FPIA .....	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
G .....	Gentamicin
g .....	Gramm
Gy .....	Gray
h .....	Stunden
HWZ .....	Halbwertszeit
i.m. ....	intramuskulär
i.v. ....	intravenös
kD .....	Kilodalton
kg .....	Kilogramm
L .....	Lösung
mg .....	Milligramm
MHK .....	Minimale Hemmkonzentration
MIC .....	minimal inhibitory concentration
min .....	Minuten
ml .....	Milliliter

mm	.....	Millimeter
MRSA	.....	Methicillin resistenter Staphylokokkus aureus
NaCl	.....	Natriumchlorid, physiologische Kochsalzlösung
p.o.	.....	per os
pI	.....	Isoelektrischer Punkt
PMMA	.....	Polymethylmethacrylat
TEP	.....	Totale Endoprothese
V	.....	Vancomycin
vs.	.....	versus

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

### Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die pharmakokinetischen Eigenschaften von, mit Vancomycin und Gentamicin imprägnierten Knochentransplantaten unter Verwendung verschiedener Beladungsverfahren *in vitro* zu untersuchen.

### Material und Methodik

Die allogenen spongiösen Knochentransplantate lagen in Form von Knochenchips mit  $15 \text{ cm}^3$  Volumen sowie als Knochenblöcke zu je  $12 \text{ cm}^3$  Volumen vor. Die Chips wurden mittels eines trockenen Beladungsverfahrens (Pulverzumischung) mit 230 mg Vancomycin, 184 mg Gentamicin oder einer Kombination aus 230 mg Vancomycin und 184 mg Gentamicin imprägniert. Die Knochenblöcke wurden in einer antibiotikahaltigen Lösung beladen. Die Beladungsmenge betrug 4 g Vancomycin/40 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), 3,2 g Gentamicin/40 ml NaCl und 4 g Vancomycin in Kombination mit 3,2 g Gentamicin in 80 ml NaCl. Die Zumischungs- bzw. Beladungszeit betrug jeweils 30 Minuten. Alle Versuche wurden 3 - mal getestet.

Alle Knochenblöcke wurden in Glasbehälter mit 40 ml tryptischer Soja - Nährbouillon platziert. Alle 24 Stunden wurden die Knochenblöcke in Behälter mit frischer Bouillon eingelegt. Das Lösungsvolumen wurde so gewählt, dass die Knochenblöcke komplett mit Flüssigkeit umhüllt waren. Täglich wurden 10 ml entnommen, um darin die Vancomycin - bzw. Gentamicinkonzentration mittels Fluoreszenz - Polarisations - Immunoassay zu messen. Dieser Arbeitsschritt

erfolgte im 24 - h Rhythmus, um eine Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten. Zu Beginn der Messungen war es erforderlich, aufgrund der hohen Konzentrationen die Proben zu verdünnen, um ein exaktes Messergebnis zu erhalten. Mehrmalig unter der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) gemessene Werte definierten das Ende der Versuchsanordnung, dies entspricht für Vancomycin Werten unter  $5 \mu\text{g/ml}$  und für Gentamicin weniger als  $2 \mu\text{g/ml}$ .

### **Bestimmte Parameter**

Die täglich freigesetzten Antibiotikakonzentrationen sowie die über 15 Tage freigesetzte Gesamtmenge der jeweiligen Antibiotika pro Methode wurden bestimmt. Weiterhin wurde die Dauer der suffizienten Antibiotikafreisetzung ( $T_{>MHK}$ ) untersucht. Darüber hinaus wurde ein in Abhängigkeit von der Beladungsmethode bestehender synergistischer Effekt zwischen Gentamicin und Vancomycin untersucht. Zur Evaluierung der jeweiligen Freisetzungseigenschaft wurde eine mathematische Formel mittels Excel<sup>®</sup> für jede untersuchte Kombination erstellt.

### **Ergebnisse**

Beide Antibiotika zeigten ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften. Die höchsten Konzentrationen konnten sowohl für Vancomycin als auch für Gentamicin am ersten Tag gemessen werden. Hierbei zeigte die monoantibiotisch beladene Lösungsgruppe die höchsten Werte: Vancomycin  $8754 \mu\text{g/ml}$ , Gentamicin  $7146 \mu\text{g/ml}$  am ersten Tag. Die weitere Antibiotikafreisetzung fiel bei beiden Antibiotika in gleichem Maße und die gemessenen Konzentrationen sanken schnell im Verlauf der nächsten Tage. In der Pulvergruppe fielen die Werte unter die MHK nach 6 Tagen, bei Beladung in Lösung nach 8 - 10 Tagen. Die freigesetzte Gesamtmenge für Vancomycin und Gentamicin in der Lösungsgruppe war bei den monoantibiotisch beladenen Proben höher als bei den biantibiotisch beladenen. Dieser antagonistische Effekt war bei der Pulverbeladung nicht ersichtlich. In der Pulvergruppe konnten zwischen 94,15 % und 125,99 % Vancomycin und 66,17 - 86,97 % Gentamicin der anfänglich verwendeten Menge nach 15 Tagen aus dem Knochen gelöst werden. Wurden die Transplantate in Lösung beladen, waren nach 15 Tagen 4,38 - 11,77 % Vancomycin und 3,31 - 10,97 % Gentamicin der Ausgangsmenge freigesetzt. Der prozentuale Anteil freigesetzten Antibiotikums bezogen auf die Ausgangsmenge lag in der Lösungsgruppe deutlich unterhalb des Anteils der Pulvergruppe. Trotzdem ergab der Vergleich der pro Beladungsmethode jeweils freigesetzten Gesamtmenge als auch der jeweiligen



Tagesfreisetzung höhere Werte bei Lösungsbeladung. Der größte Teil wurde innerhalb der ersten 24 Stunden freigesetzt.

### **Diskussion**

Anhand unserer Ergebnisse konnte demonstriert werden, dass Vancomycin über eine bessere Freisetzungskinetik aus allogenen, spongiösem Knochen *in vitro* als Gentamicin verfügt. Bezüglich der Beladungsmethode ergab die Imprägnierung in einer Lösung bessere Resultate im Vergleich zur Pulverzumischung. Ein synergistischer Effekt zwischen den Antibiotikagruppen konnte für keines der Beladungsverfahren festgestellt werden.

# Kapitel 2

## Summary

### Objective

This doctoral thesis deals with the analysis of pharmacokinetic characteristics of bone transplants impregnated with Vancomycin and Gentamicin, using different techniques of drug - loading.

### Material and methods

The allogene cancellous bone transplants existed in form of bone chips of 15 cm<sup>3</sup> as well as in forms of bone plug of 12 cm<sup>3</sup>. The chips were impregnated with 230 mg Vancomycin, 184 mg Gentamicin or a combination of 230 mg Vancomycin and 184 mg Gentamicin, applying a dry technique of drug-loading (admixture of dry chemicals). The bone plugs were loaded with an antibiotics - containing dissolution, with the relation of ingredients being 4 g Vancomycin/40 ml NaCl, 3,2 g Gentamicin/40 ml NaCl and 4 g Vancomycin in combination with 3,2 g Gentamicin in 80 ml NaCl. The time of admixture / drug-loading was of 30 minutes each. Every test was repeated three times. All bone plugs were placed into glass containers with 40 ml of tryptic soy nutrient - solution. Every 24 hours, the bone plugs were placed in a container with fresh nutrient - solution. The volume of the dissolution ensured the complete covering of the bone plugs with the liquid. 10 ml were extracted on a daily basis in order to measure the concentration of Vancomycin / Gentamicin by means of fluorescence - polarisation - immunoassay, a procedure which was carried out on a daily basis and always at the same time, in order to ensure the comparability of the results. Starting the measurements, high concentrations made it necessary

to dilute the examples in order to achieve exact results. The test results which were measured below the minimal inhibition concentration (for Vancomycin results under 5  $\mu\text{g/ml}$  and for Gentamicin under 2  $\mu\text{g/ml}$ ) defined the end of the test arrangement.

### **Parameters to be evaluated**

Parameters to be evaluated were the daily released concentration of antibiotics as well as the total volume of the respective antibiotics per method, released over a period of 15 days. Furthermore, the duration of the sufficient release of antibiotics ( $T_{>\text{MIC}}$ ) as well as the synergistic effect between Gentamicin and Vancomycin in dependence of the loading method were measured. A mathematical formula was applied in an Excel<sup>®</sup> table in order to evaluate the respective methods of release.

### **Results**

Both antibiotics show similar pharmarco-kinetic characteristics. The highest concentrations could be measured both for Vancomycin and for Gentamicin on the first day. In this context, the monoantibiotically loaded dissolution group showed the highest test results: Vancomycin 8754 mg/ml, Gentamicin 7146 mg/ml. The further dissolution of antibiotics decreased in both antibiotics in equal measure, and the quantified concentrations sank rapidly during the following days. In the powder group, the test results were below the MIC after six days, when loaded within dissolution after 8 - 10 days. The total volume dissolved for Vancomycin und Gentamicin in the dissolution group was higher for the group of the mono-antibiotically loaded test than for the group for the biantibiotically loaded. This antagonistic effect was not evident during the loading with powder. In the powder group, between 94.15 % and 125.99 % Vancomycin and 66.17 - 86.97 % Gentamicin of the initially used amount could be dissolved from the bones. When the transplants were loaded in a dissolution, after 15 days, 4.38 - 11.77 % Vancomycin and 3.31 - 10.97 % Gentamicin of the initial amount were dissolved. In the solution group, the percentage of released antibiotic related to the initial volume was considerably below the percentage in the powder group. Nevertheless, the comparison of the respective released total amount per loading method as well as of the respective release per day showed higher values in the case of solution loading. The highest amount was dissolved within the first 24 hours.

## **Discussion**

The results demonstrate that Vancomycin disposes of better dissolution kinetics from allogene cancellous bone in vitro than Gentamicin. Concerning the drug - loading method, an impregnation within a dissolution facilitated better results in comparison to admixture of powder. A synergistic effect between the groups of antibiotics could not be found for any of the drug-loading methods.

# Kapitel 3

## Einleitung

### Infektionen

Mit der zunehmenden Alterung der Bevölkerung und der wachsenden Zahl komplexer Revisionsarthroplastien steigt auch die Nachfrage nach Knochentransplantaten. Dies vergrößert weiterhin die Zahl der transplantatabhängigen Infektionen und führt nachfolgend zu erhöhter Patientenmorbidity, verlängerten Krankenhausaufenthalten und steigenden Kosten im Gesundheitsbereich [Ketonis et al. 2010]. Trotz enormer Fortschritte bei Operationstechniken und -instrumenten, der Entwicklung neuer Antibiotika und deren perioperativen Gebrauch zählen postoperative Wundinfektionen immer noch zu den häufigsten chirurgischen Komplikationen. Die Infektionsgefahr steigt vor allem nach Implantation körperfremder Materialien. Nachgewiesen werden hier überwiegend *Staphylokokkus aureus* oder *Staphylokokkus epidermidis* - zunehmend auch methicillinresistente Stämme [DeLalla 1999]. Die Behandlung dieser Infektionen gestaltet sich schwierig: Die Erreger entwickeln Resistenzen, haften an Fremdkörpern unter einem von ihnen produzierten Biofilm, die p.o. oder i.v. verabreichten Antibiotika penetrieren nur schlecht den infizierten Knochen und gelangen nur zu einem geringen Teil an den Ort der Infektion. Zudem können sie aufgrund hoher Toxizität nur selten in solch hohen Konzentrationen gegeben werden, die nötig wären, den Erreger vollständig zu eradizieren. Für eine erfolgreiche Therapie ist eine adäquate Wunddrainage, eine eventuell nötige chirurgische Kontrolle des Infektionsherdes und eine angemessene antibiotische Behandlung erforderlich. Mittel der Wahl sind Penicillinasefeste Penicilline und Glykopeptide zur Eradikation von *S. aureus* und *S. epidermidis* [De Lalla 1999]. Lokale Antibiotikaträger bieten eine Möglichkeit, diese

Probleme in der Therapie zu umgehen.

### **Lokale Antibiotikatherapie**

Lokal antibiotikafreisetzende Systeme werden derzeit in biologische abbaubare und biologisch nicht abbaubare eingeteilt. Polymethylmethacrylat (PMMA) als Standardmaterial der lokalen Antibiotikafreisetzung in der orthopädischen Chirurgie zählt zu Letzteren. Es wird in Form von Ketten oder Platzhaltern, sogenannten „Spacern“ verwendet. Bisherige Studien lokalantibiotischer Behandlungsverfahren mit Knochenzement und PMMA - Ketten befassten sich mit dem Ziel, lokal ausreichend hohe Antibiotikakonzentrationen zu erzeugen, jedoch ohne systemische Medikamentennebenwirkungen hervorzurufen [Wahlig and Dingeldein 1980, Bucholz et al. 1981, Walenkamp 1983, Frauhofer et al. 1985, Wroblewski 1986, Calhoun and Mader 1989, Ipsen et al. 1991, Adams et al. 1992, Shinto et al. 1992, Becker et al. 1994, Nie et al. 1995, Mader et al. 1997, Masri et al. 1998]. Das Verwenden körperfremder Materialien birgt jedoch die Gefahr einer neuerlichen Infektion nach erneuter bakterieller Besiedlung, sobald die lokalen Antibiotikakonzentrationen subtherapeutische Werte erreicht haben. Darüber hinaus kann antibiotikabeladenes PMMA über Monate oder Jahre zu einer unerschwelligen Freisetzung und somit zu Resistenzen führen [Neut et al. 2003]. Diese körperfremden Implantate können je nach Ursache (Lockerung, Abnutzung oder Infektion) mit einer Vielzahl an Folgeoperationen einhergehen.

Materialien mit einer schnelleren Freisetzungskinetik und der Vermeidung einer späteren Explantation bieten eine mögliche Alternative [McLaren 2004]. Zur Zeit verwendete biologische Transplantate sind z.B. Kollagenschwämme sowie Knochenfragmente. Über den Einsatz von Kollagenschwämmen als lokale Antibiotikalieferanten gibt es in der Literatur je nach Einsatzgebiet verschiedene Aussagen: Bennett - Guerrero et al. untersuchten den infektionsprophylaktischen Wert gentamicinbeladener Kollagenschwämme in der Kolorektalchirurgie. Hierbei zeigte sich anders als erwartet eine erhöhte Infektionsrate der Patienten, bei denen ein solcher Schwamm verwendet wurde [Bennett - Guerrero et al. 2010]. Über den Einsatz solcher Schwämme bei der Exzision eines Pilonidalsinus berichteten Andersson et al.. Sie untersuchten 161 Patienten in einer prospektiven randomisierten kontrollierten Studie bezüglich der

Wundheilung und -infektion sowie dem Auftreten von Rezidiven mit und ohne Verwendung eines solchen gentamicinbeladenen Kollagenschwammes. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen [Andersson et al. 2010].

Der optimale Träger sollte eine gute Biokompatibilität und Speicherkapazität aufweisen [Winkler et al. 2006]: Spongioser Knochen als Antibiotikaträger in vitro und in vivo erzeugt anfängliche Höchstwerte bei nachfolgend stabilen Konzentrationen über eine gewisse Zeit [Witso et al. 1999, Witso et al. 2000, Winkler et al. 2000, Buttaro et al. 2005]. Der Einbau spongiosen Knochens dient zudem der Beseitigung eines weiteren chirurgischen Problems: postoperative Knochenverluste stellen oft eine Herausforderung für Chirurgen und Orthopäden dar [Ma et al. 2006]. Knochentransplantate können die Defekte auffüllen und gleichzeitig mechanische Stabilität gewährleisten. Autologe Knochentransplantation zur Vervollständigung der Knochendefekte und Wiederherstellung der Stabilität ist als Therapieoption Goldstandard.

Anwendung finden solche Transplantate in der Therapie von aseptischen und septischen Hüftprothesenlockerungen, Frakturen und Tumorerkrankungen, die Ursache von ausgedehnten Knochendefekten sein können [©Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation]. Herkömmliche „leere“ Transplantate sind jedoch erst dann zu verwenden, wenn alle Zeichen einer Infektion verschwunden sind. Ansonsten kann das avitale Implantat mit den noch vorhandenen Bakterien rekolonisiert werden [Winkler et al. 2006]. Auch in der Mund - Kiefer - Gesichtschirurgie und in der Zahnheilkunde finden Knochentransplantate Einsatz.

### **Antibiotika**

Unter allen getesteten Antibiotika weist Vancomycin die besten Eigenschaften zur lokalen Therapie mittels spongiösem Knochen als Träger auf: es verfügt über eine bakterizide Wirkung gegen die meisten relevanten Erreger und zeigt den geringsten zytotoxischen Effekt gegen wachsende Osteoblasten. Darüber hinaus zählt es zu den klinisch und experimentell am häufigsten evaluierten lokal verwendeten Antibiotika [Edin et al. 1996, Miclau et al. 1998] und ist als Pulver erhältlich sowie wasserlöslich.

Eine weitere hervorragende Möglichkeit bietet die Beladung mit Aminoglykosiden. Als Breitpektrumantibiotika zeigen sie sich effizient insbesondere gegen Enterobacteriaceen, Pseudomonas und Staphylokokken. In den letzten Jahren klinischen Gebrauchs bewiesen sie gute

Wirksamkeit und Verträglichkeit mit vitalem Gewebe [Miclau et al.1995].

Lindsey et al. (1993) beschäftigten sich in einer in vivo Studie mit dem Einfluss von Antibiotika auf den Heilungsprozess. Röntgenologisch, mikroradiographisch, histologisch und biomechanisch fand sich kein Unterschied zu unimprägnierten Implantaten [Chan et al. 2000].

### **Bisherige Indikationen**

Antibiotikahaltige Knochentransplantate fanden bisher schon in mehreren klinischen Bereichen Anwendung. Witso et al. verwendeten Netilmicinimprägnierte Transplantate zur Rekonstruktion bei Knie - und Hüftoperationen [Witso et. al 2004]. Buttaro et al. beluden spongiösen Knochen mit Vancomycin zum Einsatz bei infizierten Hüftgelenksprothesen [Buttaro et. al 2005]. In einzeitigen Hüft - TEP - Revisionen verwendeten Winkler et. al je nach Erregerspektrum Tobramycin - bzw. Vancomycin beladene Knochentransplantate [Winkler et. al 2008]. Weiterhin finden lokale Antibiotikaträger ihren Einsatz in der Osteomyelitistherapie [Kent et. al 2006].

In Deutschland werden jährlich 105 000 Knochentransplantationen durchgeführt, ca. 75 000 davon autolog . Neben humanen werden auch xenogene oder alloplastische Transplantate verwendet. Doch auch nach mehr als 50 Jahren Forschung entspricht keiner der Knochenersatzplastiken bisher der einzigartigen fibrösen und mineralischen Zusammensetzung des Knochens [Delloye et al. 2007].

Weltweit werden in jährlich nahezu 2,2 millionen orthopädischen Eingriffen Knochentransplantate verwendet, die jährlich Kosten von rund \$ 2,5 Billionen verursachen [Desai 2007]. Mit der Zahl der zunehmenden Revisionsarthroplastien und des erhöhten Anteils der älteren Bevölkerung wird die Nachfrage nach Knochentransplantaten weiter steigen.

### **Ziel der Arbeit**

Trotz einer zunehmenden Anzahl von Publikationen in den letzten Jahren über antibiotikabeladene Knochentransplantate sind weiterhin genaue Kenntnisse über das ideale Beladungsverfahren, Antibiotikum und die daraus resultierenden pharmakokinetischen Eigenschaften noch lückenhaft.



Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Freisetzungskinetik antibiotikabeladener spongiöser Knochentransplantate *in vitro* in Abhängigkeit von Antibiotikum, Beladungsart und Knochenformation zu untersuchen.

# Kapitel 4

## Material und Methodik

### 4.1 Knochen

Allogene, spongiöse Knochenchips: 1 - 10 mm, 15 cm<sup>3</sup> (Fa. Tutogen, Neunkirchen am Brand, Deutschland)

Allogene, spongiöse Knochenblöcke: 2 x 2 x 3 cm (Fa. Tutogen, Neunkirchen am Brand, Deutschland)

Alle potentiell zur Spende möglichen Gewebe werden einem umfangreichen Spender - und Gewebescreening unterzogen, um die Transplantatsicherheit zu gewährleisten und Hochrisikospender auszuschließen. Das Screening umfasst eine medizinische wie auch eine soziale Vorgeschichte, ein Gespräch mit den nächsten Verwandten, eine körperliche Beurteilung und eine umfassende serologische Diagnostik, die folgende übertragbare Krankheiten ausschließen muss: Hepatitis, HIV, Leukämien, Lymphome und Syphilis. Zusätzlich wird das Spendergewebe vor Beginn der Konservierung und Sterilisierung auf mikrobielles Wachstum getestet und gegebenenfalls vom weiteren Verfahren ausgeschlossen.

#### **Delipidation**

Im Gewebe verbleibende Lipide können störend in den Heilungsprozess eingreifen, bakterielles Wachstum fördern und im Falle einer Bestrahlung cytotoxische Effekte aufweisen [Moreau

et al. 2000]. Mittels Ultraschallbad werden die Lipide entfernt und zusätzlich umhüllte Viren inaktiviert sowie die Prionaktivität herabgesetzt.

### **Osmotisches Verfahren**

Im Wechsel werden hyperosmotisches Salzwasser und destilliertes Wasser benutzt, um Bakterien abzutöten. Die Zellmembran platzt, zelluläre Partikel werden ausgewaschen, Antigene entfernt und eventuell in der Zelle vorhandene Viren enthüllt.

### **Oxidative Bearbeitung**

Mittels Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) werden lösliche Proteine, nicht - behüllte Viren und Bakteriensporen entfernt.

### **Lösemittel**

Eine abschließende Azetonwäsche gewährleistet eine endgültige Beseitigung aller Viren und Prionen. Gemeinsam mit der Vakuumextraktion dient dieser Schritt zur Dehydratation des Gewebes und anschließender Lagerung bei Raumtemperatur.

### **Gammabestahlung**

Die Transplantate werden nun in Form und Größe zugeschnitten und doppelt steril verpackt. Die anschließende low - dose Gammabestahlung (17,8 kGy - 25 kGy) hat zum Ziel, jegliche im Tutoplast - Prozess entstandene mikrobielle Kontamination zu beseitigen [Schoepf 2006].

## **4.2 Medium**

Caseinpepton - Sojamehlpepton - Boullion (Fa. Becton Dickingen - Heidelberg)

Als Untersuchungsmedium wurde eine flüssige Kulturlösung folgender Zusammensetzung verwendet (g/l): 17 g pankreatisch abgebautes Casein, 3 g enzymatisch abgebautes Sojamehl, 2,5 g

Dextrose, 5 g Natriumchlorid und 2,5 g Dikaliumphosphat. Diese Bouillon wird aus einem industriell gefertigten Trockennährboden (Fa. Difco) hergestellt. Zur Aufbereitung der Kulturlösung werden 30 g des Pulvers in 1 Liter destilliertes Wasser suspendiert, erwärmt und für 15 Minuten mittels Magnetrührer gut durchmischt, um das Pulver vollständig aufzulösen. Im Anschluss wurden jeweils 40 ml der Bouillon in die 18 Versuchsgläser gefüllt und die zuvor mit Antibiotika beladenen Knochenfragmente eingelegt. Die Versuchsanordnung wurde nun für 24 Stunden in diesem Zustand belassen.

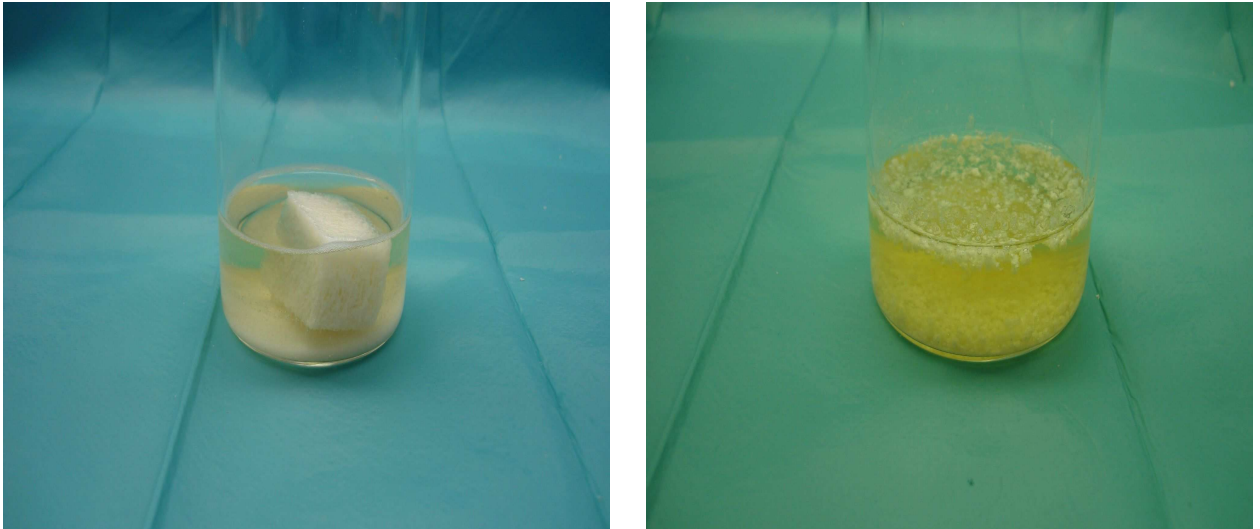


Abbildung 4.1: Antibiotikabeladene Knochenfragmente in Soja - Nährbouillon

links: Antibiotikabeladener Knochenblock in 40 ml Nährbouillon

rechts: Antibiotikabeladene Knochenchips in 40 ml Nährbouillon

## 4.3 Antibiotika

### 4.3.1 Gentamicin

Gentamicin gehört zur Gruppe der Aminoglykoside. Es handelt sich um ein von Mikromonospora - Arten gebildetes Gemisch aus drei Breitspektrum - Antibiotika (Gentamicin  $C_1$ ,  $C_{1a}$  und  $C_2$ ). Es ist farblos, basisch, sehr gut wasserlöslich, lösungsstabil im pH - Bereich 2,2 - 10 sowie in Kälte und sogar bei kurzfristiger Erhitzung bis 100°C und in kristalliner Form sehr lagerungsstabil. Das Molekulargewicht von Gentamicin beträgt  $\sim 1400$  Dalton.

## Strukturformel

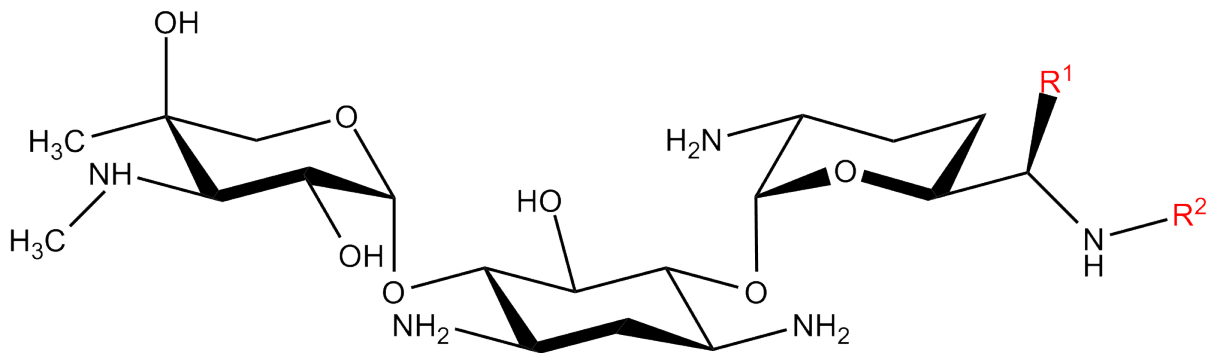


Abbildung 4.2: Strukturformel Gentamicin

## Wirkungsspektrum

Klinisch relevant ist heute insbesondere die Wirkung auf Enterobacteriaceen, Pseudomonas und Staphylokokken. Gegen Streptokokken ist es nur schwach aktiv und Anaerobier sind meistens resistent.

## Wirkungsmechanismus

Gentamicin wird nach Anreicherung in der Bakterienzelle irreversibel an die 30S - Untereinheit der Ribosomen gebunden und bewirkt auf diese Weise eine komplexe Störung der Proteinbiosynthese. Einerseits wird die Bindung von N - Formylmethionyl - t - RNA an die 30 S - Untereinheit blockiert und damit der Beginn der Proteinsynthese unterdrückt, andererseits kann Aminoacyl - t - RNA nicht angelagert werden, wodurch die Verlängerung der begonnenen Peptidketten unterbleibt. Außerdem werden durch die Bindung von Gentamicin an die Ribosomen Ablesefehler bei der Translation hervorgerufen und dadurch falsche Enzym - und Strukturproteine (sog. „Nonsense - Proteine“), die irreversibel Zellschäden auslösen, gebildet. Gentamicin wirkt bakterizid und ist somit in der Lage, die Erreger abzutöten. Eine Resistenzentwicklung, die unter der Therapie rasch eintreten kann, beruht meistens auf der Bildung von Enzymen, die Aminoglykoside inaktivieren. Acetylasen katalysieren die Acetylierung von Aminogruppen, Adenyltransferasen und Phosphotransferasen die Adenylierung bzw. Phosphorylierung von Hydroxylgruppen. Die genetische Information für diese Enzyme ist auf übertragbaren Resistenzplasmiden lokalisiert. Durch Chromosomenmutation erworbene Resistenzen führen zu einer

verminderten Affinität der ribosomalen Bindungsstellen bzw. einer Änderung der Membranpermeabilität. Für therapeutische Belange besteht jedoch eine weitgehende Parallelresistenz zwischen Gentamicin und Tobramycin.

### **Pharmakokinetik**

Zur systemischen Behandlung muss Gentamicin parenteral verabreicht werden. I.m. - Injektionen oder Kurzinfusionen über 30 - 60 Minuten sind üblich. Bei einer Steigerung der Plasmakonzentration (durch Überdosierung oder Kumulation bei eingeschränkter Nierenfunktion) über den kritischen Spiegel nimmt das Risiko irreversibler Innenohrschäden des Patienten zu. Als kritischer Spiegel gilt  $10 \mu\text{g}$  Gentamicin/ml Plasma. Oral verabreicht wirkt Gentamicin nur lokal.

Gentamicin wird an Plasmaproteine kaum gebunden (10 %). Seine Passage durch intakte biologische Membranen, z.B. Blut - Liquor - Schranke, Epithelbarrieren ist gering. Es penetriert nicht in den allgemeinen intrazellulären Raum; eine Metabolisierung erfolgt nicht. Aus dem Blut wird es durch glomeruläre Filtration und praktisch nur renal eliminiert. Die Elinationshalbwertszeit steigt in dem Maße wie die Clearance abnimmt.  $\text{HWZ}_N \sim 2 \text{ h}$ ;  $\text{HWZ}_{60} \sim 4 \text{ h}$ ;  $\text{HWZ}_{30} \sim 7 \text{ h}$ ;  $\text{HWZ}_0 \sim 70 \text{ h}$ . Durch Hämodialyse wird Gentamicin gut (ca. 50 % des Antibiotikums während einer 6 - 8 h - Dialyse), durch Peritonealdialyse nur in geringem Maße (geringe Passage durch intakte biologische Membranen) aus dem Blut eliminiert.

### **Dosierung**

Die mittlere Tagesdosis für Gentamicin beträgt 2 - 3 mg/kg/d.

### **Nebenwirkungen**

Typisch für alle Aminoglykoside sind Störungen des Hör - und Gleichgewichtsorgans, die darauf zurückzuführen sind, dass sich Aminoglykoside in der Perilymphe des Innenohrs anreichern und das Sinnesepithel schädigen. Die Häufigkeit von Gleichgewichtsstörungen liegt für Gentamicin bei 1 - 1,5 % (Vestibulumtoxizität) und die von Hörstörungen bei 0,5 % (Cochleatoxizität).

Eine Kombination aus Gentamicin und Schleifendiuretika (Furosemid, Etacrynsäure), Immunsuppressiva (Ciclosporin), Chemotherapeutika (Amphotericin B, ältere hochdosierte Cephalosporine, Vancomycin hochdosiert) und Anästhetika (Methoxyfluran) erhöht die Gefahr einer Nephrotoxizität. Die Kumulation in der Niere beruht auf einer sehr langsamen Rückdiffusion aus den Tubulusepithelzellen in das Plasma (Halbwertszeit  $> 100$  h). Als Mechanismus dieser Anreicherung wurde eine Bindung der Aminoglykoside an saure Phospholipide des Bürstensaums im proximalen Tubulus und Aufnahme der Komplexe durch Pinozytose in das Zellinnere und dort in die Lysosomen gefunden. Dies führt zu Aktivitätsänderungen lysosomaler Enzyme und Defekten der Lysosomenmembranen, als deren Folge Tubulusnekrosen auftreten können.

Durch Gentamicin kann eine Verstärkung der relaxierenden Wirkung von Tubocurarinchlorid bzw. eine Verlängerung der Wirkung von Suxamethoniumchlorid und Hexacarbacholinbromid erfolgen. Die Interaktion wird durch Neostigmin, Calcium und Edrophonium nicht aufgehoben. Klinisch äußert sich diese Wechselwirkung im Auftreten von Atemnot, die rasch in eine Apnoe übergehen kann und zwar dann, wenn Gentamicin in Dosen von 2 - 5 g nach einer Operation verabreicht wird. Die Atemdepression ist gekennzeichnet durch verlängerte und manchmal irreversible Atemfunktionsstörungen. Die Wechselwirkung ist unabhängig von der Art der Verabreichung von Gentamicin.

### 4.3.2 Vancomycin

Vancomycin gehört zu den Glykopeptid - Antibiotika. Schon seit 1955 bekannt, wird es aus Kulturfiltrat von *Streptomyces orientalis* isoliert. Das tricyclische Molekül enthält mehrere funktionelle Gruppen (1 Carboxyl -, 2 Amino - und 3 Phenolgruppen) und Voraussetzungen zur Chelatbildung mit Metallionen. Sein Molekulargewicht beträgt  $\sim 1500$  Dalton. Die Vancomycin - Base ( $pI = 8,0$ ) ist als Hydrochlorid im Handel. Seit 1987 wird die Therapiesubstanz mit einem Reinheitsgrad von 95 % angeboten (dadurch bessere Verträglichkeit). Ihre Wasserlöslichkeit und Stabilität ist pH - abhängig. Im sauren Bereich ist Vancomycin gut löslich und im alkalischen zwar wieder gut löslich, aber instabil. Mischung mit anderen Medikamenten begünstigt die Ausfällungen.

## Strukturformel

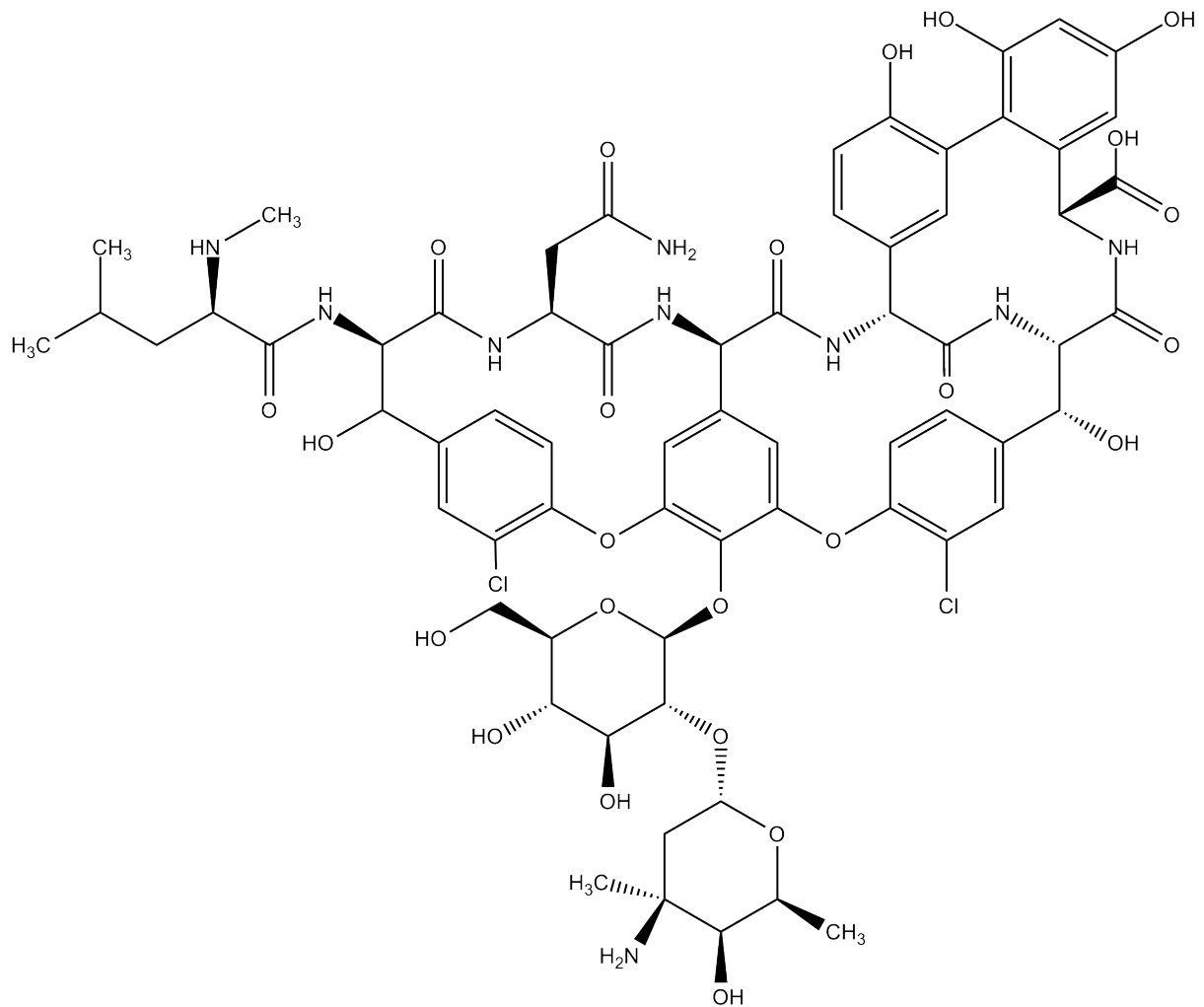


Abbildung 4.3: Strukturformel Vancomycin

## Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum umfasst aerobe und anaerobe grampositive Keime, von besonderer Bedeutung ist die Wirkung gegen Staphylokokken und *Clostridium difficile*. Gegen gramnegative Bakterien, deren „Äußere Membran“ sie nicht durchdringen, ist es unwirksam.

## Wirkungsmechanismus

Vancomycin hemmt die Mureinsynthese. Durch Bindung an das endständige D - Alanyl - D - Alanin des UDG - Muramyl - Pentapeptids vor seiner enzymatischen Quervernetzung zum



Peptidoglykangerüst, verhindert es die Elongation der Peptidoglykanketten und deren Quervernetzung.

Vancomycin wirkt bakterizid.

Der Wirkungsmechanismus von Glykopeptiden hat folgende Vorteile:

1. keine Parallelresistenzen zu anderen Antibiotika (es besteht nur eine Kreuzresistenz zwischen Teicoplanin und Vancomycin)
2. Mutanten mit andersartigen Peptidoglykanbausteinen entstehen nur schwer.

Dennoch gibt es in der Natur grampositive Bakterienarten, die gegen Glykopeptidantibiotika eine natürliche Resistenz besitzen, z.B. Streptokokken der Leuconostoc - Gruppe (in Milchprodukten vorkommend). Der Resistenzmechanismus ist Plasmid - vermittelt und übertragbar. Er breitet sich inzwischen in und über Enterokokken nosokomial aus.

### **Pharmakokinetik**

Bei oraler Applikation werden Glykopeptide nicht resorbiert und müssen daher für eine systemische Therapie parenteral verabreicht werden. Oral wirken sie nur im Darmlumen (z.B. bei der Behandlung der pseudomembranösen Kolitis durch Clostridium difficile).

Die Plasmahalbwertszeit beträgt 7 h und die renale Clearance 80 ml/min. Vancomycin bestätigt pharmakokinetisch, dass mit kleinerem pI (5,1 (Teicoplanin) vs 8,0) die Clearance und das Verteilungsvolumen abnehmen, während die Eliminationshalbwertszeit zunimmt. Bei Vancomycin variiert der proteingebundene Anteil konzentrationsabhängig zwischen 10 - 50 %. Die Penetration in interstitielle Flüssigkeit und durch Diffusionsbarrieren wie die Blut - Liquor - Schranke ist relativ gering. Vancomycin wird wenig metabolisiert und ist nicht hämodialysierbar. Nach intravenöser Gabe wird Vancomycin im Urin, nach oraler Gabe im Stuhl ausgeschieden.

### **Dosierung**

Für Vancomycin liegen die Werte bei 3 - 4 x 0,5 g/d in Infusionen unter Kontrolle der Nierenfunktion oder Konzentrationsüberwachung im Plasma; zur oralen Behandlung der pseudomembranösen Kolitis 2 - 3 x 0,5 g der i.v. - Präparation über den Magenschlauch oder 3 - 4 x 250 mg als Tablette.

## Nebenwirkungen

1. Reversible Nephrotoxizität (vor Allem in Kombination mit Aminoglykosiden, Cisplatin, Amphotericin B, Ciclosporin, Furosemid oder Etacrynsäure).
2. Reversible / irreversible Ototoxizität: Risiko bei Vorschädigung des Hörnervs und / oder Kombination mit Aminoglykosid - Antibiotika.
3. Überempfindlichkeitsreaktionen: Blutdruckabfall mit aufflammendem Hauterythem („red man´s syndrom“) bei zu schneller Infusion (< 10 min.); selten: Allergie mit anaphylaktoiden Reaktionen.
4. Lokale Reaktionen: Schmerz, Phlebitis bei zu schneller Infusion.
5. Vancomycin nicht mit alkalischen Lösungen mischen.

## 4.4 Beladungsprozess der Knochentransplantate mit Antibiotika

Es wurden zwei unterschiedliche Knochentransplantate untersucht: Spongiöser Knochen in kleinen Chips von 1 - 10 mm Durchmesser ( $15 \text{ cm}^3$ ) und Knochenblöcke mit jeweils  $2 \times 2 \times 3 \text{ cm}$  ( $12 \text{ cm}^3$ ).

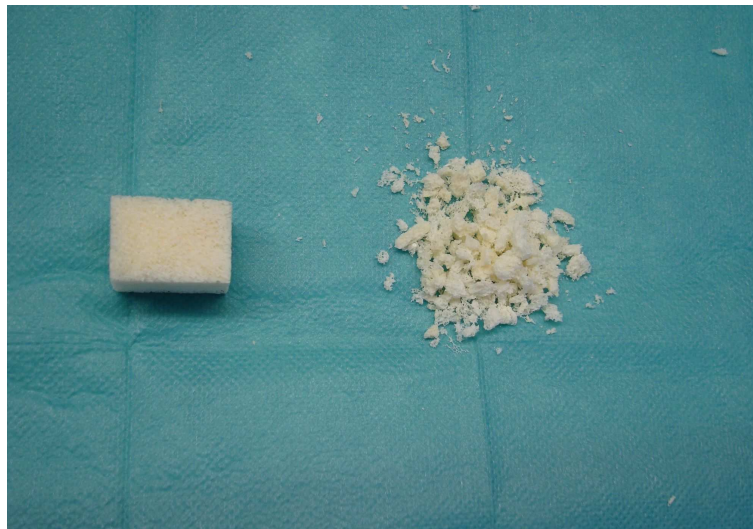


Abbildung 4.4: Knochenblock, - chips

Pro Knochenchip bzw. Knochenblock wurden insgesamt 9 Messreihen gestartet, parallel liefen also 18 Versuche. Trockenes Antibiotikapulver diente zur Beladung der Chips. Die Beladung der Knochenblöcke erfolgte jeweils in einer antibiotikahaltigen Lösung. Zur optimalen Vergleichbarkeit wurde jeder Versuchsansatz dreimal durchgeführt.

Die Beladung der Knochentransplantate erfolgte nach den Methoden von Winkler et al. und Witso et al.. Bezüglich der Beimischung von Antibiotika in Pulverform beträgt die maximale Menge pro Femurkopf 1000 mg Vancomycin und 800 mg Gentamicin. Bei einem Femurkopfdurchmesser von 4,5 - 5,5 cm entspricht dies einem Volumen von etwa  $65 \text{ cm}^3$  ( $\frac{4}{3}\pi r^3$  bei  $r = 2,5$ ). Daraus errechnet sich für  $15 \text{ cm}^3$  Knochenchips eine Gesamtbeladungsmenge von 230 mg Vancomycin und 184 mg Gentamicin.

Für die Beladung der Knochenblöcke in einer antibiotikahaltigen Lösung gilt: 100 mg Vancomycin/ml/Block und 80 mg Gentamicin/ml/Block [Witso et al. 2000, Winkler et al. 2000]. Zur vollständigen Umschließung eines  $12 \text{ cm}^3$  - Blockes spongiösen Knochens waren 40 ml Flüssigkeit nötig. Daraus resultieren 4 g Vancomycin und 3,2 g Gentamicin pro Ansatz.

#### **4.4.1 Knochenchips**

Jeweils 3 Proben der Knochenchips wurden monoantibiotisch mit 230 mg Vancomycin oder 184 mg Gentamicin beladen, 3 weitere Proben biantibiotisch bestehend aus der Summe der einzelnen Antibiotikamengen. Zur besseren Durchmischung und Anlagerung des Antibiotikums an die Knochenoberfläche bzw. an die spongiöse Knochenstruktur, war es erforderlich, die beiden Bestandteile unter Zuhilfenahme eines Mörsers zu zerkleinern und zu vermischen. Zur Gewährleistung einer homogenen Antibiotikabeimischung betrug der Beladungsprozess 30 Minuten.



Abbildung 4.5: Knochenchips gemörsert mit Antibiotikum

#### 4.4.2 Knochenblöcke

Die Beladung der Knochenblöcke erfolgte in antibiotikahaltigen Lösungen. Die Versuchsreihen 10 - 12 beinhalteten eine Lösung aus 4 g Vancomycin und 40 ml NaCl pro Block. Die Proben 13 - 15 wurden mit Gentamicin angesetzt und erhielten jeweils 3,2 g des Antibiotikums in 40 ml NaCl. Zur Behandlung der Messreihen 16 - 18 wurden sowohl 4 g Vancomycin als auch 3,2 g Gentamicin in 80 ml NaCl verwendet. Zur vollständigen Auflösung wurde das Antibiotika - NaCl - Gemisch mehrere Minuten geschüttelt, bis eine makroskopisch sichtbare vollständige Durchmischung stattgefunden hatte. Anschließend wurden die 9 Knochenblöcke für die Dauer von 30 Minuten in die vorbereiteten Lösungen gelegt.

### 4.5 Probenentnahme

Zur Simulation der in vivo Bedingungen und insbesondere der Auswaschungsphase der Antibiotika durch die kontinuierliche lokale Perfusion wurde das Versuchsvolumen täglich ausgetauscht. Dazu wurde täglich neue Soja - Nährbouillon angesetzt und zu jeweils 40 ml in Bechergläser aufgefüllt.

Zur Extraktion der Knochenfragmente der Proben 1 - 9 wurden zusätzlich je ein weiteres Becherglas sowie eine sterile Kompresse benötigt. Die 8 - lagige Kompresse, über die Öffnung dieses Becherglases gelegt, diente als Sieb. Nun wurden die Ansätze mit den Knochenchips

(1 - 9) nacheinander vorsichtig durch je eine dieser Kompressen in das Glas gefiltert. Aus dem von Knochen befreiten Volumen entnahmen wir eine Probe von 10 ml und füllten diese in ein beschriftetes Transportröhrchen. Die verbliebenen Knochenfragmente wurden in das neu hergestellte Medium im entsprechenden Becherglas platziert.

Das Extrahieren der Knochenblöcke 10 - 18 erfolgte mittels Pinzette. Dazu wurden die Blöcke in das an diesem Tag vorbereitete Medium gegeben. Aus dem Restvolumen wurde jeweils eine Probe von 10 ml entnommen. Auch diese wurde in ein Transportröhrchen gefüllt, welches mit Nummer, Datum und Antibiotikum beschriftet wurde. Zum standardisierten Vergleich der erhobenen Werte erfolgte das Umfüllen der Knochen und das Abnehmen der Proben täglich jeweils zur gleichen Tageszeit.



Abbildung 4.6: Transportröhrchen

## 4.6 Messung

### AxSYM<sup>®</sup>

Das von uns verwendete Reagenziensystem AxSYM<sup>®</sup> Fa. Abbott - Vancomycin bzw. - Gentamicin dient zur quantitativen Bestimmung der Antibiotika Vancomycin und Gentamicin in Serum oder Plasma. Im klinischen Alltag wird es eingesetzt zur Diagnose und Behandlung von Überdosierungen der beiden oben genannten Antibiotika. Somit können die Konzentrationen überwacht und eine bestmögliche Therapie gewährleistet werden.



Abbildung 4.7: Das AxSYM® System

Das AxSYM® - System arbeitet nach dem Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA). Es bedarf zweier Arbeitsschritte um zum Ergebnis zu gelangen. In der Vorbereitungsphase werden die Probe und alle weiteren für den Test benötigten Reagenzien von der Vorbereitungsprobennadel in die einzelnen Vertiefungen eines Reaktionseinsatzes pipettiert. Für eine Routine - Analyse beträgt das erforderliche Probenvolumen  $150 \mu\text{l}$  für jeden Probenbecher. Die zu messende Probe und Lösung 4 (Verdünnungs - / Spülpuffer) werden in eine Küvette suspendiert. Dieser Vorgang findet im Vorbereitungsbereich statt. Im Bearbeitungsbereich erfolgt dann die eigentliche Messung. Hierbei wird zunächst die Leerwertintensität gemessen, indem ein Teil der Vorverdünnungsmischung und Lösung 4 in die Küvette des Reaktionseinsatzes pipettiert wird. In der Vancomycin - Messreihe wird nun ein zweiter Teil der Vorverdünnungsmischung zusammen mit dem Vancomycin II Antiserum (Antikörper) und dem Vancomycin II Fluoreszein - Tracer in die Küvette suspendiert. Bei den Messungen der Gentamicinkonzentrationen wird entsprechend ein Gentamicin Antiserum (Antikörper) und ein Gentamicin Fluoreszein - Tracer verwendet. Die beiden Antibiotika konkurrieren jeweils mit ihrem entsprechenden Tracer um

die Antikörperbindungsstellen. Im letzten Schritt wird nun mithilfe eines optischen Messsystems für FPIA die Intensität des polarisierenden Fluoreszenzlichtes gemessen. Wenn das Untersuchungsmaterial der Nährlösung eine hohe Konzentration des Medikamentes aufweist, ergibt sich eine geringe Polarisation (= geringe Ausbeute polarisierter Sekundärstrahlung); eine niedrige Konzentration des Medikamentes resultiert in einer hohen Polarisation. Aufgrund dieser indirekten Beziehung zwischen Konzentration und Polarisation wird mit Hilfe von fünf Kalibratoren eine Eichkurve erstellt. Ein Nachteil des FPIA liegt in der durch die Molekülgröße des Analyten begrenzten Anwendbarkeit (bis zu einem Molekulargewicht von 10 kD)(DÖRNER, 1999).

Die Sensitivität der beiden Messreihen ist definiert als die niedrigste messbare Konzentration, die mit einer 95%igen Konfidenz von Null unterschieden werden kann. Die errechnete Sensitivität dieser Messmethode beträgt für den Vancomycin - Testdurchlauf 2,00 µg/ml und für den AxSYM Gentamicin - Assay 0,30 µg/ml.

Zudem ist es mit dem AxSYM® Analysengerät möglich, eine automatische Probenverdünnung vorzunehmen. Enthalten die Proben Vancomycin-Konzentrationen von mehr als 100,00 µg/ml, können sie automatisch verdünnt werden. Bei Konzentrationen über 400,00 µg/ml muss die Probe manuell verdünnt werden im Verhältnis 1:10 oder 1:100. Der entsprechende Wert für die automatische Verdünnung liegt für Gentamicin bei 10,00 µg/ml. Bei Gentamicin - Konzentrationen über 40,00 µg/ml kann auch diese Probe manuell mit Lösung 4 verdünnt werden. Hierbei muss beachtet werden, dass das vom AxSYM - System ermittelte Endergebnis der Probe mit dem manuellen Verdünnungsfaktor multipliziert werden muss:

Endkonzentration der Probe = vom Analysengerät ermittelte Konzentration x Manueller Verdünnungsfaktor

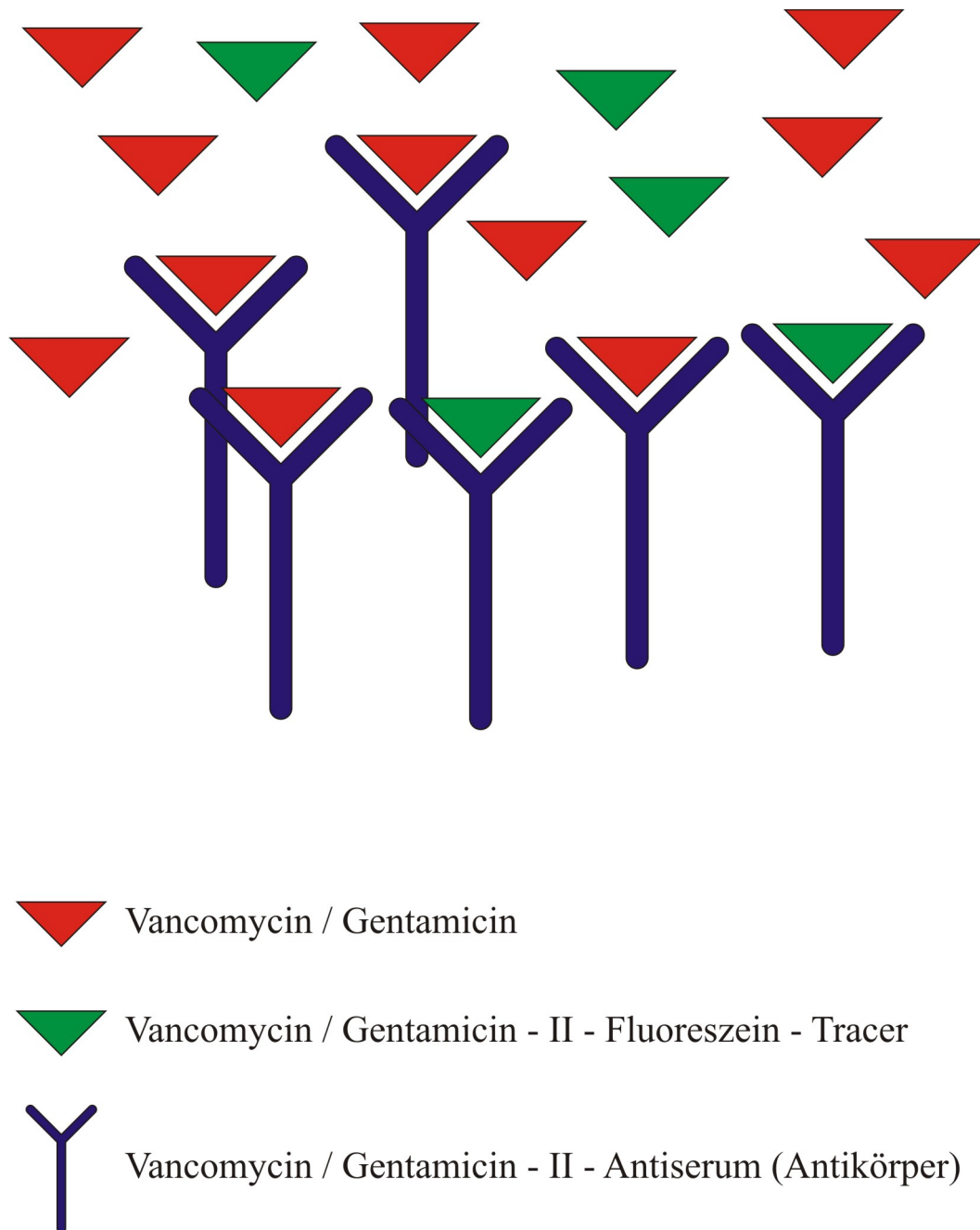


Abbildung 4.8: FPIA - Prinzip: geringe Polarisation

Abb. 4.8. verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Antibiotikakonzentration in der zu messenden Probe und der daraus folgenden Polarisation. Die roten Dreiecke stellen das jeweils verwendete Antibiotikum (Vancomycin / Gentamicin), die grünen Dreiecke den entsprechenden fluoreszeierenden Tracer dar. Bei hoher Antibiotikakonzentration im Probevolumen wird ein Großteil der Antikörperbindungsstellen (blau) vom Antibiotikum besetzt - es resultiert eine geringe Polarisation.



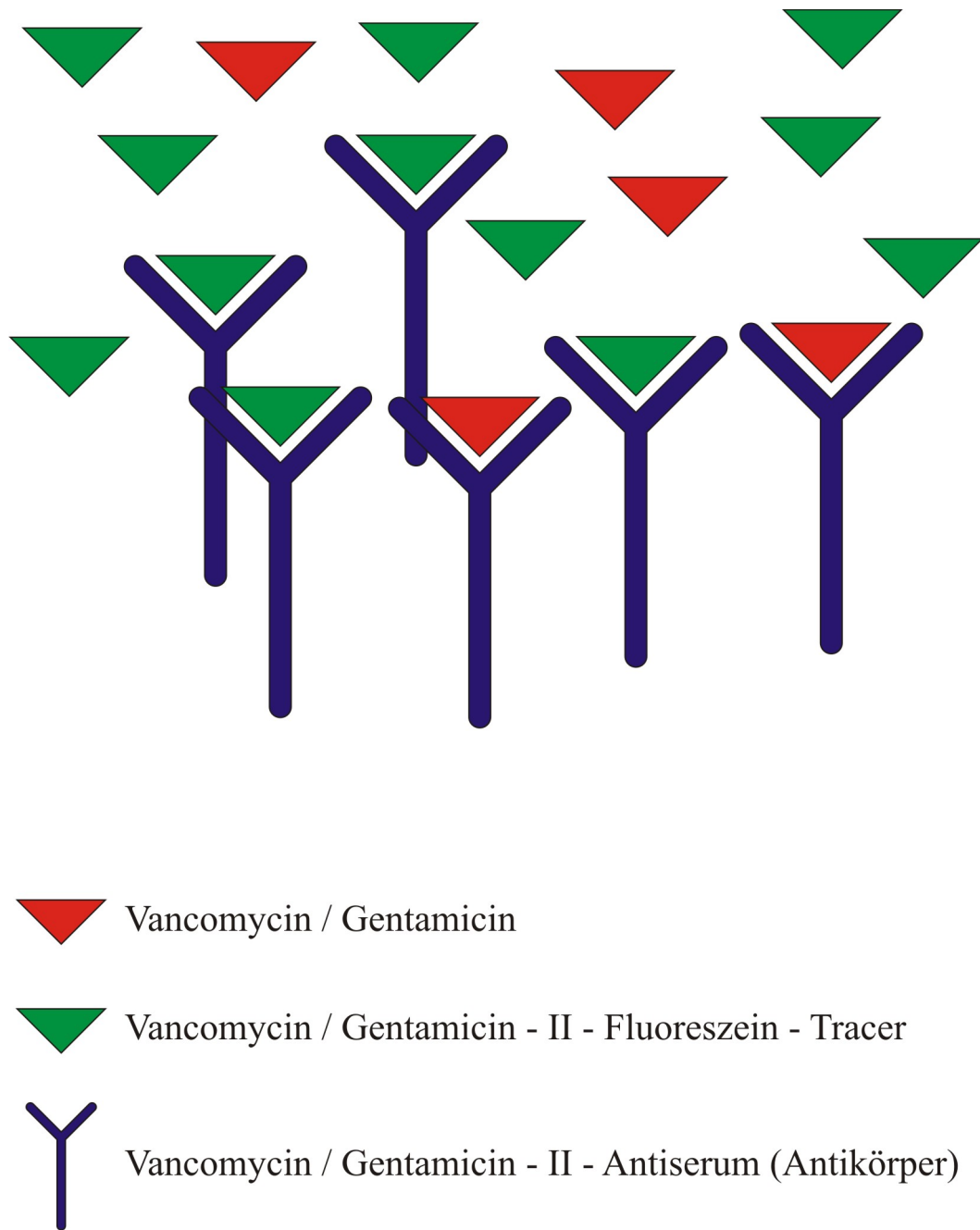


Abbildung 4.9: FPIA - Prinzip: hohe Polarisation

Abb. 4.9. zeigt analog dazu die Bindung bei niedriger Antibiotikakonzentration. Durch die geringere Konkurrenz zwischen Antibiotikum und Tracer um die Bindungsstellen am Antikörper werden mehr Fluoreszein - Tracer gebunden - es wird eine höhere Polarisation gemessen.

## 4.7 Zu erhebende Parameter

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Parameter untersucht:

1. Tägliche Bestimmung der Antibiotikakonzentration / Methode
2. Bestimmung der freigesetzten Gesamtmenge der jeweiligen Antibiotika / Methode
3. Dauer der suffizienten Antibiotikafreisetzung
4. Bestimmung eines synergistischen Effektes zwischen Gentamicin und Vancomycin / Methode
5. Erstellung der mathematischen Formel zur Freisetzungskinetik für jede untersuchte Kombination mittels Excel<sup>®</sup>

# Kapitel 5

## Ergebnisse

### 5.1 Pulverbeladung

#### 5.1.1 Absolute Tageswerte

Die höchsten absoluten Tageswerte wurden bei allen Ansätzen innerhalb der ersten 24 Stunden verzeichnet. Im weiteren Verlauf der Messungen verringerte sich die tägliche Freisetzung stetig. Die mit Vancomycinpulver monoantibiotisch beladenen Knochentransplantate gaben zwischen 4606 und 5984  $\mu\text{g}$  Vancomycin/ml Versuchsvolumen innerhalb der ersten 24 Stunden frei. Unter Verwendung beider Antibiotika in Pulverform konnte eine Vancomycinfreisetzung zwischen 5873 und 6511  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gemessen werden. Deutlich geringer waren die gemessenen Gentamicinwerte bei Pulverbeladung. Monoantibiotisch beladen wurden am ersten Tag 2726 - 3605  $\mu\text{g}$  Gentamicin/ml, biantibiotisch 2737 - 2890  $\mu\text{g}/\text{ml}$  freigesetzt.

Tage	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
Vancomycinfreisetzung															
V	5984	810	143,3	40,73	10,63	3,34	1,17	1,07	1,05	0,18	0,1	0,64	0,47	0,41	0,18
V	5626	963	215,5	49,73	19,48	5,51	1,82	1,26	1,3	0,42	0	1	0,41	0,4	0,33
V	4606	671	108,6	17,62	5,25	1,35	0,6	1	0,76	0,31	0,13	0,49	0	0,48	0,17
GV - V	6511	608	90,1	23,54	5,97	1,48	1	1	1,24	0	0	0,24	0,43	0,42	0,36
GV - V	5873	924	164	45,65	13,44	3,7	1,7	1,06	0,63	0	0,61	0,36	0,43	0,59	0,24
GV - V	5950	842	135,3	36,84	8,69	2,83	1,24	1,04	0,64	0,09	0,23	0,15	0	0,31	0
Gentamicinfreisetzung															
G	3052	311	29,7	6,38	2,17	0,49	0,6	0,22	0,3	0,18	0,17	0,09	0,24	0	0,07
G	2726	286	24,5	4,91	1,44	0,46	0,43	0	0,2	0,01	0,08	0,11	0,09	0,01	0
G	3605	347	35,9	7,59	2,47	1,06	0,68	0,14	0,27	0,17	0,06	0,16	0,15	0	0
GV - G	2737	293	23,2	5,46	1,73	0,85	0,44	0	0,22	0,15	0,21	0,11	0,08	0,0	0
GV - G	2890	386	43,7	12,39	4,1	1,61	0,9	0,28	0,33	0,16	0,2	0,32	0,12	0,17	0,17
GV - G	2850	398	35,3	8,86	2,97	1,28	0,62	0,15	0,29	0,24	0,18	0,13	0,06	0	0
V: Vancomycin, G: Gentamicin, GV: Gentamicin + Vancomycin															

Tabelle 5.1: Vancomycin - und Gentamicinfreisetzung bei Pulverbeladung Tag 1 - 15;

V: Vancomycin, G: Gentamicin

Abbildung 5.1. zeigt die jeweilig freigesetzte Vancomycin - bzw. Gentamicinkonzentration über einen Zeitraum von 15 Tagen bei Pulverbeladung. Die Tabelle stellt die absoluten Tageswerte der einzelnen Beladungsmethoden im Vergleich dar. Der zeitliche Verlauf wird in den Zeilen angegeben, die Spalten listen die verschiedenen Imprägnationsverfahren auf. Zunächst werden die Vancomycinwerte der Pulverbeladung miteinander verglichen: 3 Ansätze monoantibiotisch mit Vancomycin (V), nachfolgend biantibiotisch zusätzlich mit Gentamicin (GV). Der zweite Abschnitt der Tabelle zeigt in gleicher Reihenfolge die Freisetzung von Gentamicin bei zunächst monoantibiotischer Beladung und später in Kombination.

### 5.1.2 Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmenge

Tabelle 5.2. vergleicht die absolut und relativ freigesetzten Gesamtmengen nach 15 Tagen zwischen Vancomycin und Gentamicin bei Pulverbeladung. Dargestellt werden die absolute Gesamtmenge über 15 Tage, die relativen Werte in Bezug zur verwendeten Ausgangsmenge und die relativen Werte nach den ersten 24 Stunden der Messung.

Die Tabelle weist höhere Gesamtwerte bei der Pulverbeladung unter Vancomycinverwendung (216550,4 - 289791,2  $\mu\text{g}$ ) als bei Beladung mit Gentamicin (121769,6 - 160026  $\mu\text{g}$ ) auf. Unter den verschiedenen Beladungsmethoden konnte kaum ein agonistischer Effekt bei biantibiotischer Beladung detektiert werden:

Mittelwert Vancomycin monoantibiotisch in Pulver: 257281,6  $\mu\text{g}$

Mittelwert Vancomycin biantibiotisch in Pulver: 283380,7  $\mu\text{g}$

Mittelwert Gentamicin monoantibiotisch in Pulver: 139303,5  $\mu\text{g}$

Mittelwert Gentamicin biantibiotisch in Pulver: 129346,4  $\mu\text{g}$ .

Ausgehend von der Ausgangsmenge wurden 94,15 % - 125,99 % Vancomycin und 66,17 % - 86,97 % Gentamicin im gesamten Versuchszeitraum freigesetzt. Das Maximum der Freisetzung erfolgte in den ersten 24 h. Zwischen 81,70 % und 89,87 % der Vancomycinausgangsmenge wurden bei der Pulverbeladung innerhalb des ersten Tages an das Versuchsvolumen abgegeben. Ähnliche Werte zeigte die freigesetzte Gentamicinmenge relativ zur Ausgangsdosis innerhalb des ersten Tages: Hier wurden am ersten Tag 86,41 % - 90,11 % der ursprünglich verwendeten Menge im Versuchsvolumen bestimmt.

	Absolute Gesamtmenge	% der Ausgangsmenge	Relativer Wert nach 24 h
<b>Vancomycin</b>			
V	279890,8 $\mu\text{g}$	121,6 %	85,50 %
V	275446,4 $\mu\text{g}$	119,70 %	81,70 %
V	216550,4 $\mu\text{g}$	94,15 %	85,07 %
V (GV)	289791,2 $\mu\text{g}$	125,99 %	89,87 %
V (GV)	281176,4 $\mu\text{g}$	122,25 %	83,54 %
V (GV)	279174,4 $\mu\text{g}$	121,38 %	85,25 %
<b>Gentamicin</b>			
G	136144,4 $\mu\text{g}$	73,97 %	89,68 %
G	121769,6 $\mu\text{g}$	66,17 %	89,54 %
G	160026 $\mu\text{g}$	86,97 %	90,11 %
G (GV)	122498 $\mu\text{g}$	66,57 %	89,37 %
G (GV)	133618 $\mu\text{g}$	72,61 %	86,51 %
G (GV)	131923,2 $\mu\text{g}$	71,69 %	86,41 %
V: Vancomycin, G: Gentamicin, GV: Vancomycin + Gentamicin			

Tabelle 5.2: Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmenge bei Pulverbeladung nach 15 Tagen

Verglichen werden untereinander die Vancomycinfreisetzung bei Pulverbeladung mit reiner

Vancomycinverwendung (V) sowie biantibiotisch (GV) und die Gentamicinfreisetzung zunächst mono - (G) dann biantibiotisch (GV).

### 5.1.3 Minimale Hemmkonzentration

Tabelle 5.3. vergleicht die verschiedenen Beladungsverfahren der Antibiotika in Pulverform hinsichtlich des Erreichens der Minimalen Hemmkonzentration (MHK). Für Vancomycin wurde dieser Wert auf  $< 5 \mu\text{g/ml}$ , für Gentamicin auf  $< 2 \mu\text{g/ml}$  definiert [Kelm 2004].

Werte unterhalb der Minimalen Hemmkonzentration, also geringer  $5 \mu\text{g/ml}$  wurden bei der Pulverbeladung mit Vancomycin erstmals nach 6 - 7 Tagen gemessen. Bei gleichzeitiger Beladung mit beiden Antibiotika wurde die MHK ebenfalls am 6. Tag erreicht. Die mit Gentamicin imprägnierten Transplantate lieferten ähnliche Werte. Der Median lag bei 6 Tagen suffizienter Freigabe des Antibiotikums sowohl bei monoantibiotischer Beladung als auch in Kombination.

Beladungsmethode	MHK am Tag
V (V-P)	6. [6-7]
V (GV-P)	6. [6-6]
G (G-P)	6. [5-6]
G (GV-P)	6. [5-6]
V: Vancomycin, G: Gentamicin, P: Pulver	

Tabelle 5.3: Dauer der suffizienten Freisetzung bei Pulverbeladung

Dargestellt werden von oben nach unten zunächst die Ergebnisse der monoantibiotisch mit Vancomycin (V - P) und biantibiotisch mit Gentamicin und Vancomycin (GV - P) beladenen Knochentransplantate, anschließend analog dazu die Resultate unter Verwendung von Gentamicin (G - P, GV - P). Die zweite Spalte benennt den Tag, an welchem Werte unterhalb der MHK erreicht werden. Die erste Ziffer ist der Median der drei jeweiligen Ansätze. In eckigen Klammern wird die Spannbreite aus den drei Parallelversuchen angegeben.

### 5.1.4 Mathematische Formel zur Freisetzungskinetik

In den folgenden Abbildungen sind die jeweiligen Freisetzungsmuster der beiden Antibiotika in Pulverform bei den unterschiedlichen Beladungsverfahren in einem Balkendiagramm dargestellt. Verwendet wurde jeweils der Medianwert aus den 3 Parallelversuchen jeder Methode (blauer Balken). Anhand der dargestellten Säulen wurde anschließend eine Trendlinie (rot) erstellt. Die daraus mittels Excel<sup>®</sup> errechnete Formel zur Freisetzungskinetik der Antibiotika wird jeweils unterhalb der Bildunterschrift angegeben. Die Variable  $x$  in der Gleichung kann durch Tag 1 bis Tag 15 der Versuchsreihe ersetzt werden. Demzufolge kann anhand der Formel durch Ersetzen der Variable durch jeden beliebigen Tag der Trendlinienwert des eingesetzten Tages errechnet werden.

Abbildung 5.1. zeigt das Vancomycinfreisetzungsmuster bei monoantibiotischer Beladung. Das Diagramm verdeutlicht die hohen am ersten Tag freigesetzten Antibiotikakonzentrationen und den stetigen Abfall in den nächsten Tagen. Der Pfeil zeigt auf der Zeitachse den jeweiligen Tag des Unterschreitens der MHK (Medianwert der 3 Parallelversuche) auf.

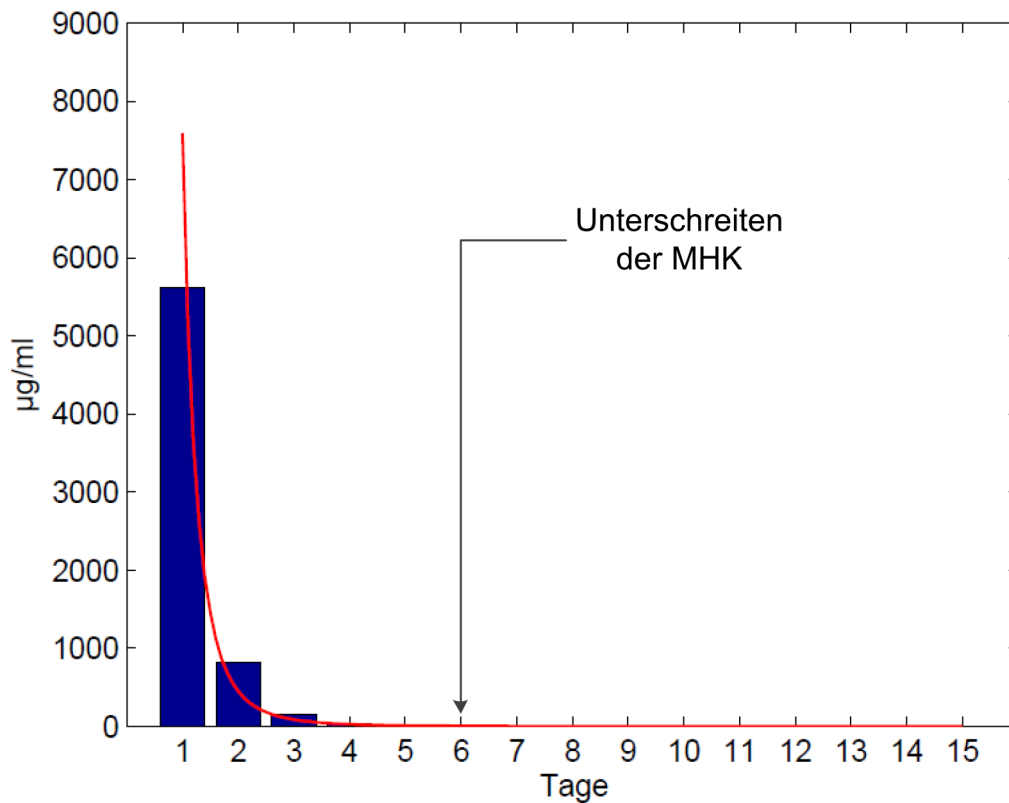


Abbildung 5.1: Freisetzungskinetik Vancomycin in Pulver

$$\text{Formel zur Freisetzungskinetik: } 7589,4x^{-4,071}$$

Abbildung 5.2. zeigt analog dazu den Verlauf der Vancomycinfreisetzung über den Versuchszeitraum von 15 Tagen bei biantibiotischer Beladung in Pulverform. Auch hier erfolgte nach Auftragen der Medianwerte in ein Balkendiagramm die Erstellung einer Trendlinie. Die daraus errechnete Formel wird unterhalb der Bildunterschrift dargestellt. Anhand des Pfeils ist eine Unterschreitung der MHK am 6. Tag der Versuchsreihe zu erkennen.



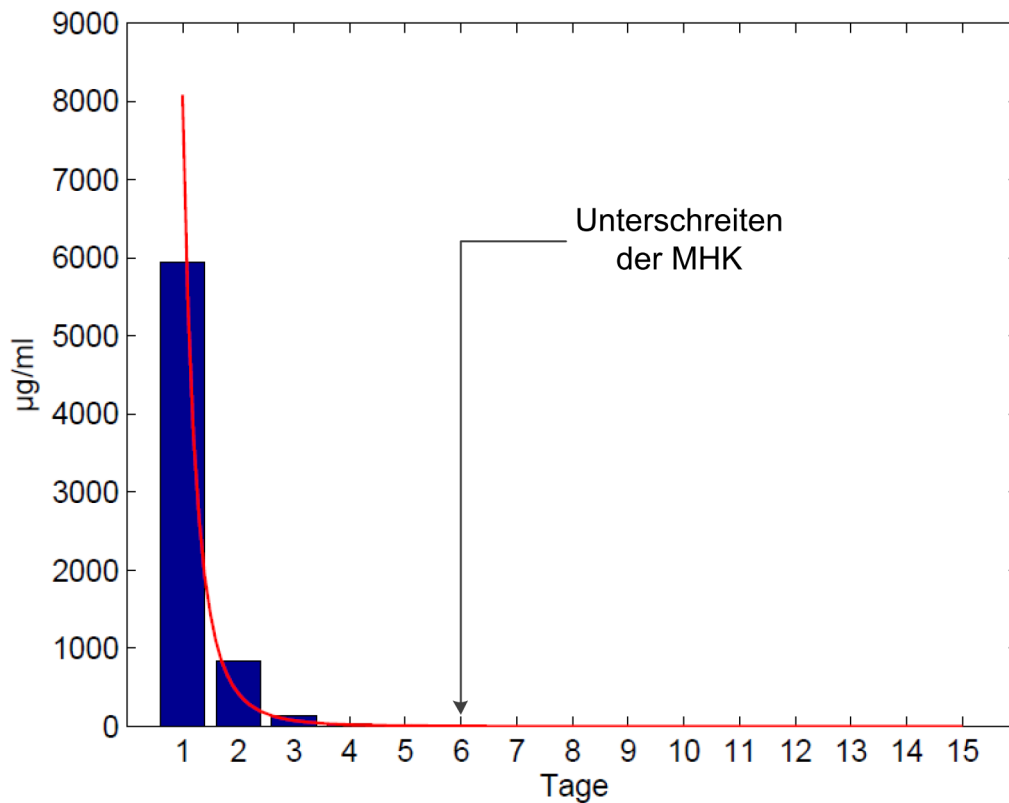


Abbildung 5.2: Freisetzungskinetik Vancomycin bei zusätzlicher Beladung mit Gentamicin in Pulver

Formel zur Freisetzungskinetik:  $8082x^{-4,253}$

Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte haben wir im Folgenden die beiden Gleichungen der Vancomycin - Pulvergruppe in Relation zueinander gesetzt. Durch Division der ersten Zahlenkomponenten aus beiden Formeln erhalten wir einen Quotienten, der uns das Freisetzungsverhältnis der mono - gegenüber der biantibiotischen Beladungsformen aufzeigt: Der Quotient der monoantibiotischen Beladung von Vancomycinpulver zur biantibiotischen Imprägnation beträgt 0,94. Es wird also im Verhältnis 0,94 - mal soviel Vancomycin freigesetzt bei monoantibiotischer Beladung als unter Verwendung in Kombination.

In den folgenden Abbildungen ist die Freisetzungskinetik der unterschiedlichen Behandlungsverfahren mit Gentamicin bei Pulverbeladung dargestellt. Aufgetragen werden auch hier die Medianwerte in  $\mu\text{g/ml}$  auf die Zeit. Zur besseren Vergleichbarkeit ist der Maßstab in jedem dieser Balkendiagramme unabhängig der Höhe der Ergebnisse identisch gewählt. Dadurch ist es möglich, im direkten Vergleich mit der Vancomycindarstellung die niedrigeren Konzentrationen

in der Gentamicinauswertung bei der Pulverbeladung zu verdeutlichen. Der Trendlinienverlauf stellte sich in allen Grafiken unabhängig der verwendeten Beladungsart ähnlich dar.

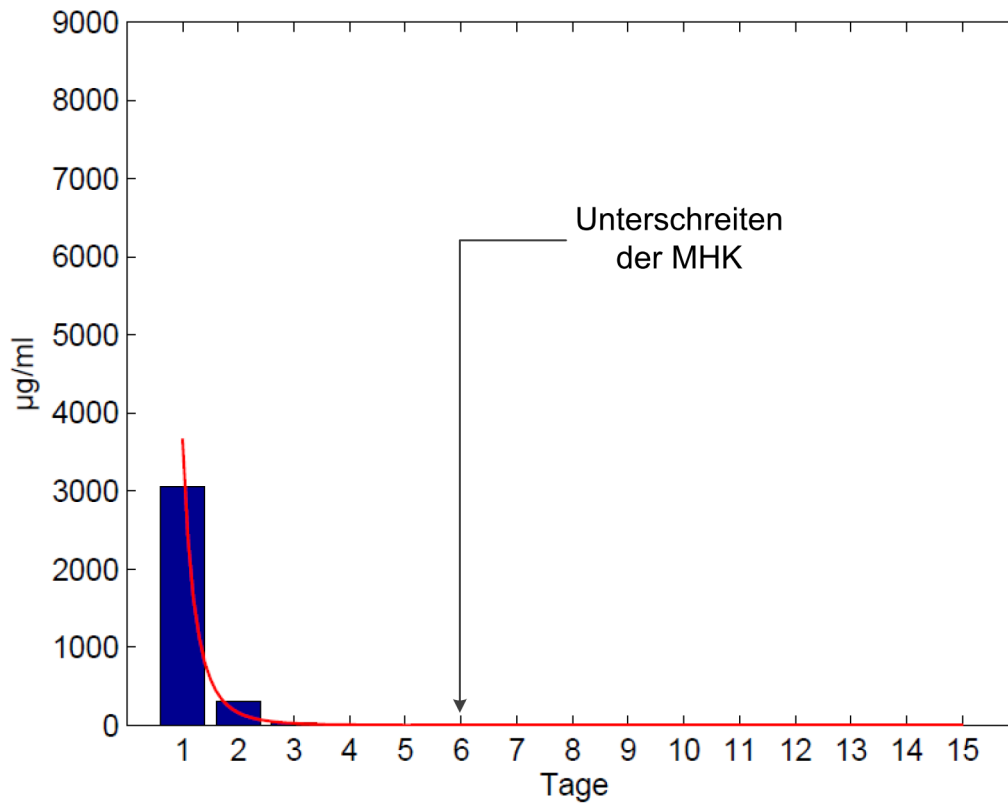


Abbildung 5.3: Freisetzungskinetik Gentamicin in Pulver

$$\text{Formel zur Freisetzungskinetik: } 3672x^{-4,497}$$

Abb. 5.3. zeigt den zeitlichen Verlauf der Gentamicinfreisetzung bei monoantibiotischer Pulverbeladung in graphischer Form. Ein Unterschreiten der MHK für Gentamicin wurde am 6. Tag (Medianwert) ermittelt.

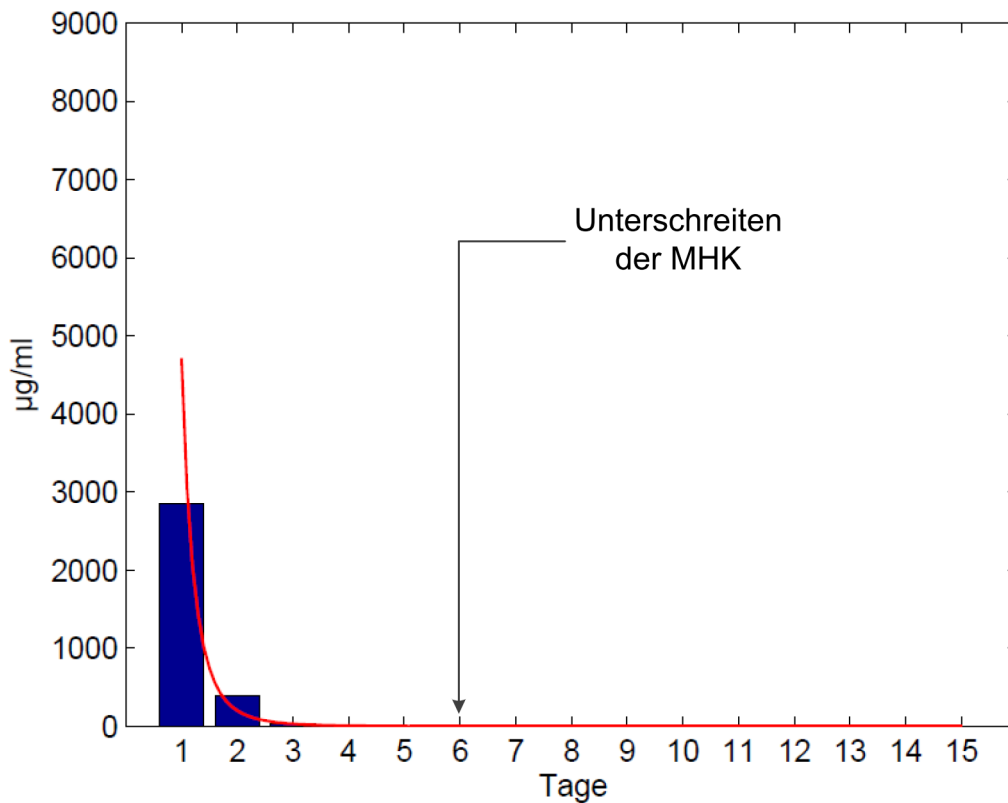


Abbildung 5.4: Freisetzungskinetik Gentamicin bei zusätzlicher Beladung mit Vancomycin in Pulver

Formel zur Freisetzungskinetik:  $4715,2x^{-4,542}$

Ähnlich der monoantibiotischen Beladung (Abb. 5.3.) zeigt sich die Freisetzung von Gentamicin bei biantibiotischer Beladung. Auch in dieser Versuchsreihe wurde die MHK durchschnittlich am 6. Tag unterschritten.

Das Verhältnis der Gentamicinfreisetzung in Pulverform mono - zu biantibiotisch beträgt 0,78. Es zeigt sich also, dass die Beladung von Gentamicin alleine nur das 0,78 - fache der freigesetzten Menge an Gentamicin bei Beladung mit beiden Antibiotika beträgt.

## 5.2 Lösungsbeladung

### 5.2.1 Absolute Tageswerte

Die höchsten Konzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden zeigten die lösungsimprägnierten Ansätze unter alleiniger Vancomycinverwendung (7891  $\mu\text{g/ml}$ , 8754  $\mu\text{g/ml}$ , 8096  $\mu\text{g/ml}$ ). Wurde bei gleicher Beladungsart zusätzlich Gentamicin verwendet, lagen die gemessenen Werte deutlich niedriger (3148 - 6032  $\mu\text{g}$  Vancomycin/ml am ersten Tag). Die größten absoluten Tageswerte wurden bei allen Vancomycinansätzen innerhalb der ersten 24 Stunden verzeichnet. Im weiteren Verlauf der Messungen verringerte sich die Freisetzung.

Auch die Gentamicinansätze zeigten höchste Konzentrationen innerhalb des ersten Tages. Die monoantibiotisch beladenen Transplantate waren auch hier vorteilhaft gegenüber der Beladung in Kombination. Die lösungsimprägnierten Transplantate unter alleiniger Gentamicinverwendung wiesen die höchsten absoluten Konzentrationen auf (6024 - 7164  $\mu\text{g/ml}$  am ersten Tag). Die Ergebnisse der übrigen Beladungsmethoden nach 24 Stunden fielen deutlich geringer aus (2003 - 3657  $\mu\text{g/ml}$ ). Ähnlich der mit Vancomycin beladenen Transplantate zeigte sich auch hier ein Abfall der freigesetzten Gentamicinmenge im weiteren Verlauf.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
Vancomycinfreisetzung															
V	7891	2146	464,7	150,92	67,06	29,91	17,2	9,49	7,04	4,92	3,43	2,21	2,17	2,57	1,1
V	8754	2381	430,8	125,49	43,15	16,49	6,93	3,72	2,86	1,95	0,96	1,43	0,65	1,61	0,67
V	8096	1556	275,4	95,78	54,93	29,39	16,81	9,8	6,3	3,88	2,59	1,37	1,03	0,93	0,15
GV - V	5231	1030	216	88,75	45,04	22	13,39	7,94	5,96	4,14	3,55	1,86	2,09	2,15	1,52
GV - V	3148	814	177,5	81,91	50,59	27,75	21,42	14,75	13,79	9,32	7,57	3,09	5,77	4,67	2,41
GV - V	6032	806	162	58,67	20,01	10,19	5,65	2,81	2,71	1,1	0,83	1,05	1,07	0,93	0,35
Gentamicinfreisetzung															
G	6024	988	90	22,29	9,01	4,3	2,96	2,09	1,32	1,15	0,97	0,43	0,47	0,37	0,37
G	6074	1000	97,4	29,18	11,86	5,6	3,86	2,17	1,57	1,23	1,03	0,71	0,47	0,41	0,41
G	7146	1282	197,6	83,4	28,4	13,82	8,64	5,45	3,24	2,87	2,27	1,32	0,85	0,62	0,62
GV - G	3281	631	91,1	30,28	14,33	7,48	4,87	2,39	1,44	1,11	0,84	0,5	0,55	0,39	0,39
GV - G	2003	512	76,1	28,27	13,57	6,62	3,86	1,95	1,23	0,96	0,82	0,39	0,63	0,33	0,33
GV - G	3657	492	66,1	19,54	6,81	3,7	2,2	1,07	0,81	0,7	0,57	0,45	0,41	0,33	0,33

V: Vancomycin, G: Gentamicin, GV: Gentamicin+Vancomycin

Tabelle 5.4: Vancomycin - und Gentamicinfreisetzung bei Lösungsbeladung Tag 1- 15

Tabelle 5.4. zeigt die absolut freigesetzten Tageswerte bei Lösungsbeladung. Verglichen werden die verschiedenen Imprägnationsmethoden von Tag 1 bis Tag 15. In den ersten 6 Zeilen sind die Ergebnisse der Vancomycinfreisetzung aufgeführt, zunächst bei alleiniger Beladung (V), nachfolgend die drei Parallelversuche der Kombination mit Vancomycin und Gentamicin (GV). Die

untere Tabellenhälfte stellt analog dazu die Ergebnisse der lösungsimprägnierten Gentamicintransplantate dar.

### 5.2.2 Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmenge

In Lösung monoantibiotisch mit Vancomycin beladene Transplantate zeigten die größte absolut freigesetzte Gesamtmenge über 15 Tage (431988,8  $\mu\text{g}$ , 470868,4  $\mu\text{g}$  und 406014,4  $\mu\text{g}$ ). Die eruierten Werte der übrigen Versuche lagen ausnahmslos deutlich unterhalb dieser Ergebnisse (106002,4  $\mu\text{g}$  - 351084  $\mu\text{g}$ ). Wurden die Knochentransplantate alleinig mit gelöstem Vancomycin beladen, lag der Mittelwert der freigesetzten Vancomycinmenge über 15 Tage bei 436290,5  $\mu\text{g}$ . Bei zusätzlicher Gentamicinverwendung in Lösung wurden im Mittel nur 242177,3  $\mu\text{g}$  Vancomycin im Verlauf abgegeben. Es zeigte sich ein antagonistischer Effekt bei Beladung in Kombination, der sich in Lösungsbeladung auch bei Gentamicin zeigte: Wurde alleinig Gentamicin in Lösung gebracht, ergab dies höhere Werte als bei der biantibiotischen Beladung der Transplantate:

Mittelwert Gentamicin in Lösung: 308729,7  $\mu\text{g}$

Mittelwert Gentamicin biantibiotisch in Lösung: 146263,3  $\mu\text{g}$

Im Lösungsansatz wurden monoantibiotisch zwischen 8,93 % und 10,97 % der anfangs eingesetzten Gentamicinmenge freigesetzt, biantibiotisch 3,31 % - 5,31 %. Der weitaus größte Teil löste sich innerhalb der ersten 24 Stunden aus dem Transplantat. Ausgehend von der verwendeten Ausgangsmenge konnten von monoantibiotisch beladenen Vancomycintransplantaten 10,15 - 11,77 % freigesetzt werden, biantibiotisch beladene lieferten 4,38 % - 7,10 % der Ausgangsmenge. Der größte Teil wurde innerhalb der ersten 24 Stunden freigesetzt (71,83 % - 84,89 %). Auch mit Gentamicin beladene Transplantate zeigten höhere relative Werte unter alleiniger Verwendung als bei Beladung in Kombination mit Vancomycin. Zwischen 75,58 % und 86 % wurden am ersten Tag im Versuchsvolumen gefunden.

	Absolute Gesamtmenge	% der Ausgangsmenge	Relativer Wert nach 24 h
Vancomycin			
V	431988,8 $\mu\text{g}$	10,79 %	73,06 %
V	470868,4 $\mu\text{g}$	11,77 %	74,36 %
V	406014,4 $\mu\text{g}$	10,15 %	79,76 %
V (GV)	267015,6 $\mu\text{g}$	6,67 %	78,36 %
V (GV)	175301,6 $\mu\text{g}$	4,38 %	71,83 %
V (GV)	284214,8 $\mu\text{g}$	7,10 %	84,89 %
Gentamicin			
G	285909,2 $\mu\text{g}$	8,93 %	84,27 %
G	289196 $\mu\text{g}$	9,03 %	84,01 %
G	351084 $\mu\text{g}$	10,97 %	81,41 %
G (GV)	162706,8 $\mu\text{g}$	5,08 %	80,66 %
G (GV)	106002,4 $\mu\text{g}$	3,31 %	75,58 %
G (GV)	170080,8 $\mu\text{g}$	5,31 %	86,00 %
V: Vancomycin, G: Gentamicin, GV: Vancomycin + Gentamicin			

Tabelle 5.5: Absolut und relativ freigesetzte Gesamtmengen bei Lösungsbeladung nach 15 Tagen

Tabelle 5.5. zeigt die absolute Gesamtmenge aus 15 Tagen bei Lösungsimprägnation, die relativen Werte bezugnehmend auf die Ausgangswerte sowie die relative Freisetzung nach 24 Stunden. Die obere Tabellenhälfte stellt die Beladung mit Vancomycin zunächst monoantibiotisch (V) und dann in Kombination dar (GV), im unteren Abschnitt in gleicher Reihenfolge die Beladung mit Gentamicin.

### 5.2.3 Minimale Hemmkonzentration

Aus Tabelle 5.6. wird das Erreichen der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der verschiedenen Beladungsmethoden ersichtlich.

Die in Antibiotikallösung mit Vancomycin behandelten Transplantate lieferten suffiziente Konzentrationen über einen längeren Zeitraum. Im Median konnten ausreichende Konzentrationen

bis zum 10. Tag erreicht werden, sowohl mono - als auch biantibiotisch. Unter die MHK von Gentamicin fielen zwischen dem 9. und 12. Tag monoantibiotisch mit Gentamicin beladene Transplantate und zwischen dem 8. und 9. Tag biantibiotisch in Kombination mit Vancomycin beladene Ansätze.

Beladungsmethode	MHK am Tag
V (V-L)	10. [8-10]
V (GV-L)	10. [8-12]
G (G-L)	9. [9-12]
G (GV-L)	8. [8-9]
V: Vancomycin, G: Gentamicin, P: Pulver, L: Lösung	

Tabelle 5.6: Dauer der suffizienten Vancomycinfreisetzung bei Lösungsbeladung

Untereinander werden die Lösungsbeladung monoantibiotisch mit Vancomycin (V - L) und in Kombination (GV - L) sowie die Gentamicinbeladung monoantibiotisch (G - L) als auch biantibiotisch (GV - L) dargestellt. In der zweiten Spalte ist zunächst der Median aus den drei identisch beladenen Parallelversuchen dargestellt, in eckigen Klammern der kürzeste beziehungsweise längste Verlauf bis zum Erreichen der MHK.

#### 5.2.4 Mathematische Formel zur Freisetzungskinetik

Die Abbildungen 5.5. und 5.6. zeigen den zeitlichen Verlauf der Vancomycinfreisetzung in der Lösungsgruppe. Ebenso wie in den vorigen Diagrammen erstellten wir auch hier zunächst eine Trendlinie und aus dieser die mathematische Formel zur Freisetzungskinetik. Die Variable stellt den jeweiligen Tag dar, der negative Exponent gibt die negative Steigung an. Analog der Gentamicin-Gruppe setzten wir auch die Ergebnisse der Vancomycinfreisetzung in Relation. Durch Division der beiden ersten Komponenten wurde das Verhältnis der Freisetzung von monoantibiotisch gelöstem Vancomycin zu biantibiotisch verwendetem errechnet: Verglichen mit der biantibiotischen Beladung wurde unter alleiniger Vancomycinverwendung die 2,9 - fache Menge an Antibiotikum freigesetzt.

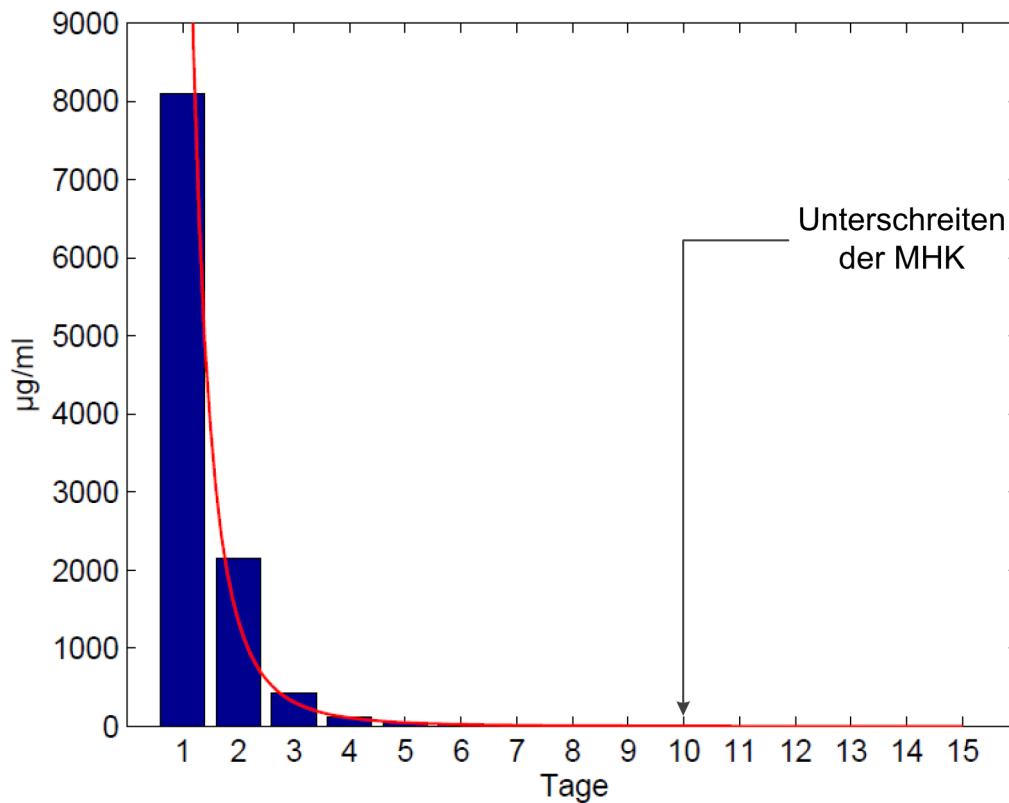


Abbildung 5.5: Freisetzungskinetik Vancomycin in Lösung

$$\text{Formel zur Freisetzungskinetik: } 16807x^{-3,631}$$

Abbildung 5.5. stellt den zeitlichen Verlauf der monoantibiotischen Vancomycinfreisetzung bei Lösungsbeladung dar. Man erkennt die hohen initial freigesetzten Werte und die Freisetzung über einen längeren Zeitraum im Vergleich zur biantibiotischen sowie zur Pulverbeladung. Die MHK wurde in dieser Versuchsreihe im Median am 10. Tag unterschritten.



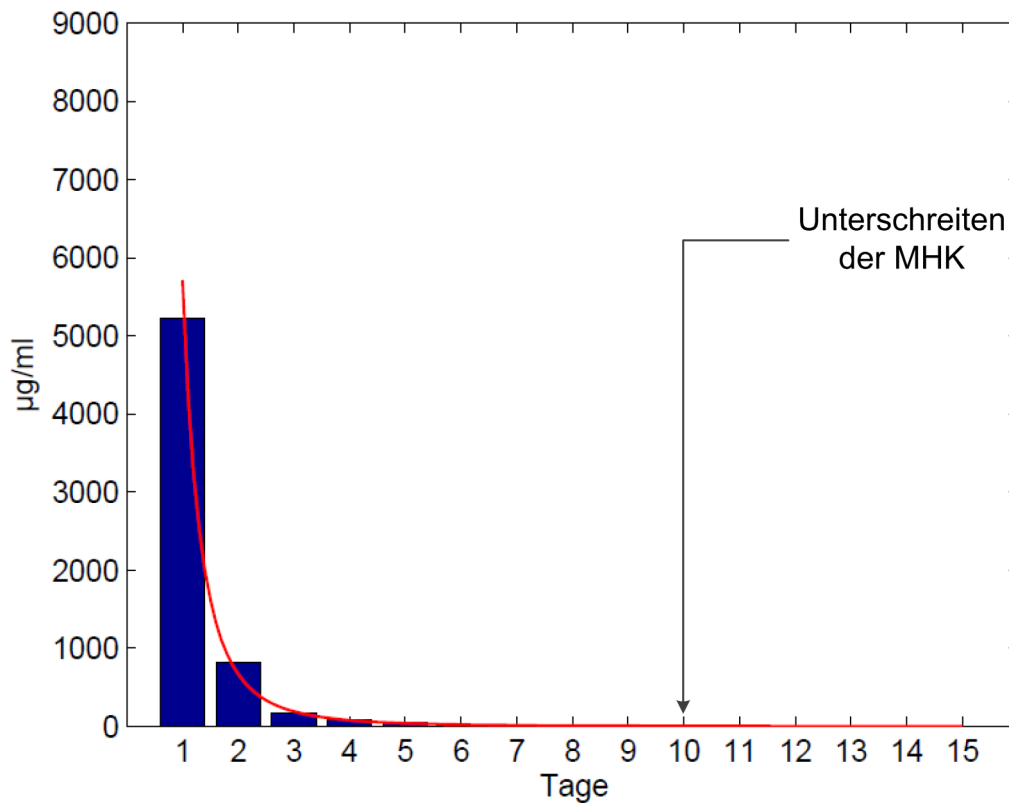


Abbildung 5.6: Freisetzungskinetik Vancomycin bei zusätzlicher Beladung mit Gentamicin in Lösung

Formel zur Freisetzungskinetik:  $5714,2x^{-3,094}$

In Abb. 5.6. kann man den zeitlichen Verlauf der Vancomycinfreisetzung bei biantibiotischer Lösungsbeladung nachvollziehen. Analog der monoantibiotischen Beladung in Lösung konnten auch hier Werte oberhalb der MHK bis zum 10. Tag erreicht werden.

In den folgenden zwei Abbildungen werden die Ergebnisse der Gentamicinfreisetzung von Tag 1 - Tag 15 graphisch dargestellt.

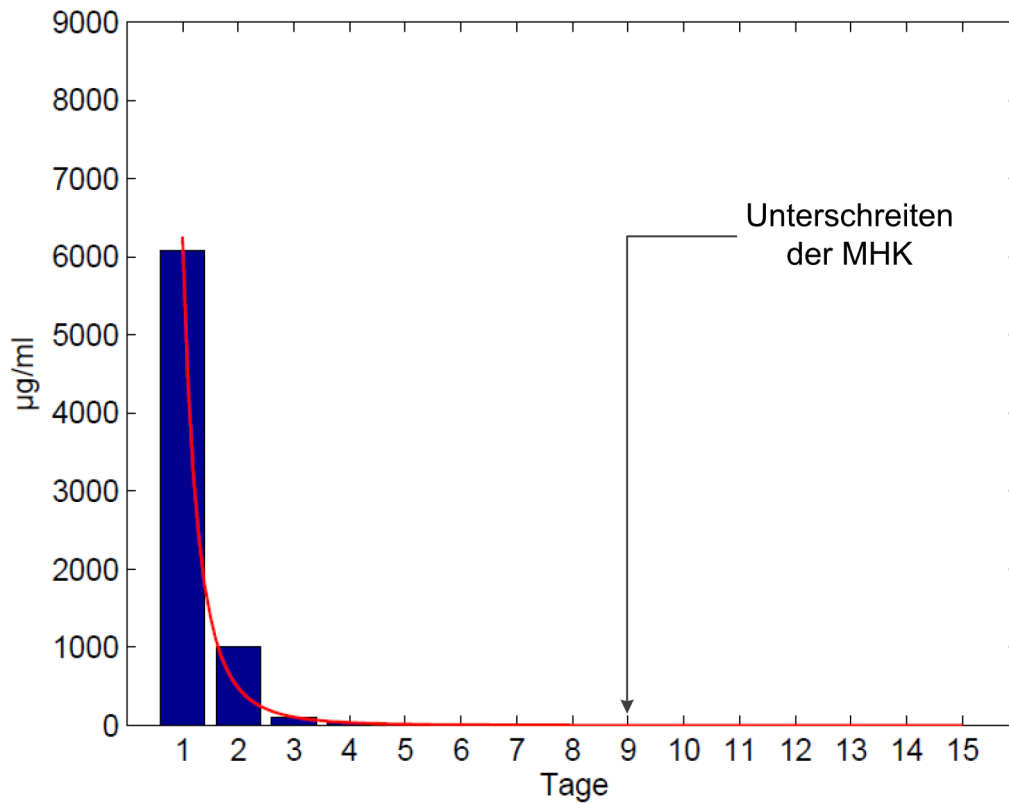


Abbildung 5.7: Freisetzungskinetik Gentamicin in Lösung

$$\text{Formel zur Freisetzungskinetik: } 6258,8x^{-3,707}$$

Abb. 5.7. zeigt die Freisetzung von Gentamicin in Lösung bei monoantibiotischer Beladung. Man erkennt hohe initial freigesetzte Mengen mit raschem Abfall und Werten oberhalb der MHK für Gentamicin bis zum 9. Tag.

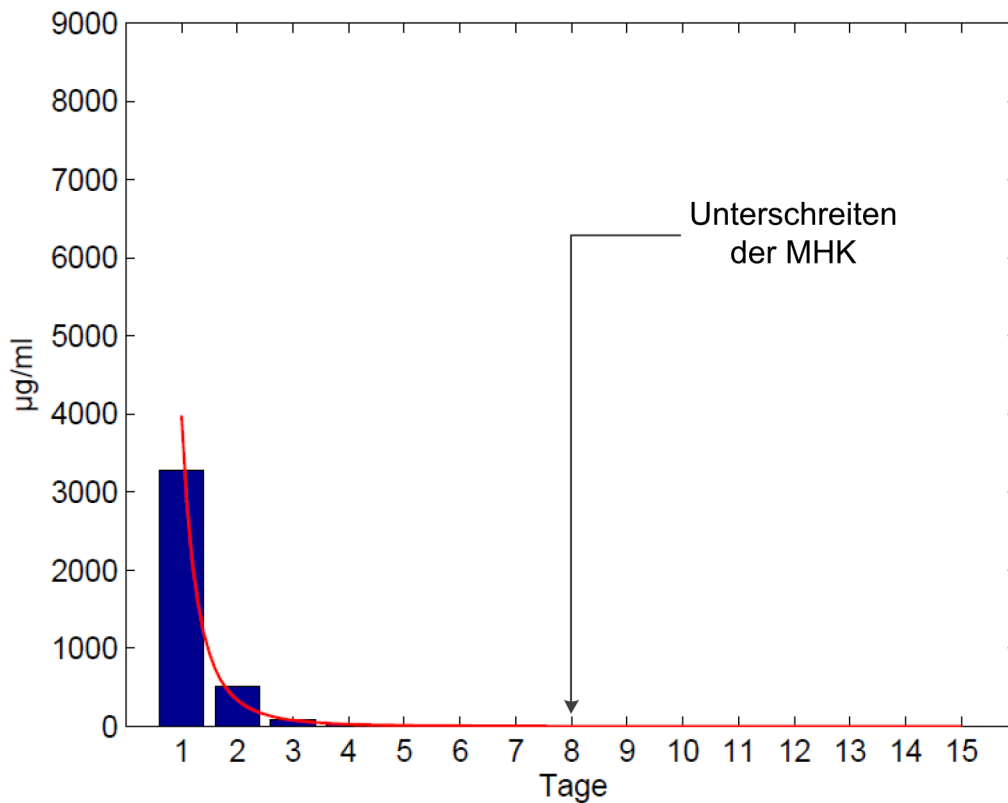


Abbildung 5.8: Freisetzungskinetik Gentamicin bei zusätzlicher Beladung mit Vancomycin in Lösung

Formel zur Freisetzungskinetik:  $3979,2x^{-3,565}$

Analog dazu ist in Abb. 5.8. die Gentamicinfreisetzung bei biantibiotischer Beladung in Lösung dargestellt. Zu erkennen sind initial niedrigere Werte und ein Unterschreiten der MHK am 8. Tag.

Das Verhältnis der freigesetzten Menge Gentamicin mono - zu biantibiotisch in Lösung zeigt sich auch hier zugunsten der monoantibiotischen Beladung: Unter alleiniger Gentamicinverwendung wurde in der Lösungsgruppe 1,6 - mal so viel Gentamicin freigesetzt wie unter biantibiotischer Beladung.

### 5.3 Vergleich

Nach Beladung der Transplantate in Vancomycinlösung zeigten sich die höchsten maximalen Tageskonzentrationen im Versuchsvolumen (7891 - 8754  $\mu\text{g/ml}$ ), ebenso wie die längste suffiziente Freisetzung (8. - 10. Tag monoantibiotisch, 8. - 12. Tag biantibiotisch).

Mehrmalig gemessene Werte unterhalb der jeweiligen Minimalen Hemmkonzentration (MHK) (Vancomycin  $< 5 \mu\text{g/ml}$ ; Gentamicin  $< 2 \mu\text{g/ml}$ ) definierten das Ende der Messungen. Unterschritten wurde die MHK sowohl für Vancomycin als auch für Gentamicin bei der Beladung mit Pulver am 6. Tag [5. - 7. Tag] und zwischen dem 8. und 10. Tag [8. - 12. Tag] bei Imprägnierung in Lösung.

Abbildung 5.9. vergleicht die absolut freigesetzten Gesamtmenge der beiden Antibiotika bei verschiedenen Beladungsmethoden. Hierbei kann die höchste absolut freigesetzte Gesamtmenge im Lösungsansatz mit Vancomycin detektiert werden. Es konnten größere Differenzen zwischen den jeweiligen monoantibiotisch bzw. biantibiotisch beladenen Knochentransplantaten in Lösung vs. Pulver festgestellt werden: die absolut freigesetzte Gesamtmenge von Vancomycin und Gentamicin der in Lösung beladenen Ansätze war höher bei reiner monoantibiotischen Verwendung als bei den biantibiotisch beladenen Knochentransplantaten. Dieser Unterschied konnte in der Pulverbeladung nicht nachgewiesen werden. Es konnte somit kaum ein synergistischer Effekt zwischen Vancomycin und Gentamicin bei der Pulverimprägnation detektiert werden. Bei der Lösungsbeladung zeigte sich sogar ein antagonistischer Effekt sowohl für Vancomycin als auch für Gentamicin.

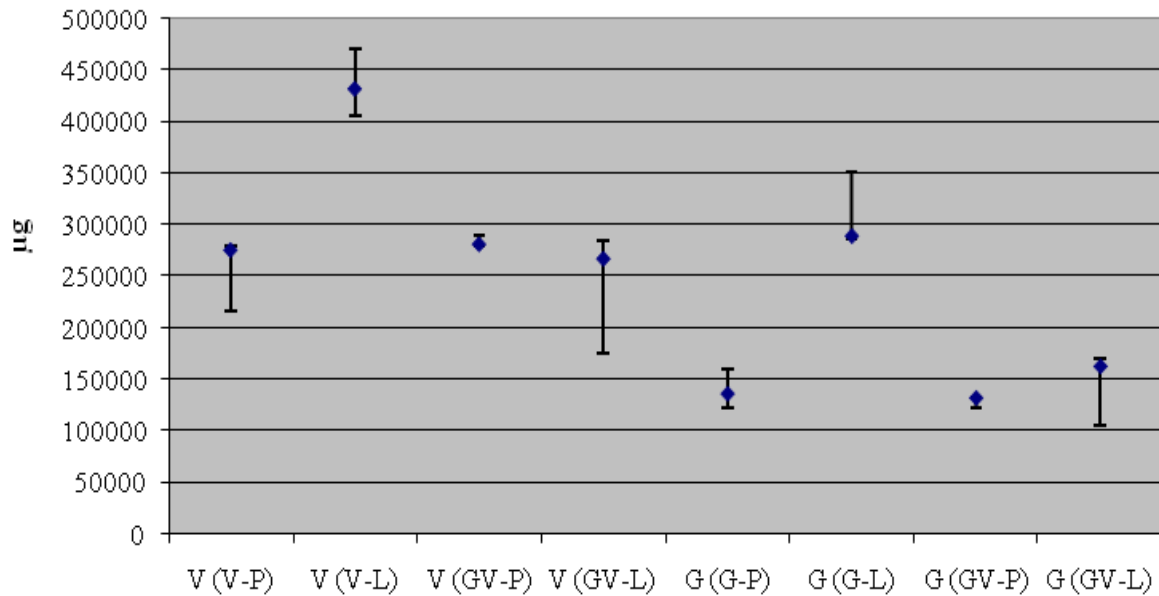


Abbildung 5.9: Übersicht der freigesetzten Gesamtmengen von Vancomycin und Gentamicin in Abhängigkeit von der Beladungsmethode

V = Vancomycin, G = Gentamicin, GV = Gentamicin + Vancomycin,

P = Pulver, L = Lösung

Median: blaue Markierung; Spannweite: Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Wert

Aufgetragen ist die Konzentration in  $\mu\text{g}$  auf der y - Achse gegenüber den Imprägnationsarten auf der x - Achse. Von links nach rechts sind notiert: die Werte der Vancomycinfreisetzung, zunächst monoantibiotisch in Pulver und Lösung (V - P, V - L), nachfolgend biantibiotisch in Pulver und Lösung (V (GV - P), V (GV - L)). Die folgenden 4 Balken beziehen sich auf die Gentamicinfreisetzung in gleicher Reihenfolge (G - P, G - L, G (GV - P), G (GV - L)). Blau markiert sind die Mediane der jeweiligen 3 Ansätze pro Methode. Der obere und untere Querstrich markiert den höchsten bzw. niedrigsten Wert (Spannweite).

In Tabelle 5.7. sind die relativ freigesetzten Antibiotikamengen der verschiedenen Beladungsverfahren abhängig vom Ausgangswert aufgeführt.

Die pulverimprägnierten Methoden zeigten höhere relative Werte als die Ansätze in Lösungsbeladung, unabhängig vom verwendeten Antibiotikum. Zwischen 94,15 % und 125,99 % der Ausgangsvancomycinmenge und zwischen 66,17 % und 86,97 % des anfänglich verwendeten

Gentamicin konnten nach 15 Tagen in der Pulvergruppe freigesetzt werden. In den Lösungsansätzen betragen die Werte für Vancomycin 4,38 % - 11,77 % und für Gentamicin 3,31 % - 10,97 %. Auffällig ist die Diskrepanz bei der Auswertung der relativen Gesamtmenge von Vancomycin bei der Pulverbeladung ( $> 100\%$ ). Diese Besonderheit ist vermutlich auf den multiplen Verdünnungseffekt zur Bestimmung der Proben in den ersten Tagen zurückzuführen. Trotz der hohen relativen Werte der Pulverbeladung zeigten sich niedrigere Maximalkonzentrationen als bei Lösungsbeladung

Maximalkonzentration Vancomycin: 8754  $\mu\text{g/ml}$  am 1. Tag aus V (V-L)

Maximalkonzentration Gentamicin: 7146  $\mu\text{g/ml}$  am 1. Tag aus G (G-L)

	V (V)	V(GV)
Pulver	119,7 [94,15 - 121,6] %	122,25 [121,38 - 125,99] %
Lösung	10,79 [10,15 - 11,77] %	6,67 [4,38 - 7,10] %
	G (G)	G (GV)
Pulver	73,07 [66,17 - 86,97] %	71,69 [66,57 - 72,61] %
Lösung	9,03 [8,93 - 10,97] %	5,08 [3,31 - 5,31] %
V: Vancomycin, G: Gentamicin, GV: Gentamicin+Vancomycin		

Tabelle 5.7: Relative Werte

Angegeben ist jeweils der Median und in eckigen Klammern der niedrigste bzw. höchste Wert jeder Versuchsanordnung.

Insgesamt zeigte die Beladung der Knochentransplantate mit Pulver eine ungünstigere Freisetzungskinetik als solche, die in Lösung gebracht wurden.

# Kapitel 6

## Diskussion

Trotz zahlreicher prophylaktischer Maßnahmen und technischer Fortschritte, bleibt die Knocheninfektion nach wie vor eine gefürchtete Komplikation in Orthopädie und Unfallchirurgie. Die Therapie solcher Infekte gestaltet sich schwierig.

So umfasst die Behandlung der Osteomyelitis die chirurgische Wundausräumung und eine anschließende Langzeitantibiotikatherapie. Metikulöses Debridement verringert die Erregerzahl und entfernt nekrotisches Gewebe. Das Immunsystem kann sich regenerieren und die Antibiotika können die Infektion bekämpfen. Solche Eingriffe lassen jedoch Knochendefekte zurück [Calhoun 2009], die unter Umständen die Stabilität beeinflussen. Zudem besteht die Gefahr einer systemischen Toxizität nach Langzeitantibiose [Kanellakopoulou 2010].

Auch beim Einsatz von künstlichen Gelenken birgt die spätere tiefe Wundinfektion trotz vielfältiger präventiver Strategien ein Risiko und ist einer der häufigsten Gründe für das Versagen des Implantates. Jährlich werden annähernd 209 000 Hüftgelenkarthroplastien in Deutschland durchgeführt [Krankenhausreport 2010] mit einer Infektionsrate von 1 - 2 %. Bei Revisionsoperationen ist ein Anstieg dieser Zahlen möglich [Anagnostakos 2006]. Ebenso könnte die längere Lebensdauer der Implantate und das Follow - up über einen größeren Zeitraum höhere Werte hervorbringen [Anagnostakos 2009 II]. Dale et al. stellten in ihrer Studie einen Anstieg der Infektionen nach primärem Hüftgelenkersatz vor allem seit 2002 fest [Dale 2009]. Knieendothesen weisen eine höhere Infektionsrate als Hüftimplantate auf. Gründliches Debridement und systemische Antibiotikasubstitution alleine sind hierbei nicht ausreichend, um den Infektionsherd vollständig zu beseitigen [Winkler 2009].

Um dieses schwerwiegende Problem zu umgehen, hat in den letzten Jahren die Beladung von

Knochen-Transplantaten mit Antibiotika an Bedeutung gewonnen [Winkler 2008, Borkhuu 2008, Buttaro 2005, Chen 2005]. Vor allem gegen MRSA, als einer der häufigsten Erreger, gerichtete Antibiotika sollten Verwendung finden [Calhoun 2005, Kanellakopoulou 2000, Trampuz 2006]. Einen großen Vorteil bieten diese Knochen-Transplantate im Vergleich zu Zement oder Spacern, indem sie als Antibiotikaträger verwendet werden können, ohne in einer weiteren Operation wiederum entfernt werden zu müssen. Im Gegenteil: Zuvor mit Antibiotika beladene Knochen-Transplantate sind in der Lage, durch vorherige Operationen entstandene Defekte wieder aufzufüllen. Ein weiterer Nachteil von PMMA - Trägern ist die reduzierte biomechanische Stabilität nach Antibiotikabeladung [Baleani 2008, Klekamp 1999, Dunne 2008]. Ferner bietet die Beladung von Knochen mit Antibiotikum gegenüber der Beladung von Zement Vorteile in der höheren Speicherkapazität sowie in überlegenen pharmakokinetischen Eigenschaften: Antibiotika - Knochen - Gemische liefern mehr als 100 - fach höhere Konzentrationen und weisen eine effizientere Freisetzung über mehrere Wochen auf [Winkler 2009]. Buttaro et al. konstatierten in ihrer Studie 35 mal höhere Werte für Vancomycin aus Knochen als aus Zement [Buttaro 2007]. Damit vergleichbar hohe Werte erreicht werden, müssten 35 g Vancomycin 40 mg PMMA beigemischt werden. Solch hohe Dosen würden die mechanische Stabilität stark beeinträchtigen und zu systemischer Toxizität führen [Askew 1990, Klekamp 1999].

Seit de Grood 1947 erstmalig spongiösen Knochen mit Penicillin zur Behandlung einer Osteomyelitis beladen hat [De Grood 1947], ist eine Vielzahl an Studien über antibiotikahaltige Knochen-Transplantate erschienen [Witso 1999, Witso 2000, Buttaro 2003, Kanellakopoulou 2010, Winkler 2000]. Dennoch können aufgrund einer Vielzahl von möglichen Einflussparametern keine allgemein geltenden Schlüsse aus den bisherigen Quellen gezogen werden: den in - vitro - / in - vivo Untersuchungsbedingungen, der Art und Dosis der hinzugefügten Antibiotika, der Art und geometrischen Form des Knochens, des Beladungsverfahrens sowie der Beladungszeit. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, möglichst viele dieser Einflussgrößen zu berücksichtigen.

Unsere Wahl fiel auf diese beiden Antibiotika, da sie zur Imprägnation lokaler Antibiotikaträger häufig Anwendung finden und somit schon große Erkenntnisse über deren pharmakokinetisches Profil erlangt worden sind. Sie besitzen ein breites Wirkungsspektrum und gute Freisetzungskinetik sowie einen nachgewiesenen synergistischen Effekt unter Verwendung auf anderen Trägern [Anagnostakos 2005]. Vancomycin gehört zu den bisher am Besten untersuch-



ten Antibiotika. Es zeigt vor allem Effektivität gegen grampositive Keime, auch gegen MRSA. Zudem ist es zur Bekämpfung von biofilmgeschützten Kolonien wirksam. Außerdem weist Vancomycin die geringsten zytotoxischen Effekte verglichen mit allen bisher gebräuchlichen Antibiotika auf [Edin 1996] und bringt nach lokaler Applikation keine systemischen Wirkungen hervor [Buttaro 2005 III]. Die sehr geringe Gewebepenetration [Matzke 1986, Garazzino 2008] stellt bei der intravenösen Gabe einen Nachteil dar [Skhirtladze 2006, Deresinski 2007]. Bei Beladung von Vancomycin auf Knochen und dessen Einbau ist diese Eigenschaft jedoch eine hervorragende Möglichkeit, lokal hohe Konzentrationen bei geringem systemischen Spiegel zu erreichen [Winkler 2009].

Gentamicin ist ein Breitspektrumantibiotikum sowohl gegen gramnegative als auch gegen grampositive Keime. Es beweist rasche bakterizide Wirkung auch gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*. Gentamicin besitzt nur ein geringes allergisches Potential. Es ist hitzeresistent und weist nur eine geringe Penetration durch biologische Membranen auf.

Die Versuche fanden unter standardisierten in - vitro - Bedingungen statt, die bereits mehrmals zur Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften von lokalen Antibiotikaträgern Anwendung gefunden haben [Anagnostakos 2005, Winkler 2000]. Getestet wurde die Freisetzungskinetik von Vancomycin -, Gentamicin - und Vancomycin - Gentamicin - beladenen Transplantaten mit zwei unterschiedlichen Imprägnationsmethoden.

Die Beladung der Transplantate erfolgte unter Simulation von Operationsbedingungen, sodass eine Übertragbarkeit für einen späteren klinischen Einsatz gewährleistet wurde. Dem Verfahren musste eine einfache, schnelle und zudem effiziente Methode zugrunde liegen, um dieses Vorgehen auch im Rahmen des klinischen Alltags zur Eignung zu bringen. Um im späteren Fall der klinischen Ausführung keine unnötig verlängerte Operationszeit in Anspruch zu nehmen, veranschlagten wir die Imprägnationsdauer auf 30 Minuten pro Methode. Andere Autoren empfehlen eine Beladungszeit von 15 Minuten [Buttaro 2005] oder 10 Minuten [Witso 2000].

In Anlehnung an die empfohlene Imprägnationsdosis von Winkler et al. [Winkler 2000] und Witso et al. [Witso 2000] wurden 1000 mg Vancomycinpulver bzw. 800 mg Gentamicin/ Femurkopf in der Pulverbeladung und 100 mg Vancomycin/ml bzw. 80 mg Gentamicin/ml bei Beladung in Lösung verwendet. Nach wie vor ist die ideale Imprägnationsdosis unbekannt. Sicher ist jedoch, dass sich zu hohe Konzentrationen negativ auf die Integration und die physikalischen Eigenschaften des Knochentransplantates auswirken können. Zudem ist durch eine

hohe Vancomycinkonzentrationen eine Reduktion der Osteoblastenreplikation bis hin zum Zelltod möglich [Edin 1996, Miclau 1993, Miclau 1995]. Als erster wies Gudmundson darauf hin, dass sich lokal appliziertes Tetrazyklin negativ auf den Einbau des Knochens auswirkt [Gudmundson 1971]. Über einen nachteiligen Effekt von Chloramphenicol und Methicillin auf die Osteogenese berichteten Gray und Elves [Gray 1981]. Demgegenüber zeigte Petri in histologischen Studien an Schweinen keinen negativen Effekt auf die Heilung bei Verwendung von Cephalothin und Tobramycin [Petri 1984] und auch Lindsey et al. fanden eine ereignislose Einheilung unter Tobramycin [Lindsey 1993]. Ebenso zeigten Buttaro et al. in einer Studie auf, dass selbst Vancomycinkonzentrationen über das 220 - fache der MHK keinen nachteiligen Einfluss auf die Knochentransplantateinfügung haben. Bei der Beladung von 1 g Vancomycin auf 300 g Transplantat ließ sich gegenüber der Negativkontrolle kein Unterschied in der Knochenheilung feststellen [Buttaro 2003].

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von lokalen Antibiotikaträgern können anhand von folgenden Parametern als suffizient gewertet werden: die Dauer der suffizienten Freigabe oberhalb der Minimalen Hemmkonzentration des jeweiligen Antibiotikums, die Höhe der absoluten Konzentrationen während der ersten Tage und die absolute und relative Gesamtmenge über den kompletten Versuchsablauf.

Die minimale bakterizide Vancomycinkonzentration, die erforderlich ist, unter einem Biofilm eingekapselte Staphylokokken zu eradizieren, ist 200 - bis 600 - mal höher als die für frei im Blut zirkulierende Kolonien [Nishimura 2006, Walls 2008]. Mit parenteraler Antibiotikagabe oder herkömmlichen Transplantaten wie z.B. PMMA können solch hohe Konzentrationen nicht erreicht werden [Winkler 2008]. Antibiotikabeladener Knochen ist in der Lage, Konzentrationen zu erreichen und auch über mehrere Tage aufrecht zu erhalten [Winkler 2000], welche die bakterizide Konzentration um mehr als das 1000 - fache übersteigen. Nahe am Infektionsort gelegene imprägnierte Knochentransplantate können auf diese Weise sogar Bakterienkolonien entfernen, die sich - unter Biofilmen versteckt - den herkömmlichen Methoden der Eradikation entzogen haben [Winkler 2008].

Die von uns erzielten Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Literaturangaben. Initial sehr

hohe Konzentrationen gefolgt von einem schnellen Abfall in den nächsten Tagen war allen von uns untersuchten Methoden gemein. 8754  $\mu\text{g/ml}$  Vancomycin und 7146  $\mu\text{g/ml}$  Gentamicin am ersten Tag waren die in allen Ansätzen höchsten gemessenen Konzentrationen. Beide Ergebnisse wurden in einfach mit gelöstem Antibiotikum beladenen Transplantaten erzielt.

Buttaro et al. erzielten Höchstwerte von 1400  $\mu\text{g/ml}$  Vancomycin bei der Behandlung von Infektionen nach Hüft - Alloarthoplastik [Buttaro 2005]. Dabei konnte ein synergistischer Effekt festgestellt werden, wenn der Knochen mit Vancomycin beladen und gleichzeitig Aminoglykosid - imprägniertes PMMA verwendet wurde.

Kanellakopoulou et al. beluden spongiösen Knochen mit 100 mg/ml Moxifloxacin - Lösung mit unterschiedlicher Impagnationsdauer (1 h, 24 h, 48 h) und untersuchten mögliche Unterschiede in der Freisetzung in vitro. Die Moxifloxacinfreisetzung erreichte am ersten Tag Werte über 4500  $\mu\text{g/ml}$  bei 1 h Beladungsdauer [Kanellakopoulou 2010].

Winkler et al. beluden humane und bovine Knochentransplantate mit Vancomycin und Tobramycin und verglichen in vitro die pharmakokinetischen Eigenschaften von kortikalem und spongiösem Knochen [Winkler 2000]. Die gemessenen Vancomycinkonzentrationen am 1. Tag lagen bei 20 900  $\mu\text{g/ml}$  für den human spongiösen Knochen und 5 700  $\mu\text{g/ml}$  für den kortikalen. Die Tobramycinkonzentrationen waren in der initialen Phase signifikant niedriger, jedoch lieferten sie gleichmäßigere Spiegel über einen längeren Zeitraum. Humaner und boviner Knochen wiesen vergleichbare Eigenschaften auf. Die Speicherkapazität von kortikalem Knochen unterlag der von spongiösem Knochen.

Entsprechend der Literatur zeigte sich auch in unserer Versuchsreihe ein ähnlicher Konzentrationsabfall im Verlauf. Die Pulvergruppe erreichte Werte unterhalb der definierten MHK durchschnittlich am 6. Tag sowohl für Vancomycin als auch für Gentamicin. Bei Beladung mit gelöstem Antibiotikum war für Gentamicin am 8. Tag bei der biantibiotischen und am 9. Tag bei der monoantibiotischen Beladung der Schwellenwert von 2  $\mu\text{g/ml}$  erreicht. Die suffiziente Vancomycinfreisetzung in der Lösungsgruppe dauerte bis zum 10. Tag, unabhängig der Beladungsart.

Bei Betrachtung der freigesetzten Gesamtmenge fallen deutlich höhere Werte in der Lösungsgruppe gegenüber der Pulvergruppe auf. Bei monoantibiotischer Beladung der Transplantate konnten die größten Mengen erzielt werden. Hierbei lieferten die mit Vancomycin imprägnierten Knochenblöcke die mit Abstand höchsten Ergebnisse. Bei Betrachtung der Werte zeigt sich

ein deutlicher Vorteil der mono - gegenüber der biantibiotischen Beladung in Lösung. Obwohl die Pulvergruppe deutlich höhere relative Werte erzielte (66, 17 - 125, 99 % in der Pulvergruppe vs. 3, 31 - 11,77 % in der Lösungsgruppe) war die absolut freigesetzte Gesamtmenge über 15 Tage v.a. bei monoantibiotischer Beladung niedriger.

Desweiteren zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass Vancomycin im Vergleich zu Gentamicin ein besseres Freisetzungsmuster demonstriert. Aus anderen Trägern zeigte Gentamicin hingegen beste pharmakokinetische Eigenschaften [Anagnostakos 2005]. Entsprechend unseren Ergebnissen erzielten Winkler et al. bessere Werte für Glykopeptide als für Aminoglykoside bei Beladung auf Knochen [Winkler 2000].

Bei biantibiotisch beladenem Knochenzement konnte ein synergistischer Effekt zwischen Aminoglykosiden und Glykopeptiden nachgewiesen werden [Anagnostakos 2009]. Witso et al. behandelten Knochen mit Vancomycin und Netilmicin, sowohl mononantibiotisch also auch in Kombination. Die Vancomycinfreisetzung der biantibiotischen Beladung war deutlich niedriger als in den Fällen, wo Vancomycin alleine verwendet wurden. Die Netilmicinfreisetzung zeigte keinen Unterschied in den Ergebnissen bei verschiedenen Beladungsverfahren [Witso 2002]. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten ebenfalls niedrigere Konzentrationen für Vancomycin bei Beladung in Kombination, jedoch nur bei in Lösung imprägnierten Transplantaten. Bei biantibiotischer Beladung mit Pulver ließ sich kein solcher Unterschied nachweisen. Hier zeigte die Vancomycinfreisetzung in der mono - bzw. biantibiotischen Beladung in etwa gleiche Ergebnisse.

Aus den Ergebnissen unserer Studie geht hervor, dass lösungsimprägnierte Transplantate bessere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen als solche, die mit Pulver beladen wurden. Die Frage über den Freisetzungsmechanismus des Knochens selbst ist noch nicht abschließend geklärt. Während der Freisetzungsmechanismus aus anderen Trägern geklärt ist (aus Knochenzement ist die Freisetzungskinetik oberflächenabhängig [Anagnostakos 2005]), bleibt dies bei Knochenimplantaten noch unklar. Ob Masse, Volumen oder Fläche den größten Anteil an der Lösung der Antibiotika aus Knochenimplantaten ausmachen, bedarf noch weiterer Forschung.

### **Limitierung der Arbeit**

Eine direkte Übertragung unserer in - vitro - Versuche in vivo ist nicht möglich. Die Freisetzungskinetik kann durch den Einsatz in vivo durch viele Faktoren beeinflusst werden: differente Gewebepfusion im Vergleich zu unserem definierten Versuchsvolumen, die Beschaffenheit und Geometrie des in - vivo - Knochens ist eine andere, Temperatur und pH - Wert variieren.

In unserer Arbeit verwendeten wir definierte Mengen an Antibiotikum. Eine Änderung dieser Mengenangaben wird möglicherweise einen anderen Synergismus der Antibiotika zutage fördern.

Auffallend bei Betrachtung der relativen Zahlen über 15 Tage, sind Werte über 100 % für Vancomycin in der Pulvergruppe. Für dieses Phänomen fehlt uns eine Erklärung. Möglicherweise liegt ein systemischer Messfehler aufgrund der multiplen Verdünnung in den ersten Tagen vor. Letztendlich erlaubt die kleine Fallzahl der Versuchsreihen keine statistische Auswertung, nicht einmal mittels nicht - parametrischer Tests, so dass anhand der vorliegenden experimentellen Arbeit zunächst die Grundlagen zur weiteren Erforschung von antibiotikabeladenen Knochen- transplantaten erschaffen wurden, allerdings diese Ergebnisse nicht als Richtlinien zum klinischen Einsatz dienen dürfen.

### **Ausblick**

Die Eigenschaften von spongiösem Knochen als Träger von Antibiotika wurde sowohl in - vivo als auch in - vitro bestätigt. Hohe initiale Konzentrationen gefolgt von stabilen Werten über einen längeren Zeitraum konnten konstatiert werden [Witso 1999, 2000, Winkler 2000]. In zukünftigen Studien müsste untersucht werden, inwieweit diese in - vitro Daten in die klinische Praxis umgesetzt werden können. Die Perfusion des infizierten Gewebes kann stark different zu unserem definierten Versuchsvolumen sein, der Knochen in - vivo weist andere Geometrie und Beschaffenheit auf. All dies könnte zu abweichenden Konzentrationen führen.

Buttaro et al. untersuchten Blut, Drainage und Urin auf Vancomycin nach totalem Hüftgelenkersatz unter Verwendung von 1 g Vancomycin pro Femurkopf. 10 Patienten erhielten reines PMMA, in 5 Fällen wurde zusätzlich Gentamicin und in 5 Weiteren Tobramycin benutzt. Gemessen wurden lokal 35 - mal höhere Vancomycinkonzentrationen als die höchsten berichteten Vancomycinwerte bei Beladung auf PMMA. So konnten Konzentrationen erreicht werden, die 400 - mal höher sind als zur Eradikation von Staphylokokkus aureus und Staphylokokkus epidermidis

nötig wären [Buttaro 2005]. Bis zum 15. postoperativen Tag konnten Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden. Dabei wurde die renale Funktion nicht beeinträchtigt. Zwischen Vancomycin und Aminoglykosidantibiotika - beladenem PMMA konnte ein synergistischer Effekt festgestellt werden. Auch bisherige in - vitro - Versuche werfen weitere Fragen auf. Welche Einflüsse und äußeren Bedingungen wirken sich auf das Freisetzungsprofil der Antibiotika aus? In bisherigen Studien wurden unterschiedliche Materialien und Verfahren verwendet. Die Wahl des Trägers und der Medikamente, die Imprägnationsbedingungen wie Konzentration, pH - Wert, Imprägnationszeit, Grad der Zermörserung, Kombination mit anderen Antibiotika, Temperatur, Lösungsmedien und vieles mehr, können das Freisetzungsmuster beeinflussen. Witso et al. untersuchten in ihrer Studie verschiedene Faktoren der Beladungsart und ihre Auswirkungen auf die Lösungskinetik. Sie beluden spongiösen Knochen unterschiedlich gemörserter Größe mit Netilmicin und Vancomycin verschiedener Konzentration und Beladungsdauer, bei pH 3, 5 und 7 sowohl mono - als auch biantibiotisch. Höhere anfangs verwendete Konzentrationen ergaben höhere Werte in der späteren Freisetzung bei beiden Antibiotika. Auswirkungen auf die Imprägnationsdauer zeigte nur Vancomycin wohingegen der Zerkleinerungsgrad nur Einfluss auf Netilmicin zeigte. Bei Kombination der beiden Antibiotika ließ sich keine Änderung in der Netilmicinfreisetzung feststellen, während sich die Menge der Vancomycinfreisetzung bei biantibiotischer gegenüber der monoantibiotischen Freisetzung verringerte. Eine fast doppelt so hohe Freisetzung zeigte sich bei pH 7 gegenüber pH 3 bei beiden Antibiotika [Witso 2002].

### **Fazit**

1. Vancomycin zeigt ein besseres pharmakokinetisches Freisetzungsprofil als Gentamicin. Unsere Studie zeigt höhere Werte für Vancomycin als für Gentamicin bei Beladung auf spongiösen Knochen.
2. Monoantibiotisch imprägnierte Transplantate wiesen bessere pharmakokinetische Eigenschaften auf als biantibiotisch beladene.
3. Ein synergistischer Effekt zwischen Vancomycin und Gentamicin konnte in der Pulverbeladung kaum festgestellt werden. Bei Lösungsbeladung zeigte sich sogar ein antagonistischer Effekt sowohl für Vancomycin als auch für Gentamicin. Es wurden größere Differenzen bzgl.

der Gesamtmenge zwischen den jeweiligen monoantibiotisch als bei den biantibiotisch beladenen Knochentransplantaten in Lösung vs. Pulver festgestellt.

4. Die Lösungsgruppe lässt höhere Freisetzungswerte erkennen als die mit Pulver beladenen Transplantate. Obwohl die Pulvergruppe relative höhere Werte lieferte, waren die Maximalkonzentrationen und die freigesetzte Gesamtmenge niedriger. Lösungsimprägnierte Transplantate lieferten über einen längeren Zeitraum suffiziente Konzentrationen als die mit Pulver beladenen. Insgesamt zeigte sich ein schlechteres Freisetzungsmuster in der Pulvergruppe als bei den in Lösung beladenen Transplantaten.

5. Spongiöser Knochen als Antibiotikaträger bietet hervorragende Eigenschaften zur Therapie der Osteomyelitis und dem septischem Endoprothesenwechsel nach Spacerimplantation. Vor allem mit Vancomycin in Lösung beladene Transplantate liefern initial hohe Werte und im weiteren Verlauf Konzentrationen über der MHK bis zum 10. Tag. Sie können Knochendefekte auffüllen und tragen so zur Stabilität bei. Zudem müssen sie in einer weiteren Operation nicht wieder entfernt werden wie Knochenzement oder Spacer, sondern können im Körper belassen werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] ADAMS, K. ; COUCH, L. ; CIERNY, G. ; CALHOUN, J. ; MADER, J. T.: In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic - impregnated polymethylmethacrylate beads. In: *Clin Orthop* 278 (1992), S. 244–52
- [2] AHLMANN, E. ; PATZAKIS, M. ; ROIDIS, N. ; SHEPHERD, L. ; HOLTOM, P.: Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. In: *J Bone Joint Surg Am* 84 (2002), S. 716–720
- [3] ANAGNOSTAKOS, K. ; FÜRST, O. ; KELM, J.: Antibiotic - impregnated PMMA hip spacers: current status. In: *Acta Orthop* 77 (2006), S. 628–37
- [4] ANAGNOSTAKOS, K. ; J. KELM, J. ; REGITZ, Th. ; SCHMITT, E. ; JUNG, W.: In vitro evaluation of antibiotic release from and bacteria growth inhibition by antibiotic - loaded acrylic bone cement spacers. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72 (2005), S. 373–8
- [5] ANAGNOSTAKOS, K. ; KELM, J.: Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90 (2009), S. 467–75
- [6] ANAGNOSTAKOS, K. ; SCHMID, N.V. ; KELM, J. ; JUNG, J.: Classification of hip joint infections. In: *International Journal of Medical Sciences* 6(5) (2009), S. 227–233
- [7] ANDERSSON, R.E. ; LUKAS, G. ; SKULLMAN, S. ; HUGANDER, A.: Local Administration of Antibiotics by Gentamicin-Collagen Sponge does not Improve Wound Healing or Reduce Recurrence Rate After Pilonidal Excision with Primary Suture: A Prospective Randomized Controlled Trial. In: *World Journal of Surgery* 34(12) (2010), S. 3042–3046
- [8] ARRINGTON, E. D. ; SMITH, W. J. ; CHAMBERS, H. G. ; BUCKNELL, A. L. ; DAVINO, N. A.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. In: *Clin Orthop Relat Res* 329



(1996), S. 300–309

- [9] ASKEW, M.J. ; KUFEL, M.F. ; FLEISSNER, P.R. J. ; GRADISAR, I.A. J. ; SALSTROM, S.J. ; TAN, J.S.: Effect of vacuum mixing on the mechanical properties of antibiotic - impregnated polymethylmethacrylate bone cement. In: *J Biomed Mater Res* 24 (1990), S. 573–580
- [10] BALEANI, M. ; PERSSON, C. ; ZOLEZZI, C. ; ANDOLLINA, A. ; BORRELLI, A.M. ; TIGANI, D.: Biological and biochemical effects of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. In: *J Arthroplasty* 23(8) (2008), S. 1232–8
- [11] BECKER, P. L. ; SMITH, R. A. ; WILLIAMS, R. S. ; DUTKOWSKY, J. P.: Comparison of antibiotic release from polymethylmethacrylate beads and sponge collagen. In: *J Orthop Res* 12(5) (1994), S. 737–41
- [12] BENNETT-GUERRERO, E. ; PAPPAS, T.N. ; KOLTUN, W.A. ; FLESHMAN, J.W. ; LIN, M. ; GARG, J. ; MARK, D.B. ; MARCET, J.E. ; REMZI, F.H. ; GEORGE, W. ; NEWLAND, K. ; COREY, G.R.: Gentamicin-collagen sponge für indection prophylaxis in colorectal surgery. In: *N Eng J Med*. 363(11) (2010), S. 1038–49
- [13] BERNLOEHR: Tutoplast Prozess Image. / Tutoplast. – Forschungsbericht
- [14] BORKHUU, B. ; BOROWSKI, A. ; SHAH, SA. ; LITTLETON, AG. ; DABNEY, KW. ; MILLER, F.: Antibiotic - loaded allograft decreases the rate of acute deep wound infection after spinal fusion in cerebral palsy. In: *Spine (Phila Pa)* 33 (1976), S. 2300–4
- [15] BUCHHOLZ, H. W. ; ELSON, R. A. ; ENGELBRECHT, E. ; LODENKÄMPER, H. ; RÖTTGER, J. ; SIEGEL, A.: Management of deep infection of total hip replacement. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 63 (7) (1989), S. 342–353
- [16] BUTTARO, M. ; COMBA, F. ; PICCALUGA, F.: Vancomycin - supplemented Cancellous Bone Allografts in Hip Revision Surgery. In: *Clin Orthop Relat Res* 461 (2007), S. 74–80
- [17] BUTTARO, M. A. ; MORANDI, A. ; RIVELLO, H. G. ; PICCALUGA, F.: Histology of vancomycin - supplemented impacted bone allografts in revision total hip arthroplasty. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 87 (2005), S. 1684–7

- [18] BUTTARO, M.A. ; GIMENEZ, M.I. ; GRECO, G. ; BARCAN, L. ; PICCALUGA, F.: High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. In: *Acta Orthop* 76(3) (2005), S. 336–40
- [19] BUTTARO, MA. ; PUSSO, R. ; PICCALUGA, F.: Vancomycin - supplemented impacted bone allografts in infected hip arthroplasty. Two stage revision results. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 87 (2005), S. 314–9
- [20] BUTTARO, MA. ; VALLE, AM. Gonzalez D. ; PINEIRO, L. ; MOCETTI, E. ; MORANDI, AA. ; PICCALUGA, F.: Incorporation of vancomycin - supplemented bone allografts: radiographical, histopathological and immunohistochemical study in pigs. In: *Acta Orthop Scand* 74(5) (2003), S. 505–13
- [21] CALHOUN, J. H. ; MADER, J. T.: Antibiotic beads in the management of surgical infections. In: *Am J Surg* 157 (1989), S. 443–9
- [22] CALHOUN, J.H. ; MANRING, M.M.: Adult osteomyelitis. In: *Infect Dis Clin North Am* 19 (2005), S. 765–786
- [23] CALHOUN, J.H. ; MANRING, M.M. ; SHIRTLIFF, M.: Osteomyelitis of the Long Bones. In: *Semin Plast Surg* 23 (2009), S. 59–72
- [24] CHAN, Y. S. ; UENG, S. W. N. ; WANG, C. J. ; LEE, S. S. ; CHEN, C. Y. ; SHIN, C. H.: Antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone grafting is an effective and safe method for the management of small infected tibial defects: a comparison study. In: *The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care* 48, No. 2 (2000), S. 246–255
- [25] CHEN, CE. ; KO, JY. ; PAN, CC.: Results of vancomycin - impregnated cancellous bone grafting for infected tibial non - union. In: *Arch Orthop Trauma Surg* 125 (2005), S. 269–75
- [26] DALE, H. ; HALLAN, G. ; ESPEHAUG, B. ; HAVELIN, L.I. ; ENGESAETER, L.B.: Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty. In: *Acta Orthop* 80(6) (2009), S. 639–645
- [27] DEGROOD, Dm.: Het plomeren van restholten na osteomyelitis met "bone - chips". In: *Ned Tijdschr V Gen* 32 (1947), S. 2192–6

- [28] DELALLA, F.: Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications. In: *J Chemotherapy* 11 (1999), S. 440–445
- [29] DELLOYE, C. ; CORNU, O. ; DRUEZ, V. ; BARBIER, O.: Bone allografts: what they can offer and what they cannot. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 89 (2007), S. 574–579
- [30] DERESINSKI, S.: Counterpoint: Vancomycin and Staphylococcus aureus—an antibiotic enters obsolescence. In: *Clin Infect Dis* 44(12) (2007), S. 1543–8
- [31] DESAI, B. M.: Osteobiologics. In: *Am J Orthop* 36 (2007), S. 8–11
- [32] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GEWEBETRANSPLANTATION: *Gewebearten*. 2008. – [www.gewebenetzwerk.de/gewebearten/knochen.html](http://www.gewebenetzwerk.de/gewebearten/knochen.html)
- [33] DUNNE, N.J. ; HILL, J. ; MCAFEE, P. ; KIRKPATRICK, R. ; PATRICK, S. ; M.TUNNEY: Incorporation of large amounts of gentamicin sulphate into acrylic bone cement: effect on handling and mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. In: *Proc Inst Mech Eng* 222(3) (2008), S. 355–65
- [34] EDIN, M. L. ; MICLAU, T. ; LESTER, G. E. ; LINDSEY, R. W. ; DAHNER, L. E.: Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. In: *Clin Orthop* 333 (1996), S. 245–251
- [35] GARAZZINO, S. ; APRATO, A. ; BAIETTO, L. ; D'AVOLIO, A. ; MAIELLO, A. ; DEROSA, F.G. ; ALOJ, D. ; SICCARDI, M. ; BIASIBETTI, A. ; MASSE, A. ; DIPERRI, G.: Glycopeptide bone penetration in patients with septic pseudoarthrosis of the tibia. In: *Clin Pharmacokinet* 47(12) (2008), S. 793–805
- [36] GRAY, J.C. ; ELVES, M.W.: Osteogenesis in bone grafts after short - term storage and topical antibiotic treatment. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 63 (1981), S. 441–4
- [37] GUDMUNDSON, C.: Oxytetracycline - induced fragility of growing bones. An experimental study in rats. In: *Clin Orthop* 77 (1971), S. 284–9
- [38] HAAKER, R. ; SENGE, A. ; KRÄMER, J. ; RUBENTHALER, F.: Osteomyelitis after endoprostheses. In: *Orthopäde* 33 (2004), S. 431–8
- [39] *Kapitel 1*. In: HOLLANDER, DA.: *Identifying criteria for wound infection*. European wound management association, 2005, S. 1

- [40] IPSEN, T. ; JORGENSEN, P. S. ; DAMHOLT, V. ; TORHOLM, C.: Gentamicin - collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year. In: *Acta Orthop Scand* 62 (6) (1991), S. 592–4
- [41] KANELLAKOPOULOU, K. ; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.: Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. In: *Drugs* 59 (2000), S. 1223–1232
- [42] KANELLAKOPOULOU, K. ; SAHINIDES, T. ; TSAGANOS, T. ; GALANAKIS, N. ; GIAMARELLOU, H. ; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.: In vitro elution of moxifloxacin from cancellous bone allografts. In: *J Biomed Mater Res A* 92(1) (2010), S. 52–5
- [43] KELM, J. ; K. ANAGNOSTAKOS, K. ; REGITZ, T. ; SCHMITT, E. ; SCHNEIDER, G. ; AHLHELM, F.: MRSA - infections - treatment with intraoperatively produced gentamycin - vancomycin PMMA beads. In: *Chirurg* 75 (2004), S. 988–95
- [44] KENT, ME ; RAPP, RP ; SMITH, KM: Antibiotic beads and osteomyelitis: here today, what's coming tomorrow? In: *Orthopedics* 29 (2006), S. 599–603
- [45] KETONIS, C. ; BARR, S. ; ADAMS, C. S. ; HICKOK, N. J. ; PARVIZI, J.: Bacterial colonization of bone allografts: establishment and effects of antibiotics. In: *Clin Orthop Relat Res* 468(8) (2010), S. 2113–21
- [46] KLEKAMP, J. ; DAWSON, J.N. ; HAAS, D.W. ; DEBOER, D. ; CHRISTIE, M.: The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. In: *J Arthroplasty* 14(3) (1999), S. 339–46
- [47] LINDSEY, R. W. ; PROBE, R. ; AL., T. M.: The effect of antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone graft on bone healing. In: *Clin Orthop* 291 (1993), S. 303–312
- [48] MA, T. ; GUTNICK, J. ; SALAZAR, B. ; LARSEN, M. D. ; SUENAGA, E. ; ZILBER, S. ; HUANG, Z. ; HUDDLESTON, J. ; SMITH, R. L. ; GOODMAN, S.: Modulation of allograft incorporation by continuous infusion of growth factors over a prolonged duration in vivo. In: *Bone* 41 (2007), S. 386–392
- [49] MADER, J. T. ; CALHOUN, J. ; COBOS, J.: In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. In: *Antimicrob Agents Chemother* 41(2) (1997), S. 415–8

- [50] MASRI, B. A. ; DUNCAN, C. P. ; BEAUCHAMP, C. P.: Long-term elution of antibiotics from bone - cement. An in vivo study using the prosthesis of antibiotic - loaded acrylic cement (PROSTALAC) system. In: *J Arthroplasty* 13(3) (1998), S. 331–8
- [51] MATZKE, G.R. ; ZHANEL, G.G. ; GUAY, D.R.: Clinical pharmacokinetics of vancomycin. In: *Clin Pharmacokinet* 11(4) (1986), S. 257–82
- [52] MCLAREN, A. C.: Alternative Materials to Acrylic Bone Cement for Delivery of Depot Antibiotics in Orthopaedic Infections. In: *Clin Orthop Relat Res* 427 (2004), S. 101–106
- [53] MICLAU, T. ; DAHNERS, LE. ; LINDSEY, RW.: In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. In: *J Orthop Res* 11 (1993), S. 627–32
- [54] MICLAU, T. ; EDIN, M. L. ; LESTER, G. E. ; LINDSEY, R. W. ; DAHNERS, L. E.: Bone toxicity of locally applied aminoglykosides. In: *J Orthop Trauma* 9 (5) (1995), S. 401–406
- [55] MICLAU, T. ; EDIN, M. L. ; LESTER, G. E. ; LINDSEY, R. W. ; DAHNERS, L. E.: Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast - like MG - 63 human osteosarcoma cells in vitro. In: *J Orthop Res* 16-4 (1998), S. 509–512
- [56] MOREAU, M. F. ; GALLOIS, Y. ; BASLE, M. F. ; CHAPPARD, D.: Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like-cells. In: *Biomaterials* 21(4) (2000), S. 369–376
- [57] NEUT, D. ; BELT, H. van d. ; HORN, J. R. ; MEI, H. C. d. ; BUSSCHER, H. J.: Residual gentamicin - release from antibiotic - loaded polymethylmethacrylate - beads after 5 years of implantation. In: *Biomaterials* 24 (2003), S. 1829–1831
- [58] NIE, L. ; NICOLAU, D. P. ; NIGHTINGALE, C. H. ; BROWNER, B. D. ; QUINTILIANI, R.: In vitro elution of ofloxacin from a bioabsorbable polymer. In: *Acta Orthop Scand* 66(4) (1995), S. 365–8
- [59] NISHIMURA, S. ; TSUROMOTO, T. ; YONEKURA, A. ; ADACHI, K. ; SHINDO, H.: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. In: *J Orthop Sci* 11 (2006), S. 46–50
- [60] PETRI, W.H.: Osteogenic activity of antibiotic - supplemented bone allografts in the guinea pig. In: *J Oral Maxillofac Surg* 42 (1984), S. 631–6

- [61] ROESSNER, M.: *Induktion und Prophylaxe Implantat assoziierter Knocheninfektionen am Modell eines antiinfektiv beschichteten Marknagels -eine experimentelle Studie am Kaninchen*. München : Dissertation, 2004
- [62] SCHOEPEF, C.: Allograft safety: Efficacy of the Tutoplast® Process. In: *International magazine of orale implantology* 7 (2006)
- [63] SHINTO, Y. ; UCHIDA, A. ; KORKUSUZ, F. ; ARAKI, N. ; ONO, K.: Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 74(4) (1992), S. 600–4
- [64] SKHIRTLADZE, K. ; HUTSCHALA, D. ; FLECK, T. ; THALHAMMER, F. ; EHRLICH, M. ; VUKOVICH, T. ; MULLER, M. ; TSCHERNKO, E.M.: Impaired target site penetration of vancomycin in diabetic patients following cardiac surgery. In: *Antimicrob Agents Chemother* 50(4) (2006), S. 1372–5
- [65] TRAMPUZ, A. ; ZIMMERLI, W.: Antimicrobial agents in orthopedic surgery: Prophylaxis and treatment. In: *Drugs* 66 (2006), S. 1089–1105
- [66] VONFRAUHOFFER, J. A. ; POLK, H. C. ; SELIGSON, D.: Leaching of tobramycin from PMMA bone cement beads. In: *J Biomed Mater Res* 19 (1985), S. 751–6
- [67] WAHLIG, H. ; DINGELDEIN, E.: Antibiotic and bone cement. Experimental and clinical long - term observations. In: *Acta Orthop Scand* 51 (1980), S. 49–56
- [68] WALENKAMP, G H I M.: *Gentamicin PMMA-beads. A clinical pharmacokinetic and toxicological study.*, University of Nijmegen, The Netherlands, Diplomarbeit, 1983
- [69] WALLS, R.J. ; ROCHE, S.J. ; O’ROURKE, A. ; MCCABE, J.P.: Surgical site infection with methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* after primary total hip replacement. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 90 - B (2008), S. 292–8
- [70] WINKLER, H.: Rationale for one stage exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft. In: *Int J Med Sci* 6 (2009), S. 247–252
- [71] WINKLER, H. ; JANATA, O. ; BERGER, C. ; WEIN, W. ; GEORGOPOULOS, A.: In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. In: *J Antimicrob Chemother* 46 (2000), S. 423–8

- [72] WINKLER, H. ; KAUDELA, K. ; STOIBER, A. ; MENSCHIK, F.: Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery - one stage revision results. In: *Cell Tissue Banking* 7 (2006), S. 319–323
- [73] WINKLER, H. ; STOIBER, A. ; KAUDELA, K. ; WINTER, F. ; MENSCHIK, F.: One stage uncemented revision of infected total hip replacement using cancellous allograft bone impregnated with antibiotics. In: *J Bone Joint Surg (Br)* 90 (2008), S. 1580–4
- [74] WITSO, E. ; PERSEN, L. ; BENUM, P. ; AAMODT, A. ; HUSBY, O.S. ; BERGH, K.: High local concentrations without systemic adverse effects after impaction of netilmicin-impregnated bone. In: *Acta Orthop Scand* 75 (2004), S. 339–46
- [75] WITSO, E. ; PERSEN, L. ; BENUM, P. ; BERGH, K.: Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. In: *Acta Orthop* 73 (2002), S. 199–205
- [76] WITSO, E. ; PERSEN, L. ; LOSETH, K. ; BERGH, K.: Adsorption and release of antibiotics from morselized cancellous bone: in vitro studies of 8 antibiotics. In: *Acta Orthop Scand* 70 (1999), S. 298–304
- [77] WITSO, E. ; PERSEN, L. ; LOSETH, K. ; BERGH, K.: Cancellous bone as an antibiotic carrier. In: *Acta Orthop Scand* 71 (2000), S. 80–4
- [78] WROBLEWSKI, B. M.: One - stage revision of infected cemented total hip arthroplasty. In: *Cin Orthop* 211 (1986), S. 103–7

# Kapitel 7

## Publikationen

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie

Berlin, 25. - 28. Oktober 2011

Postervorstellung: Pharmakokinetische Eigenschaften von antibiotikabeladenen Knochentransplantaten in vitro



# Kapitel 8

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Kohn für das Überlassen des Themas und die Möglichkeit, an der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes meine Doktorarbeit durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Konstantinos Anagnostakos für seine beständige, fördernde und freundschaftliche Betreuung. Er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. J. Jung für sein Engagement und seine Unterstützung beim Fertigstellen dieser Dissertation.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau M. Sand-Hill für die Auswertung der Antibiotikaproben im Rahmen dieser Arbeit.

Für die Nutzung der Räumlichkeiten, sämtlicher Gerätschaften und Arbeitsmaterialien im Bereich der experimentellen Orthopädie danke ich Herrn Dr. H. Madry.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes, die mich von Anfang an freundlich und offen aufgenommen haben.