

**Entwicklung, Charakterisierung und
tierexperimentelle Anwendung einer
liposomal verkapselten Form von Amikacin
zur topischen Antibiotikatherapie**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie**

**Fachbereich Humanmedizin
Heinrich Heine Universität, Düsseldorf**

**vorgelegt von
Dr. med. Ansgar Röhrborn**

I. Einführung und Problemstellung

- 1. Das Konzept lokaler Antibiotikatherapie mit verzögerter Wirkstofffreisetzung**
 - A. Einleitung**
 - B. Vorteile**
 - C. Indikationen**

- 2. Stand der Therapie und Forschung zur Lokalbehandlung mittels Antibiotikapräparaten mit verzögerter Wirkstofffreisetzung**
 - A. Eingeführte Therapeutika**
 - a. Gentamicin PMMA-Ketten**
 - b. Gentamicin-imprägnierter Kollagenschwamm**

 - B. In Entwicklung befindliche Produkte und Forschungsprojekte**
 - a. Glycol-Lactat-Polymere**
 - b. Calcium Hydroxylapatit**
 - c. Fibrin- und Gelatineverbindungen**
 - d. Liposomale Verbindungen**
 - e. Andere Systeme**

 - C. Liposomen**
 - a. Charakteristika, Typen**
 - b. Verhalten in vivo**
 - c. Morphologische Charakteristika und Herstellungsprinzip multivesiculärer Liposomen**

II. Methoden und Ergebnisse

- 1. Entwicklung Antibiotika-haltiger multivesiculärer Liposomen**
 - A. Wahl des geeigneten Antibiotikums**
 - B. Entwicklung eines adäquaten Prozesses der Herstellung multivesiculärer**
 - B. Entwicklung eines adäquaten Prozesses der Herstellung multivesiculärer Amikacinpartikel in Chargengrößen zur tierexperimentellen Anwendung**
 - C. Physikochemische Charakterisierung**
 - a. Morphologie**
 - b. Partikelgröße**
 - c. Analyse des Wirkstoff-Gehalts**
 - d. Analyse der Lipidmembran und Beistoffe**

- e. Reproduzierbarkeit
- f. Stabilität
- g. Injizierbarkeit
- h. Verträglichkeit mit Lokalanästhetika

2. Tierexperimente

A. Vorversuche mit Gentamycin-Partikeln

B. Tierversuche mit Amikacin-Partikeln

a. Pharmakokinetik

a1. Gewebespiegel

a2. Plasmaspiegel

b. Entwicklung der Wirksamkeitsuntersuchungen

b1. Wahl des Infektionsmodells

b2. Entwicklung des Versuchsaufbaus

b3. Fremdkörperimplantationstechnik

b4. Bakteriologie

b5. Auswertung und Statistik

b6. Vorversuche zur experimentellen Entwicklung des Tiermodells

c. Standardisierte Tierversuche

c1. Prophylaktische Anwendung

c2. Therapeutische Anwendung

d. Weitere Infektionsmodelle

d1. Katheterprotektionsmodell

d2. Auto-Transplantatinfektion

III. Diskussion

1. Lokale Behandlung mit Antibiotika

2. Entwicklung Amikacin-haltiger multivesiculärer Liposomen

3. Pharmakokinetik und Wirksamkeitsuntersuchungen

IV. Zusammenfassung

V Literatur

Danksagung

I. Einführung und Problemstellung

1. Das Konzept lokaler Antibiotikatherapie mit verzögerter Wirkstofffreisetzung

A. Einleitung

Das Ideal eines Arzneimittels ist eine Substanz, die, einmal appliziert, im Körper am Krankheitsherd akkumuliert und dort wirksam wird, während im übrigen Organismus niedrige Spiegel dieser Substanz vorliegen sollten und somit Nebenwirkungen und Toxizität ausbleiben. Leider entspricht kaum ein verfügbares Medikament diesem Idealtypus. Nur bei der Wirkungsweise des radioaktiven Jods in der Behandlung von Schilddrüsenerkrankungen ist diese Idealform der Akkumulation des Mittels am Wirkungsort von der Physiologie praktisch vorgegeben. So hat es nie an Bemühungen gefehlt, Substanzen lokal einwirken zu lassen, die bei systemischer Applikation im ganzen Körper nicht wirksam oder zu toxisch wären. Beispiele sind Wundbehandlungen mit dem systemisch toxischen Antibiotikum Polymyxin B, die von Chirurgen oftmals propagierte Spülung der Bauchhöhle mit Antibiotika oder Desinfektionslösungen (1,2,3), und der Versuch, Chemotherapeutika mit hohen Dosen toxischer Substanzen über intraarterielle Portsysteme lokal zu applizieren (4,5).

Infektionen als Ziele antibiotischer Behandlung können generalisiert als Septikämie den ganzen Körper betreffen und werden dann selbstverständlich am besten durch parenterale Gabe von Antibiotika erreicht, können aber auch einzelne Organe oder abgeschlossene Hohlräume betreffen und werden dann besser durch lokale Maßnahmen behandelt. Dieses Prinzip sollte nicht nur für chirurgische Maßnahmen gelten (*ubi pus, ibi evacua*), sondern auch bei Antibiotikatherapie in besonderen Fällen in die Behandlungsstrategie mit einfließen.

B. Vorteile

Die Vorteile einer solchen Behandlungsform lägen in der größeren lokalen Wirkstoffkonzentration und der geringeren Toxizität für den Gesamtorganismus, die bei Penicillinen und Cephalosporinen eine geringere Rolle spielt, während Aminoglykoside traditionellerweise als toxische Substanzen bekannt sind und auch die heute häufig verwendeten Gyrasehemmer zum Teil erhebliche Nebenwirkungen aufweisen (6,7).

Zusätzlich zu den Vorteilen einer lokalen Applikation im Hinblick auf die Nebenwirkungen läßt sich ein anderes Problem hervorheben: Im Bereich chronischer Infekte, wie sie zum Beispiel bei traumatologischen Problemfällen vorkommen, können systemisch applizierte Medikamente oftmals nicht wirksam werden, weil die Durchblutung in der betreffenden Region herabgesetzt ist. Unter solchen Umständen lassen sich dann keine wirksamen Antibiotikaspiegel am Zielort mehr erreichen.

Im engen Zusammenhang mit dieser Problematik stehen die zu behandelnden Keime. Bei chronischen Infekten, die bereits mehrfach antibiotisch anbehandelt worden sind, finden sich oft multiresistente Bakterien, die dann, mehrfach unzureichenden Spiegeln einer systemischen Therapie ausgesetzt, in ihrem Wachstum kaum noch zu beeinflussen sind. Lokal angewandte Pharmaka können unter solchen Umständen Wirkspiegel erreichen, die über den minimalen Hemmkonzentrationen resistenter Keime liegen und deshalb ein wichtiges Mittel zur Sanierung derartiger Probleminfektionen darstellen.

Somit ist festzuhalten, daß in den meisten Situationen die systemische Zufuhr von Antibiotika bei niedriger Toxizität und ausreichender Gewebsverteilung der verwendeten Substanzen eine geeignete, wenn nicht ideale Therapie darstellt. In einigen anderen Situationen aber ist sowohl unter prophylaktischen als auch unter therapeutischen Gesichtspunkten eine ausreichende Behandlung mit systemischen Antibiotika nicht möglich oder nur mit ausgeprägten Nebenwirkungen der Antibiotika zu erreichen. Unter

solchen Umständen wäre eine lokal applizierbare und nach Möglichkeit in der Folge biologisch abbaubare Form eines wirksamen Antibiotikums eine wertvolle Ergänzung vorhandener Therapien.

C. Indikationen

Die aufgeführten Charakteristika lokal anwendbarer Antibiotika machen sie zu bevorzugten Therapeutika für den Einsatz unter bestimmten Indikationen.

Im Bereich der Orthopädie sind Knocheninfekte eine gefürchtete Komplikation, die nicht nur als spontane Ostitis, sondern vor allem im Zusammenhang mit offenen Frakturen und mit chirurgischen Eingriffen am Skelettsystem auftreten. Dieser Indikationsbereich mit seinen begleitenden Problemen wie der Verwendung von Fremdkörpern, der Entstehung von Resthöhlen und kompromittierter Durchblutung ist bereits seit langer Zeit als eine typische Indikation für die lokale Anwendung von Antibiotika akzeptiert.

Ein weiterer chronischer Infektfokus sind Fisteln, die mitunter eine chirurgisch angehbare Ursache haben, aber auch als Residuen nach gestörter Wundheilung verbleiben können und dann chronisch entzündliche, typischerweise sehr therapieresistente Infektherde darstellen können. Größere Infektesthohlen können mitunter, nicht durch Granulationsgewebe aufgefüllt, persistieren und ein langwieriges Behandlungsproblem verursachen. Dies gilt zum Beispiel für die Sakralhöhle nach Rektumexstirpation oder für große Abszesskavitäten, die nicht spontan kollabieren (z.B. Pleuraempyem-Resthöhle).

Alle Arten von Infektionen, die mit Fremdkörpern assoziiert sind, stellen typische Problemfälle dar, weil die Bakterien einerseits den Fremdkörpern anhaften können und so nicht durch die Antibiotika erreicht werden oder weil gleichzeitig im Bereich des Implantates eine Narbe entsteht, die den Fremdkörper umgibt und eine ausreichende Diffusion des Antibiotikums verhindern kann. So sind diese Infekte unter Umständen noch nicht einmal durch Entfernung des Implantates und Einbau neuen sterilen Materials sicher

sanierbar und können zum Beispiel im Falle von Gefäßprothesen eine lebensbedrohliche Situation hervorrufen.

Gemeinsam ist diesen Indikationsbereichen oftmals die gestörte Durchblutung des Infektherdes, die zur Erfolglosigkeit der konventionellen Therapie beiträgt und eine der Grundlagen des Behandlungsansatzes mit lokal wirksamen Antibiotika darstellt.

2. Stand der Therapie und Forschung zur Lokalbehandlung mittels Antibiotikapräparationen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung

A. Eingeführte Produkte

a. Gentamicin-PMMA-Ketten (Septopal®)

Seit Jahrzehnten in Chirurgie und Orthopädie eingeführt sind die Gentamicin-PMMA-Ketten der Firma Merck, bei denen kleine Kugeln aus Methylmethacrylat mit Gentamicin imprägniert sind, das im Gewebe aus dieser Verbindung langsam freigesetzt wird. Die Ketten werden operativ in das Infektgebiet eingebracht. In manchen Fällen, in denen zum Beispiel eine knöcherne Kavität damit aufgefüllt wird (8), können sie im Situs verbleiben, in anderen Situationen werden sie wieder entfernt. Die Domäne dieses Präparates liegt im Einsatz in der septischen Knochenchirurgie (9,10,11,12,13,14), was durch die relativ große Anzahl chronischer Infekte mit Vernarbungen und minderdurchblutetem Gewebe bedingt ist. In vielen Fällen werden die Ketten mehrfach eingelegt. Die notwendigen wiederholten Revisionen stellen nicht unbedingt einen Nachteil gegenüber anderen Therapieoptionen dar; denn auch bei der früher üblichen Behandlung mit Spül- Saugdrainagen, mit denen die Gentamicin-Ketten auch klinisch verglichen wurden, wären häufige Korrekturen und Re-Eingriffe erforderlich (15). Während mit dieser Substanz bereits Tausende von Patienten behandelt worden sind und die Sicherheit der Präparation außer Frage steht, gibt es nur wenige prospektiv durchgeführte randomisierte Untersuchungen zum Vergleich der Wirksamkeit lokal applizierten Gentamicins gegenüber konventioneller parenteraler Antibiotikagabe (16).

Neben der Verwendung in der septischen Knochenchirurgie werden vereinzelt auch andere Anwendungsgebiete für Gentamicin-PMMA Ketten angegeben. So liegen Erfahrungsberichte aus der Handchirurgie vor (17) und eine österreichische Arbeitsgruppe berichtete über die erfolgreiche Prophylaxe von Infektionen der Sakralhöhle nach Rektumamputation durch

Einlegen von Gentamicin-PMMA-Ketten (18). Die Anwendung als Prophylaktikum ist jedoch problematisch, da nicht in jedem Fall der dauernde Verbleib der Fremdkörper toleriert werden kann.

Entsprechend der umfangreichen klinischen Erfahrung ist die Pharmakokinetik des Präparates gut dokumentiert. Wahlig und Mitarbeiter (19) maßen in einer tierexperimentellen Untersuchung an Hunden nach Applikation von bis zu 37 Gentamicin-Kugeln, entsprechend einer Gesamtmenge von 277,5 mg Gentamicinsulfat, Serumspiegel von bis zu 0,3 mg/l. Da hierbei die Frage der systemischen Toxizität zu klären ist, kann zum Vergleich der Serum-Talspiegel nach systemischer Gabe, der das entscheidende Kriterium für die Toxizität dieser Applikationsform darstellt, herangezogen werden. Bei Einzelgabe der Gesamtdosis sollte dieser Wert unter 1 mg/l liegen. Somit ist die Toxizität der lokal applizierten Substanz auch bei wiederholter Anwendung nicht von klinischer Bedeutung.

Die lokale Gewebskonzentration lag im gleichen Experiment im Bindegewebe bis etwa zum 100. Tag nach Implantation der Ketten oberhalb des erforderlichen Wirkspiegels von 4 mg/dl. Im spongiösen Knochen wurden diese Werte ähnlich lange erzielt und bakterizide Konzentrationen konnten im Zeitraum von bis zu einer Woche noch im Abstand von mehreren Zentimetern vom Implantationsort gemessen werden. Auch in der der Implantation benachbarten Corticalis lag über 14 Tage eine bakterizide Konzentration vor.

Bei Untersuchungen am Menschen lagen nach Einbringen von bis zu 180 Kugeln über 10 Stunden postoperativ nur selten systemische Werte von bis zu 0,5 mg/l vor, während die meisten Werte bei etwa 0,1 mg/l lagen (19). Diese Ergebnisse wurden im wesentlichen von Walenkamp und Mitarbeitern bestätigt (20), die nach Implantation von Gentamicin-PMMA-Ketten beim Menschen (90 Kugeln) maximal eine Gentamicin-Konzentration von 0,5 mg/l fanden, während die meisten Bestimmungen unter 0,1 mg/l lagen, womit eine systemische Toxizität ausgeschlossen zu sein scheint.

Andererseits wurden aus dem Drainagesekret der Redondrainagen nach lokaler Gentamicin-PMMA-Kettenimplantation mittlere Konzentrationen von 80 mg/l bestimmt, während nach systemischer Gabe zu keinem Zeitpunkt höhere Konzentrationen als 0,6 mg/l im Wundsekret gemessen wurden. Auch hier wurden also sehr hohe lokale Konzentrationen bei vernachlässigbaren Serumspiegeln nachgewiesen.

Neben dem Ausschluß systemischer Nebenwirkungen dieser Therapie wurde also durch diese Untersuchungen auch der pharmakokinetische Wirksamkeitsnachweis bei einer minimalen Hemmkonzentration der wichtigsten Erreger zwischen 0,5 und 4 mg/l erbracht.

b. Gentamicin-imprägnierter Kollagenschwamm (Sulmycin®, Septocoll®)

Der Nachteil der im Gewebe verbleibenden und somit zu entfernenden Fremdkörper wird bei einem zweiten am Markt etablierten Produkt umgangen. Die Firma Essex/Byk-Gulden bietet bereits seit einigen Jahren ein mit Gentamicin imprägniertes Kollagenvlies an, das in einen infizierten oder kontaminierten Situs eingebracht werden kann und nach Wirkstofffreisetzung vom Körper komplett und ohne Residuen abgebaut wird. Auch hierzu liegen Ergebnisse klinischer Studien vor.

Das Spektrum der unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen und überprüften Anwendungsbereiche ist dabei deutlich größer als für die PMMA-Ketten angegeben. Gentamicin-Schwamm wurde neben dem Einsatz in der Traumatologie und Orthopädie (21) auch nach anderen Eingriffen am Skelett (22) und unter zahlreichen anderen Indikationen verwendet. Wie die Gentamicin-Ketten wurde er nach Rektumexstirpation zum Schutz vor Infekten in der Sakralhöhle, aber auch nach anderen Coloneingriffen zur Infektionsprophylaxe der Bauchwunde verwandt (23). Im Gegensatz zu den PMMA-Ketten fand die Substanz auch Anwendung zur Behandlung und Prophylaxe von Komplikationen in der Gefäßchirurgie (24,25,26), zur Infektionsprophylaxe von Bauchwunden nach "schmutzigen"

intraabdominellen Eingriffen (27,28), als Infektprophylaxe nach Operation eines Sinus pilonidalis (29) und zur Verhinderung von postoperativen Infektionen nach Bandscheibenoperationen (30).

Ähnlich wie für die PMMA-Ketten liegen auch Ergebnisse über die Pharmakokinetik dieses Präparates vor. Letsch und Mitarbeiter (31) fanden jedoch nach Implantation von Kollagen-Vlies in der Traumatologie eine wesentlich raschere Freisetzung des Wirkstoffs mit konsekutiv höheren Blut- und Urinspiegeln als dies nach Implantation von PMMA-Ketten beobachtet wurde. Die Gewebsspiegel erreichten in dieser Untersuchung über 24 Stunden 1 g/l. Die klinische Erfolgsrate zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Behandlungskonzepten. Humphrey und Mitarbeiter konnten in ähnlicher Weise im Tierexperiment an Kaninchen zeigen (32), daß nach Implantation von Gentamicin-imprägniertem Kollagenvlies (Gentamicin Dosis von 3 mg/kg KG, in etwa entsprechend der Dosierungsempfehlung beim Menschen) in den Markraum des Femurs initiale Gewebsspiegel von 600 mg/l erreicht werden, die in den folgenden 3 Tagen auf durchschnittlich 140 mg/l fielen, wobei bis zum 28. Tag noch Spiegel von bis zu 10 mg/ml gemessen wurden. Die gemessenen Serumspiegel lagen in dieser Untersuchung etwas höher als bei PMMA-Ketten, nämlich bei ca. 0,5 mg/l über einen Zeitraum von 28 Tagen.

Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete auch über die Ergebnisse dieses Materials in Weichteilgewebe (33), wobei hier niedrigere Konzentrationen im lokalen Gewebe, aber auch niedrigere Serumspiegel gefunden wurden. Die Gewebespiegel von 2,7 mg/l liegen zwar über der MHK der meisten Keime, jedoch liegen die Werte unter dem Spitzenspiegel nach konventioneller i.v. Gabe.

Jørgensen und Mitarbeiter (34) untersuchten die erzielten Gewebe- und Plasmaspiegel nach Behandlung von Protheseninfekten in der Gefäßchirurgie mit Gentamicin-imprägniertem Kollagenvlies beim Menschen. Verwendet wurde hierbei eine Gesamtdosis von nur 130 mg Gentamicin. Aus der Wunddrainage konnten bei 4 von 12 Patienten über 28 Stunden Spiegel

bestimmt werden, die rechnerisch schlußfolgern ließen, daß die MHK für die meisten Stämme von *Staphylococcus aureus* und von *E. Coli* über fünf Tage überschritten wurden (35,36). Die Serumspiegel erreichten in diesem Fall 1,5 mg/l nach ca. fünf Stunden und lagen nach 24 Stunden bei etwa 0,3 ml. In einer klinischen Anwendungsreihe wurden elf von 12 Patienten mit einem ausgeprägten Leisteninfekt eines Heterografts nach Implantation von Gentamicin-imprägniertem Kollagenschwamm geheilt.

Das Präparat Septocoll® weicht von dem beschriebenen pharmakokinetischen Verhalten ab (37). Die verwendete antibiotische Substanz stellt hier eine Mischung aus Gentamicinsulfat und Gentamicincrobeat dar. Diese Kombination gewährleistet eine insgesamt verlängerte Halbwertszeit im Gewebe mit einer kurzen α -Phase, die der Freisetzung des Gentamicinsulfats entspricht und einer längeren β -Phase, in der Gentamicincrobeat aus dem Kollagenvlies ausgelöst wird. Es ist jedoch nicht bekannt, inwieweit die unterschiedliche Kinetik die klinische Wirksamkeit der beiden Präparate beeinflusst.

Auch bei den Kollagen-Präparaten sind also wesentliche systemische Nebenwirkungen nicht zu erwarten. Hinsichtlich lokaler unerwünschter Wirkungen wurde jedoch nach Tierexperimenten über Wundheilungsstörungen an der Haut (38) berichtet, so daß unkritische Anwendung des Präparates nicht indiziert ist.

B. In Entwicklung befindliche Produkte und Forschungsprojekte

Neben diesen beiden am Markt eingeführten Systemen befinden sich zahlreiche Präparate zur verzögerten systemischen sowie lokalen Antibiotiafreisetzung in präklinischer oder experimenteller Entwicklung. Ein großer Anteil dieser Projekte befaßt sich mit der Bekämpfung bakterieller Zahnbesiedlung zur Behandlung der Parodontose durch lokal auftragbare Antibiotikafilme. Diese sollen auf Grund ihres speziellen dentalmedizinischen

Anwendungsspektrums jedoch nicht Gegenstand weiterer Erläuterung sein. Desgleichen werden in der Literatur verschiedene in der Entwicklung befindliche systemisch zu applizierende Substanzen dargestellt, die ebenfalls nicht weiter zu erörtern sind.

Die lokal anwendbaren galenischen Antibiotikazubereitungen zur verzögerten Wirkstofffreisetzung lassen sich auf Grund des gewählten Träger-/Freisetzungssystems in verschiedene Gruppen unterteilen.

a. Glycol-Lactat-Polymere

Glycol-Lactat Polymere sind geeignete Träger zur Verkapselung einer Reihe verschiedener Substanzen. Im Bereich der Antibiotika wurden Ofloxacin (39) und Ciprofloxacin (40), Vancomycin (41) und Aminoglycoside (42) auf diese Weise präpariert. Durch Veränderung der verwendeten Oligomere, der Polymerisationsbedingungen und der endgültigen Teilchengröße lassen sich unterschiedliche Eigenschaften der Präparate erzeugen. So konnten Mauduit und Mitarbeiter ein Polymer erzeugen (42), das bei einem Gewichtsverhältnis von Wirksubstanz : Trägersubstanz = 1:9 eine Gentamicinmenge von 2 mg/Tag/g Gesamtmasse über einen Zeitraum von zehn Tagen freisetzt. Aus dieser Substanz werden folglich 20 % der eingesetzten Antibiotikamenge im vorgesehenen Zerfallszeitraum freigesetzt. Während diese Zubereitung letztlich die Teilchengröße eines Streupuders aufweist, können die Polymere auch kleiner (5-50 µm) und damit injizierbar sein, wie sowohl für Vancomycin als auch für Ciprofloxacin gezeigt wurde. Von den beschriebenen Präparationen wurde lediglich diejenige von Ciprofloxacin über in vitro Untersuchungen hinaus auch erfolgreich in einem Tiermodell, nämlich dem einer Fremdkörper-assoziierten Peritonealinfektion, untersucht (40), so daß Daten über die tatsächliche klinische Verwendbarkeit derartiger Produkte sehr spärlich sind.

b. Calcium-Hydroxylapatit

In ähnlicher Anwendungsintention wie die bekannten Gentamicin-PMMA-Ketten wurden galenische Zubereitungen von Calcium-Hydroxylapatit als Trägersubstanz für Antibiotika entwickelt. Amaro-Martins beschrieb ein Trägersystem aus dem zunächst Gentamicin während 48 Stunden freigesetzt wird, gefolgt von einer langsamen Freisetzung von Chinolonen, die durch eine Komplexierung mit Calcium-Ionen an das Hydroxylapatit gebunden wurden (43). Da unter diesen Umständen das Antibiotikum der zweiten Freisetzungsphase nur durch Abbau der Trägersubstanz freigesetzt wird, ist es fraglich, ob auf diese Weise lokal wirksame Spiegel erzielt werden können. Immerhin dürfte aber das Material, eingesetzt als temporärer Knochenersatz, gegen von außen einwirkende Infektionserreger weitgehend resistent sein.

Eine japanische Arbeitsgruppe führte befriedigende in vivo Versuche durch, bei denen Antibiotika aus einem zentral in einem Calcium-Hydroxylapatit-Block gelegenen Hohlraum freigesetzt wurden (44).

Solberg und Mitarbeiter (45) überprüften die Wirksamkeit Gentamicin-impregnierten Hydroxylapatits in der Behandlung von experimentell gesetzten Osteomyelitiden der Tibia an Ratten und fanden die Verbindung signifikant wirksamer als intraperitoneale Behandlung mit freiem Gentamicin, jedoch gleichwertig im Vergleich zu PMMA-Ketten.

c. Fibrin- und Gelatineverbindungen

Itokazu und Mitarbeiter (46) inkorporierten ein Aminoglycosid in gefriergetrocknete Fibrin-Clots, die daraufhin in vivo und in vitro auf ihre Freisetzungskinetik untersucht wurden. Während die in vitro-Kinetik vielversprechend erschien, gelang es im Tiermodell einer Osteomyelitis im Vergleich zu konventioneller Antibiotikagabe nur, die Bakterienzahl im infizierten Knochen zu vermindern, womit dieser Ansatz hinter der Wirksamkeit bereits im Handel befindlicher Produkte zurückblieb.

Park und Kim (47) untersuchten ein Fibrin-Gelatine Gemisch unter Zusatz verschiedener Antibiotika. Die Freisetzung von Gentamicin erfolgte dabei am langsamsten. Geprüft wurde die Wirksamkeit gegen *Bacillus subtilis*, womit natürlich ein besonders empfindlicher Stamm gewählt wurde und die Aussagefähigkeit für klinisch relevante Bakterien begrenzt bleibt.

d. Liposomale Verbindungen

Die Möglichkeiten der Behandlung von bakteriellen Infekten mit liposomalen Verbindungen von Antibiotika wurden bereits 1989 von Juliano in einer Übersichtsarbeit beschrieben (48).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben über Ansätze berichtet, Antibiotika in Liposomen zu verkapseln und auf diese Weise eine biologisch abbaubare Form langwirkender Präparate zu entwickeln. Dabei wurden systemische Anwendungen, aber auch Präparate zur Lokalbehandlung beschrieben. Cabanes und Mitarbeiter (49) entwickelten eine liposomale Form von Gentamicin, die, lediglich auf Cholesterol und Phosphatidylcholin basierend, nach intramuskulärer Gabe ein kleineres Kurvenintegral der Plasmakonzentration und selbstverständlich niedrigere Spitzenwerte als freies Gentamicin aufwies, jedoch wurden nur pharmakokinetische Untersuchungen und keine Wirksamkeitsprüfungen durchgeführt. Huh und Mitarbeiter publizierten die Anwendung einer liposomalen Form von Amikacin (50), wodurch in 70% behandelter Tiere eine durch *Staphylococcus aureus* hervorgerufene Infektion einer Aortenprothese behandelt werden konnte. Leider liegen keine Ergebnisse über die Behandlung mit einer vergleichbaren Menge freien Antibiotikums vor. Price und Mitarbeiter publizierten die Ergebnisse einer Lokalbehandlung einer experimentell gesetzten Weichteilinfektion bei Ratten mit Liposomen, die Tobramycin und in einer anderen Versuchsgruppe Silber-Sulfadiazin enthielten (51). Dabei war der Effekt der liposomal verkapselten Antibiotika und Desinfizientien dem der mehrmaligen Anwendung der freien Substanz Tobramycin überlegen. In einer weiteren Publikation (52) beschrieben dieselben Autoren den Einsatz

liposomal verkapselten Cefoxitins zur Behandlung einer experimentell erzeugten Peritonitis bei der Ratte. Sowohl in mikrobiellen Untersuchungen als auch im Überlebensversuch erwies sich die liposomale Formulierung der Behandlung mit freier Substanz, von der allerdings nur eine einzige Dosis appliziert wurde, überlegen. In mehreren experimentellen Arbeiten wurden intracelluläre Infektionen im Versuchstier mit liposomalen Verbindungen erfolgreich behandelt, wobei jedoch der Versuchsaufbau durch die Auswahl des infizierenden Bakteriums (*Salmonella* Dublin, *Mycobacterium avium*) (53, 54) einen experimentellen, für die Chirurgie irrelevanten Charakter erhält.

e. Andere Systeme

Das weltweite Interesse an dem Problem der nebenwirkungsarmen Behandlung mit lokal anwendbaren und nach Möglichkeit biologisch abbaubaren, an Trägersubstanzen gebundenen Antibiotika ist erheblich, wie eine Vielzahl weiterer Publikationen der unterschiedlichsten Zufuhrsysteme zeigt.

Kwok und Mitarbeiter (55) beschrieben ein System der Inkorporation von Ciprofloxacin in Polyurethanmaterialien mit dem Ziel, implantierte Fremdmaterialien auf diese Art und Weise vor Infekten zu schützen. In einer zweiten Arbeit (56) berichteten sie zusätzlich über eine Beschichtung des Polyurethankörpers mit einem N-butyl-Methacrylat Film, der eine weitere Verzögerung der Freisetzung und durch modifizierbare Beschaffenheit Anpassung der Kinetik an die jeweiligen Bedürfnisse ermöglicht.

Eine Kombination von Gips und einer Beschichtung aus dem Kopolymer Polylactat-Glycolat wurde von Benoit und Mitarbeitern (57) als Basis einer Formulierung von Vancomycin zur Behandlung chronischer Knocheninfekte beschrieben. Die Beschichtung erlaubt eine Modifizierung der Freisetzungseigenschaften. In einem Tiermodell, in dem das Präparat in die Femurcondylen von Kaninchen implantiert wurde, konnten über vier Wochen lokale inhibitorische Substanzkonzentrationen bei nahezu nicht nachweisbaren Plasmaspiegeln gemessen werden.

Antibiotika-haltige Mikrosphären wurden von Matsuda (58) zwischen die beiden Schichten eines künstlichen Hautersatzes eingebracht, um so Infektionen dieses Implantates zu verhindern.

Ein bereits unter dem Handelsnamen Biodel® registriertes resorbierbares, aus Fettsäuren als Trägersubstanzen bestehendes implantierbares Produkt prüften Sasmor und Mitarbeiter (59) in einem Tiermodell einer orocutanen Fistel, bei der die Wundheilung in einer Versuchsgruppe durch zusätzliche vorherige lokale Bestrahlung erschwert wurde. Es zeigte sich bei allen Tieren eine geringere Infektionsrate nach Behandlung mit Biodel®, wobei der Unterschied zwischen den behandelten und den Kontrolltieren jedoch nur in der vorbestrahlten Gruppe signifikant war. Überraschend erscheint, daß in diesem Versuch die erzielten Gewebsspiegel niedriger als die Serumspiegel, die im therapeutischen Bereich lagen, gemessen wurden.

C. Liposomen

a. Charakteristika, Typen

Die Entwicklung von Liposomen als pharmazeutische Substanzträger vollzog sich in den 80er Jahren, so daß heute Standardverfahren bekannt und etabliert sind (60). Liposomen sind mit wässriger Flüssigkeit gefüllte Hohlkörper, die von einer Membran umgeben sind. Die Membran kann aus einer Vielzahl sowohl natürlich vorkommender als auch synthetischer Lipide bestehen. In aller Regel haben die Moleküle ein polares, hydrophiles Ende und ein apolares hydrophobes Ende, das zum Beispiel den aliphatischen Ketten der Fettsäuren entspricht. Die typische liposomale Membran stellt daher eine Doppelmembran dar, bei der die apolaren Enden der Moleküle in der Mitte einander zugewandt sind, während die hydrophilen Pole sowohl dem wässrigen Inhalt als auch dem wässrigen Umgebungsmedium zugewandt sind (61). Dementsprechend entstehen derartige Liposomen spontan durch einfaches Hydrieren von gereinigten Phospholipiden. Daneben

sind jedoch eine Vielzahl von Verfahren publiziert worden, die eine effizientere Herstellung erlauben.

Nach der Membranbeschaffenheit und der Größe der Partikel unterscheidet man zwischen sogenannten "small unilamellar" vesicles (SUV), Größe 20-100 nm, "large unilamellar vesicles" (LUV), die in ihrem Aufbau den SUV entsprechen, Größe 100 - 1000 nm, und "multilamellar vesicles" (MLV), Größe 200 - 5000 nm.

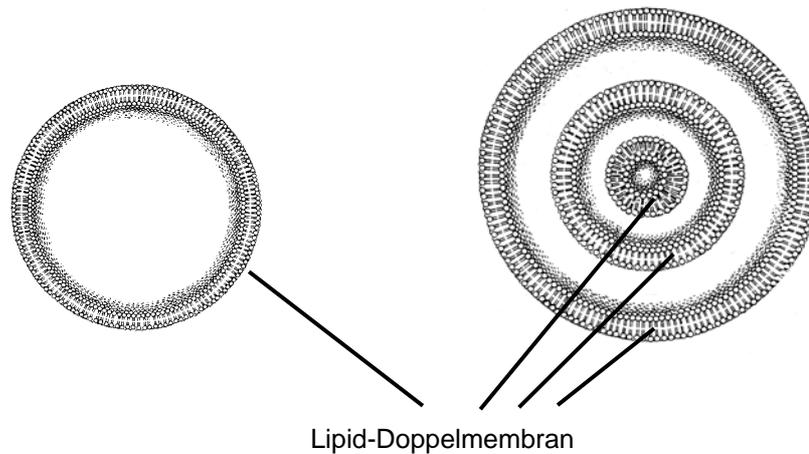


Abbildung 1: Unilamelläres und multilamelläres Liposom (nach 61)

Die Größe und die chemische Zusammensetzung entscheiden über die in vivo vorhandenen Eigenschaften der Partikel. Dabei sind nicht nur die Membranlipide, sondern auch die im Liposom verkapselten Pharmaka von Bedeutung. Im wesentlichen können diese als wasserlösliche Substanzen in Lösung in der wässrigen Phase im Innern der Partikel vorliegen, sie können aber auch - im Falle lipophiler Substanzen - in die liposomale Membran incorporiert sein.

Im Falle wasserlöslicher Substanzen sind LUV die geeigneten Vehikel, da sie den größten Innenraum und somit die größte Transportfähigkeit für

Pharmaka aufweisen. Dementsprechend sind mit diesen Partikeln auch die meisten Untersuchungen zur Applikation von Antibiotika durchgeführt worden. Im Gegensatz dazu stehen MLV, die einen hohen Lipidanteil aufweisen, in den dann die Pharmaka mit überwiegend apolarer Struktur eingebaut werden können.

Im Falle amphiphiler Substanzen, deren Partitionskoeffizient keine eindeutige Zuordnung zur Lipid oder Wasserphase erlaubt, sind spezielle Techniken entwickelt worden, die es erlauben, auch diese Substanzen mit 100 fach erhöhter Konzentration gegenüber der Umgebung in Liposomen anzureichern.

b. Verhalten in vivo

Das Verhalten von Liposomen in vivo ist intensiv untersucht worden (62). Im Körper werden die Partikel innerhalb kurzer Zeit von einer Proteinschicht bedeckt, deren Zusammensetzung in wesentlicher Weise einerseits von der physikochemischen Beschaffenheit der Liposomen abhängt, andererseits aber auch in entscheidender Weise das weitere Schicksal der Partikel bestimmt. Von besonderem Interesse sind im Hinblick auf die Verwendung von Liposomen als Träger von Antibiotika solche Partikel, die von immunologisch aktiven Molekülen wie IgG, Fibronectin oder CRP bedeckt werden. Diese Oberflächenbeschaffenheit führt zu einer mehr oder weniger schnellen Entfernung der Liposomen aus der Blutbahn auf dem Wege der Phagozytose durch das RES (63). Die Halbwertszeit von Liposomen im Blut variiert, man kann jedoch grob schematisch angeben, daß sie zumeist nur eine halbe Stunde beträgt und Spiegel nach zwei Stunden nicht mehr meßbar sind (64). Die Pharmakokinetik kann aber durch die Wahl der Lipide so modifiziert werden, das in vivo Halbwertszeiten von bis zu zehn Stunden erreicht werden (63). Andere Wege der Gewebsinvasion stehen Liposomen praktisch nicht offen, da sie auch bei einer Größe von nur 300 Å im Falle der SUV im Gegensatz zu Blutzellen die Öffnungen zwischen den

Kapillarendothelien der meisten Gewebe nicht passieren können (65). Statt dessen kommt es zu einer Akkumulation in Leber, Milz und in geringerem Maße auch im Knochenmark und den Lymphknoten (66). Dieses Verhalten bedeutet jedoch, daß die liposomale Zufuhrform auf Grund ihrer kurzen Halbwertszeit im Blut nicht geeignet ist, Infektionen die mit einer Bakteriämie einhergehen, sinnvoll zu beeinflussen oder an einem Entzündungsort, der nicht dem retikulo-endothelialen System entspricht, wirksam zu werden (67). Obwohl der Austritt von Liposomen aus der Gefäßbahn im Bereich von Infekten als diagnostische Hilfe in der Literatur beschrieben ist (68,69), kann man hier sicher nicht von einem für Medikamente zuverlässigen Applikationsweg ausgehen. Da die intrazellulären bakteriellen Infektionen, deren Behandlung mit liposomalen Formen von Antibiotika untersucht worden sind, im wesentlichen Tuberkulose, Lepra, Brucellose und Salmonellose sind, ist dieses Behandlungskonzept in der Chirurgie nicht von Bedeutung.

Die oftmals umschriebenen Infektionen in der Chirurgie können theoretisch durch eine lokale Applikation der oben beschriebenen Liposomen bekämpft werden, aber auch nach lokaler Injektion gilt, daß die Liposomen allein schon auf Grund ihrer geringen Größe rasch von den Makrophagen phagozytiert werden, die ohnehin lokal bereits in großer Anzahl vorhanden sind, und auf diese Art und Weise vom Wirkort entfernt werden, wobei diese Art der Clearance jedoch für SUV eine größere Rolle spielt als für LUV, die nach subcutaner Injektion offenbar auch über den Lymphstrom abtransportiert werden und sich danach in den regionalen Lymphknoten anreichern, während Leber und Milz gar nicht erreicht werden (70).

Ein weiteres Problem besteht schließlich in der Freisetzungseigenschaft der Wirkstoffe aus LUV. Das Ziel einer verzögerten Freisetzung wird vorzugsweise mit MLV im Falle lipophiler Pharmaka erreicht, da hier der Abbau der verschiedenen konzentrisch angeordneten Membranen nach und nach die Wirksubstanz freisetzt. Im Falle aller Antibiotika aber sind die Partikel der Wahl LUV. Falls diese nicht durch Phagozytose aus dem

Interstitialium entfernt werden, kommt es zu einem Aufbrechen der Membran durch Phospholipasen. Die Homogenität der LUV-Population führt unter diesen Umständen dazu, daß der erwünschte verzögerte Freisetzungseffekt nicht erzielt wird, sondern die gesamte Substanzmenge in einem relativ kleinen Zeitraum lokal wirksam wird.

Das einzige Pharmakon, das in einer der oben beschriebenen liposomalen Formen eine Zulassung auf dem Markt erhielt, ist eine lipidverkapselte Form des Antimykotikums Amphotericin B mit dem Handelsnamen Ambisome®. Alle anderen Präparate sind bisher nicht über das präklinische oder experimentelle Stadium hinausgelangt.

c. morphologische Charakteristika und Herstellungsprinzip multivesiculärer Liposomen

Im Gegensatz zu Beschaffenheit und Größe der verschiedenen bereits charakterisierten Liposomen stehen die als multivesiculär bezeichneten Partikel, die von Kim und Mitarbeitern beschrieben wurden (71). Es handelt sich hierbei zunächst um wesentlich größere Partikel, deren Durchmesser zwischen 5 und 100 µm liegen können. Die umschlossene Flüssigkeit liegt nicht als einzelner Raum vor, sondern verteilt sich maulbeerartig auf eine Vielzahl von Kammern, die ihrerseits in ihrer Größe in etwa den LUV entsprechen (Abbildung 2). Diese Kammern werden von Lipid-Doppelmembranen begrenzt, die jeweils zur Hälfte den verschiedenen aneinander grenzenden Partikeln zugehören. Auch die äußere Umhüllung der Gebilde stellt wiederum eine Doppelmembran dar. Als Nachteil ist zu werten, daß der kostenintensive Einsatz von Lipiden, der unter diesen Umständen zur Verkapselung eines gegebenen Volumens wässriger Lösung erforderlich ist, wesentlich größer ist als dies bei LUV der Fall ist. Andererseits stellt diese besondere Konfiguration die erwünschte verzögerte

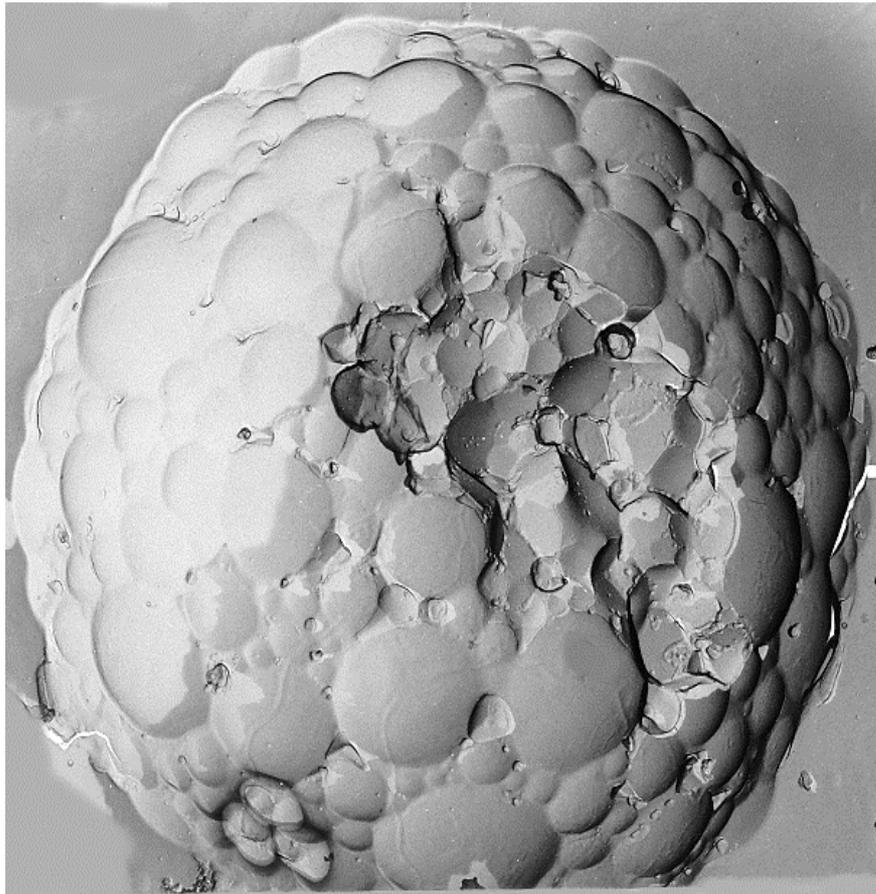


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines multivesiculären Liposoms

Freisetzung des Pharmakons sicher, die sonst für hydrophile Substanzen durch liposomale Applikation nicht zu erzielen ist.

Das prinzipielle Verfahren zur Herstellung von multivesiculären Liposomen wurde 1983 von Kim und Mitarbeitern beschrieben (71). Es handelt sich im wesentlichen um einen doppelten Emulsionsprozeß, bei dem zunächst eine Wasser-in-Öl Emulsion hergestellt wird, die dann erneut in einer wässrigen Lösung suspendiert wird.

Die wässrige Lösung, die in der Originalpublikation Cytosin-Arabinosid, in unseren Experimenten Amikacinsulfat in einer Konzentration von 50 mg/ml enthält, wird mit hoher Energie mit der Lipidphase, die die Membranlipide Triolein, Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) und Cholesterol im molaren Verhältnis von 1 : 1,3 : 5,3 : 8,5 enthält, emulgiert. Dabei bilden sich typische Lipid-Einzelmembranen zwischen den Tröpfchen der wässrigen Lösung und der kontinuierlichen Phase aus. Die entstehende Emulsion wird in das fünffache Volumen einer Glucose/Lysin-Lösung überführt und danach noch einmal für kurze Zeit mit niedriger Energie emulgiert. Es resultieren dann Partikel, die von einer äußeren Lipid-Einzelmembran umgeben sind, und die in einer kontinuierlichen Chloroform-Phase die Primärpartikel enthalten, die ihrerseits in wässriger Phase den Wirkstoff beinhalten. Durch einen 10minütigen Abdampfungsprozeß unter einem Stickstoffstrom wird anschließend das Chloroform verdunstet, was zur Folge hat, daß die bisher voneinander getrennten Lipid-Einzelmembranen zu typischen Doppelmembranen kondensieren. Abschließend werden die Partikel zweimal in 0,9% NaCl gewaschen und jeweils 10 min bei 600 G zentrifugiert. Parameter und Umstände der Herstellung können variiert werden und determinieren die Eigenschaften des fertigen Produktes.

Der Prozeß ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Abbildung 4 zeigt ein lichtmikroskopisches Bild der typischen Partikel.

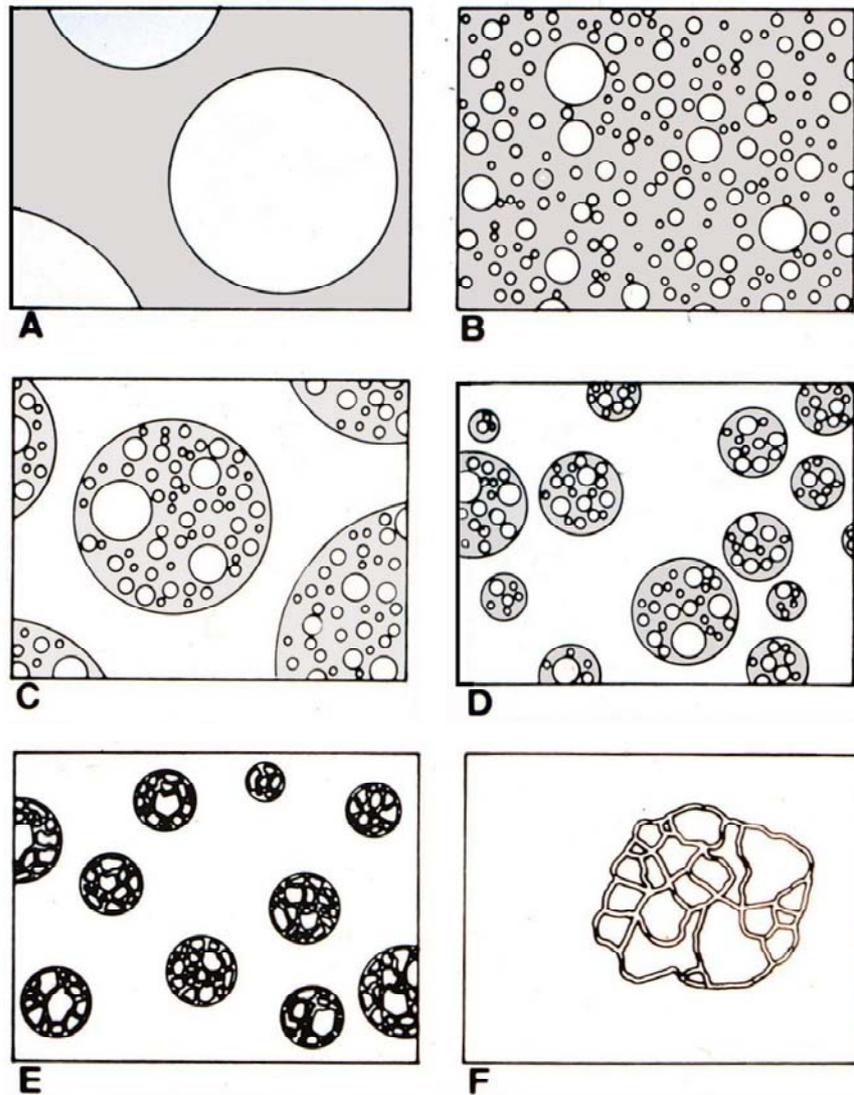


Abbildung 3: Herstellungsprinzip multivesiculärer Liposomen

A: Grobe Tropfen wässriger Lösung in Lipidphase (Chloroform), **B:** Nach Emulgieren sind feinste Tröpfchen wässriger Lösung durch Monolayer-Membran von Lipidphase getrennt, **C:** Sogenannte erste Emulsion überführt in wässrige Glucose/Lysin Lösung. Die Lipidpartikel durch zweite Monolayer-Membranen von wässriger Lösung getrennt, **D:** nach zweiter Emulgierung kleinere membranumschlossene Lipidpartikel mit den Inhalt noch kleinerer membranumschlossener Tröpfchen der Wirksubstanz, **E:** Abdampfungsprozeß des Chloroforms unter Stickstoffstrom, **F:** Fertiges multivesiculäres Partikel mit Umhüllung der inneren Kammern durch Lipid-Doppelmembranen.

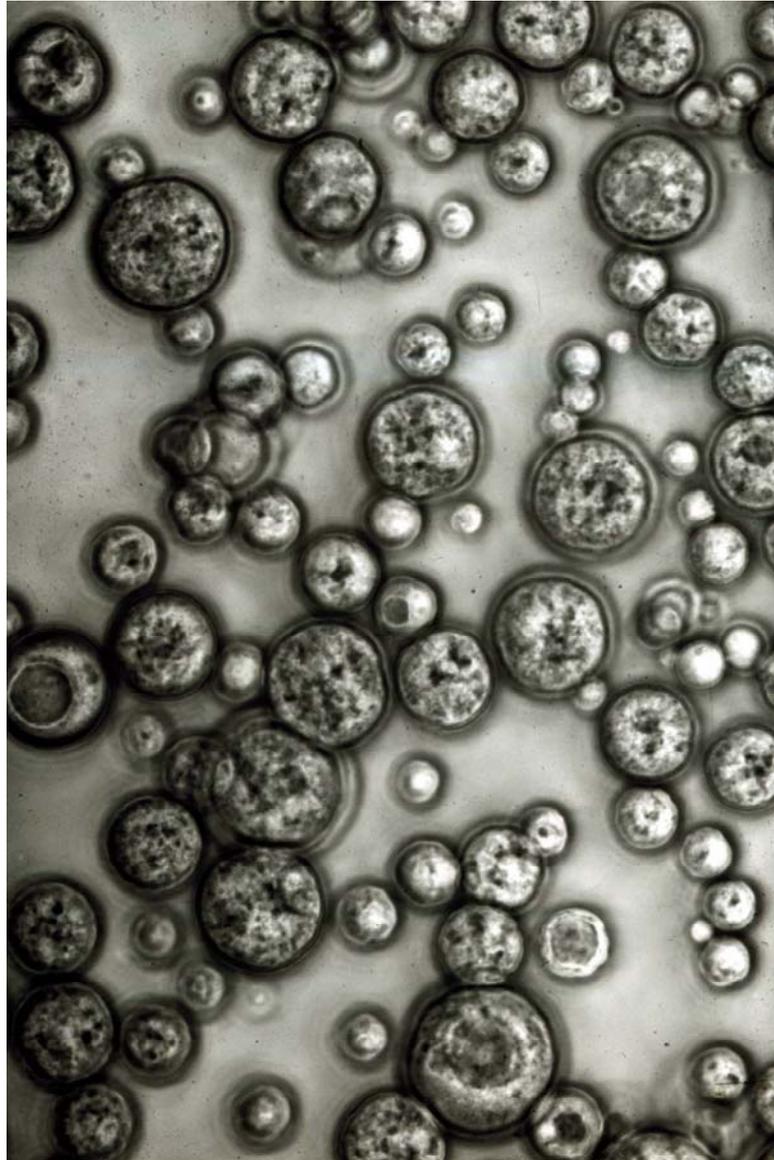


Abbildung 4: Lichtmikroskopisches Bild multivesiculärer Liposomen (400x)

II. Methoden und Ergebnisse

1. Entwicklung Amikacin-haltiger multivesiculärer Liposomen

A. Wahl des geeigneten Antibiotikums

Es existieren verschiedene mehr oder weniger wichtige Gesichtspunkte, die bei der Wahl geeigneter Pharmaka für die Verkapselung und Langzeitwirkung zu beachten sind. Zunächst muß die zur Debatte stehende Substanz ein geeignetes Wirksamkeitsspektrum aufweisen. Wenn auch eine derartige galenische Substanzzubereitung im Prinzip für ein ganz bestimmtes Infektproblem konzipiert werden kann, ist es doch eher wünschenswert, ein Antibiotikum mit einem breiten Spektrum zu wählen. Substanzen wie Tetracykline, Aminopenicilline oder Schmalspektrum-Präparate wie Glykopeptide scheiden daher aus.

Des weiteren muß die massenbezogene antibakterielle Potenz hoch sein. Wenn man davon ausgeht, daß unter Umständen nur 20% der Masse eines Arzneimittels mit verzögerter Freisetzung Wirksubstanz, aber 80% Trägersubstanz sind, wird klar, daß man nicht lokal 15 g eines Präparates injizieren kann, was zum Beispiel bei einem Acylaminopenicillin mit einer konventionellen Dosierung von 3 x 5g dem Äquivalent einer Tagesdosis entspräche. Im Bereich der Breitspektrumantibiotika sind damit die Penicilline und weitgehend auch die Cephalosporine disqualifiziert, während Kandidaten erster Ordnung die Aminoglycoside und Kandidaten zweiter Wahl die Chinolone sind. Da die Resistenzspektren von Aminoglycosiden ebenso günstig sind wie die der Chinolone (35,36) besteht von pharmakologischer Seite keine Veranlassung auf die Chinolone zurückzugreifen.

Bei Gentamicin und Tobramycin kann man in nahezu jedem Träger ein mehrfaches der durchschnittlichen Tagesdosis von 240 mg applizieren. Schwieriger ist die Situation bei Amikacin, das etwas abseits der übrigen Vertreter dieser Substanzklasse steht. Es hat eine 4 fach geringere spezifische Aktivität, wirkt jedoch in den entsprechenden Konzentrationen

auch noch gegen Problemkeime, die gegen die anderen Aminoglykoside resistent sind (35,36,72,73). Die Tagesdosis von 1g läßt sich in der Regel noch problemlos an eine Trägersubstanz binden. Die gleichen Voraussetzungen gelten prinzipiell auch für die Chinolone, deren Tagesdosen bis zu 1g betragen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Lagerungsstabilität in wässriger Lösung. β -Lactamantibiotika sind von vornherein nicht in wässriger Lösung lagerbar und eignen sich von daher nicht für Verkapselung in flüssigen Medien. Das gleiche gilt für alle anderen Antibiotika außer den Aminoglykosiden und den Chinolonen, wobei im letzteren Fall allerdings die Dosis von 500 mg in einem für liposomale Verkapselung nicht zu handhabenden Volumen von 100 ml geliefert wird. Möglicherweise könnte die Konzentration jedoch erhöht werden.

Ein anderes Argument für oder wider eine bestimmte Substanz stellt die Verfügbarkeit dar. Präparate, die noch patentgeschützt sind, erfordern eine enge Kooperation mit dem Hersteller und können, wenn man die Substanz nicht als Generikum in großen Mengen beziehen kann, das Projekt finanziell stark belasten. Diese Überlegungen legen die Wahl eines Aminoglykosids zur liposomalen Verkapselung nahe, eine Entscheidung, die auch durch die für diese Kombination umfangreiche Literatur unterstützt wird (Übersicht bei 67). Bei der Wahl der Substanz aus dieser Klasse erscheinen Gentamicin und Tobramycin auf Grund ihrer hohen Wirksamkeit überlegen und werden auch tatsächlich in Publikationen am häufigsten als Antibiotika in diesen Präparationen verwendet. Es ist aber zu bedenken, daß das chemische Gerüst von Gentamicin und Tobramycin dem Neomycin verwandt ist, das in zahlreichen rezeptfreien Salben zur äußerlichen Anwendung enthalten ist. Dieser Umstand stellt in Verbindung mit der Tatsache, daß Neomycin ein erhebliches Allergisierungspotential hat, bei dem hochgradige Kreuzallergie zu Gentamicin und Tobramycin, aber nur in geringem Maße zu Amikacin besteht, einen wichtigen Einwand dar (74,75). Während eine allergische Reaktion bei Trägern, die chirurgisch wieder entfernt werden können, ein

geringeres Problem darstellt, kann sie bei injizierbaren Präparaten zu ernsthaften Problemen führen, die dann schwieriger zu behandeln sein können als nach intravenöser Injektion des konventionellen Präparates, das ja spätestens nach 24 Stunden die Blutbahn verlassen hat.

Unter den beschriebenen Gesichtspunkten fiel die Entscheidung auf Amikacin, da bei ausreichender Wirksamkeit ein hervorragendes Spektrum und ein geringes Nebenwirkungspotential besteht. Die Sorge, dieses Reserve-Antibiotikum in seiner Wirksamkeit für systemische Anwendungen auf Dauer zu beeinträchtigen, bestand nicht. Die Wirksamkeit von Amikacin hat in mehreren Jahrzehnten seiner Anwendung nicht gelitten (72,73,76,77). Angesichts der Nischenindikation, die für lokal anzuwendende Präparate mit verzögerter Wirkstofffreisetzung besteht, ist eine solche Konsequenz auch in dieser Anwendung kaum zu befürchten.

B. Entwicklung eines Herstellungsprozesses multivesiculärer Amikacin-Partikel zur tierexperimentellen Anwendung

Die von Kim beschriebenen Vorgehensweise wurde von Grayson und Mitarbeitern für die Verkapselung von Gentamicin verwendet (78). Dabei wurde weiterhin die ursprüngliche Dimension von 1ml Lipid- und 1 ml wässriger Lösung im Emulgierungsprozeß verwendet. Dieser fand in kleinen Glasbehältern, die auf einem Laborschüttler befestigt wurden, statt. Die resultierende Ausbeute an Partikeln war dabei jedoch so gering, daß mindestens 5 Chargen kombiniert werden mußten, um eine ausreichende Menge zur Wirkstoffmengenbestimmung und für einen Tierversuch zu erzeugen. Es stellte sich heraus, daß diese Produktionsmethode heterogene und schlecht reproduzierbare Präparationen ergab, da verschiedene Schüttler unterschiedliche Ergebnisse erbrachten und die Leitungsfähigkeit eines einzelnen Gerätes mit zunehmender Nutzungsdauer durch Erwärmung des Motors absank. Auch nach Kombinieren mehrerer Chargen konnte somit

eine ausreichende Homogenität des tierexperimentell anzuwendenden Produktes nicht erzielt werden, so daß eine neue Herstellungsmethode entwickelt werden mußte.

Emulsionen werden im industriellen Prozeß oftmals durch Rotationsmischverfahren hergestellt (79,80), wobei im vorliegenden Fall mehrere Faktoren bei der Entwicklung zu berücksichtigen waren.

Die zuzuführende Energiemenge war nicht bekannt, wohl aber die Tatsache, daß aus Gründen der Lipidstabilität eine zu starke Erwärmung der Emulsion vermieden werden sollte. Die wässrige Lösung enthält nach Kims ursprünglicher Formulierung 0,1 N HCl, die in dieser Konzentration alle Arten von Metallen angreift und auch aus Edelstahl oberflächlich Partikel auslöst (81). Chloroform als Lipidphase ist unverträglich mit den meisten Kunststoffen, so daß als Materialien für den Prozess im wesentlichen Glas und Teflon in Frage kamen.

Die Intensität der Emulgierung kann allgemein durch Rotor- Stator Anordnungen, die aber höhere Temperaturen erzeugen, erhöht werden. Bei konzentrischer Anordnung eines Impellers in einem Mischbehälter entsteht Kavitation, die in einer unzureichenden Emulgierung resultiert. Zur Vermeidung dieses Effekts kann die Achse des Impellers im Mischgefäß exzentrisch angeordnet werden oder die Wandung des Gefäßes mit Einbuchtungen im Sinne von Wellenbrechern der Kavitation versehen werden.

Da nicht bekannt war, mit welchen Emulgierungsbedingungen eine adäquate erste Emulsion des Präparates zu erzeugen war, wurde ein versatiles System verschieden geformter Glasbehälter unterschiedlicher Größe entwickelt und so in ein Mischgerät integriert, daß eine exzentrische Anordnung des Impellers in definierten und reproduzierbaren Ausmaßen ermöglicht wurde. Der luftdichte Abschluß des Gerätes wurde durch eine auf den geschliffenen Oberrand des wandstarken Glasbehälters aufgepreßte Teflonplatte gewährleistet. Die reproduzierbare Exzentrizität wurde dadurch

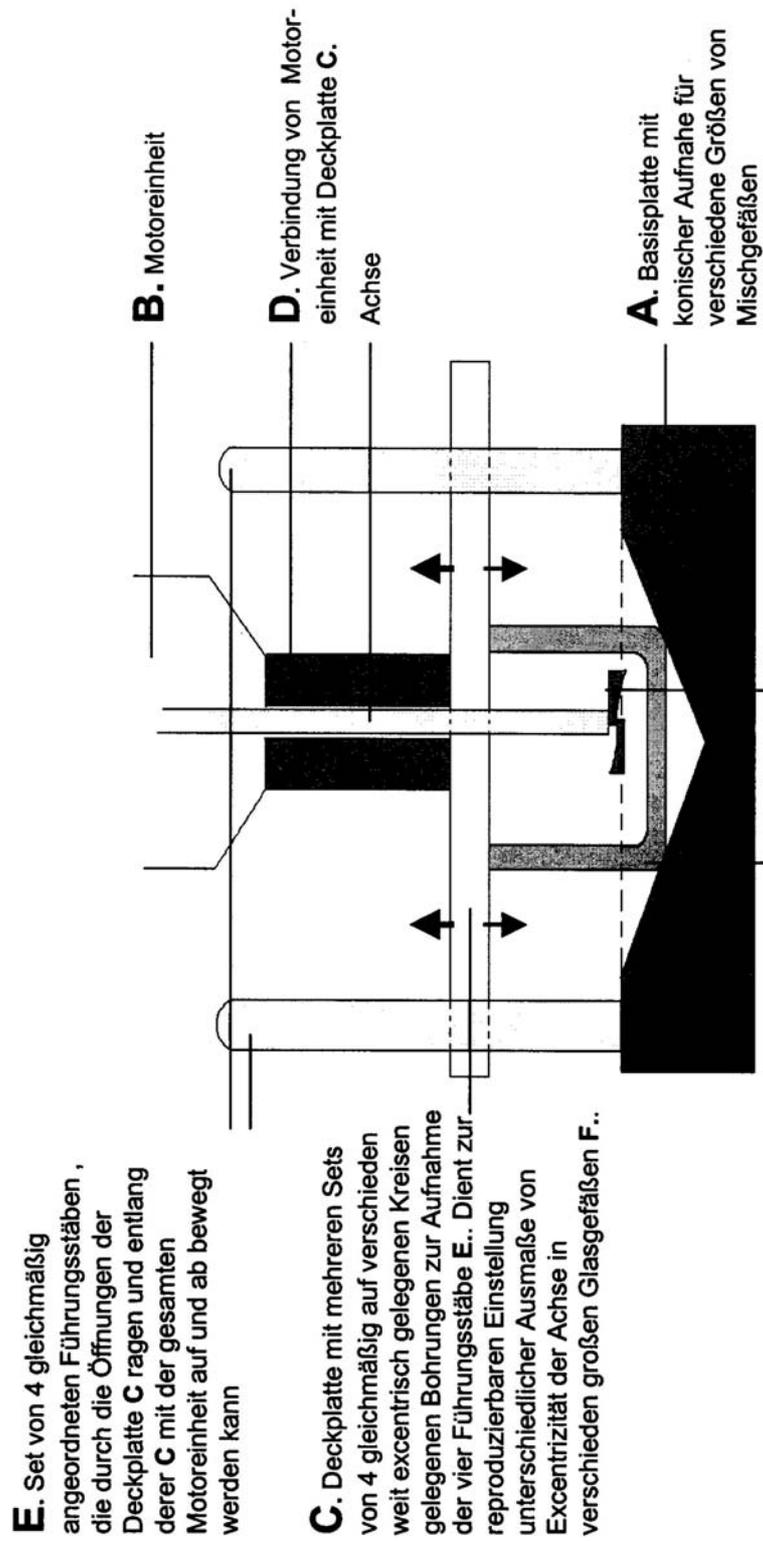


Abbildung 5: Mixanordnung zur Herstellung von Depot-Amikacin

erzielt, daß das Gefäß durch den Druck von oben selbstzentrierend in eine konische Ausbuchtung eines metallenen Ständers gepreßt wurde, der seinerseits 4 symmetrisch senkrecht angeordnete Metallstäbe trug. Diese paßten exakt in verschiedene Sets von jeweils 4 Löchern, die in der Teflon-Deckplatte angeordnet waren, so daß sich aus dieser Lage eine definierte Exzentrizität der Position des Glasgefäßes im Verhältnis zum Impeller ergab. Als Mixgerät wurde das Gerät TK Homo M (American Triad, Anaheim, CA, USA) verwendet, an das die beschriebene Anordnung angepaßt wurde (Abb. 5).

Die nach den bestehenden Angaben hergestellten Partikel wiesen eine im Vergleich zu anderen verkapselten Substanzen auffallend geringe Größe und unregelmäßige Form auf. Da Versuche, dies durch Verkürzung der zweiten Emulgierungsphase zu modifizieren, zu unerwünschter Heterogenität der Partikel führten, wurde als alternativer Weg die Osmolalität der einzusetzenden wässrigen Lösung untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die verwendete Amikacin-Sulfat Lösung in einer Konzentration von 50 mg/ml deutlich hypoosmolar war.

Unter diesen Umständen wurde davon ausgegangen, daß die Osmolalität der Wirkstofflösung bei geplanter Lagerung der Partikel in physiologischer Kochsalzlösung oder in einem entsprechenden gepufferten Medium in etwa der physiologischen Osmolalität entsprechen sollte. Der Versuch, dies durch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration zu erzielen, führte zu zwei unerwünschten Effekten. Zum einen ergab sich eine deutlich herabgesetzte Fraktion verkapselten Amikacins, zum anderen waren die entstehenden Partikel nicht ausreichend stabil. Es wurde daher der Weg gewählt, die Osmolalität durch Hinzufügen einer osmotisch aktiven Substanz zu erhöhen. In einigen Experimenten wurden Oligosaccharide als geeignete Substanzen identifiziert, wobei die Wahl auf Sucrose fiel, da dieses Molekül keine reduzierenden Eigenschaften besitzt.

Nach umfangreichen Versuchen, bei denen die verschiedenen Parameter variiert wurden (Wirksubstanzkonzentration, osmotische Konzentration der

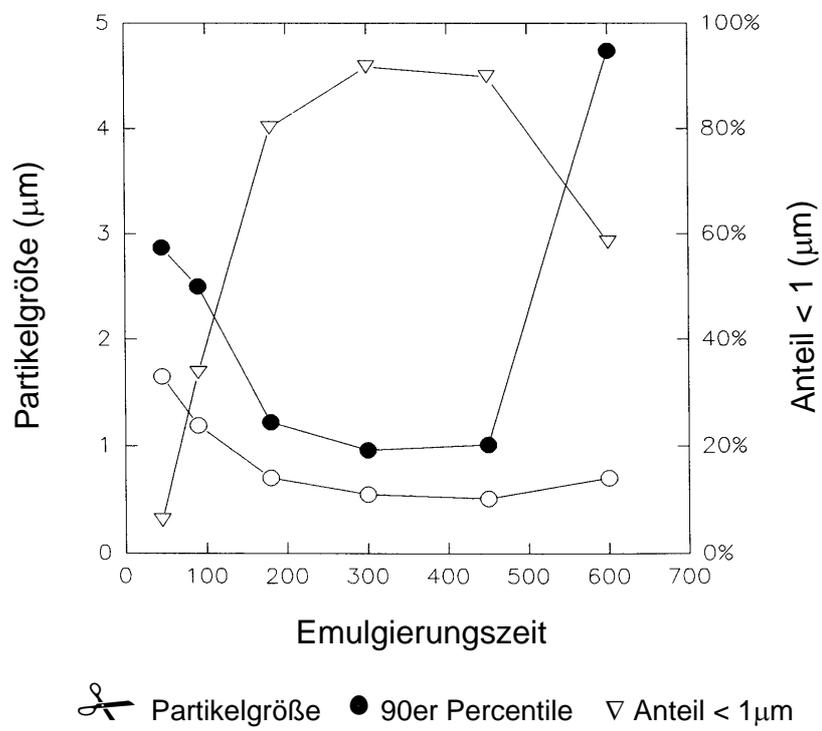


Abbildung 6: Beziehung zwischen Emulgierungszeit der ersten Emulsion, mittlerer Partikelgröße und Größenverteilung der Partikel (Einfachbestimmungen)

wässrigen Lösung, Gefäßgröße, Einbuchtungen, Emulsionsvolumen, Geschwindigkeit, Dauer, Exzentrizität, Impellerform) wurden Standardbedingungen definiert, die in reproduzierbarer Weise die Herstellung von Partikeln erlaubten, die für den Tierversuch geeignete Eigenschaften aufwiesen.

Die Mischzeit der ersten Emulsion wurde dabei einerseits über die Messung der Größenverteilung der wässrigen Partikel nach dem Laserlicht-Streuungsverfahren bestimmt (Horiba LA 500, Horiba, Irvine, CA, USA), wobei eine Größenordnung von etwa $1\mu\text{m}$ nach einer Emulsierungsphase von 5 min erreicht war, während nach 10 min Sekundäreffekte, die wieder zum Auftreten größerer Partikel führten, auftraten (Abb. 6).

Man muß die Größenangabe mit einer gewissen Vorsicht werten, da auf Grund der Wellenlänge des verwendeten Laserlichts das Verfahren der Laserlicht-Diffraktion in diesem Bereich keine direkten Messungen mehr zuläßt, sondern das Gerät extrapolierte Werte angibt und einige Ungenauigkeiten des Verfahrens durch die Tatsache bedingt sind, daß die Messungen in der verdunstenden Chloroform-Lösung in einer offenen Kuvette stattfanden. Dennoch sind die gefundenen Ergebnisse so konsistent, daß zumindest die etwaige Partikelgröße angegeben werden kann. Diese Untersuchungen sind auch konsistent mit elektronenmikroskopischen Darstellungen (Abbildung 2) und Ergebnissen der Gefrierbruchtechnik (Abbildung 7).

Ohne daß zu diesem Zeitpunkt Details des in vivo Verhaltens bekannt waren, wurde davon ausgegangen, daß die Wirkstofffreisetzung bei Partikeln, die aus zahlreichen kleinen Einzelzellen bestehen, besser kontrollierbar ist als bei solchen, die nur wenige Untereinheiten haben.

C. Physikochemische Charakterisierung

a. Morphologie

Während die Vorstellungen über den Ablauf des Herstellungsprozesses zunächst weitgehend hypothetischer Natur waren, konnten verschiedene Untersuchungen die entwickelten Modelle bestätigen.

Zunächst können sowohl die erste Emulsion als auch die fertigen Partikel mikroskopisch untersucht werden. Während eine Partikelgröße der ersten Emulsion von ca. 1 μm die Möglichkeiten der Lichtmikroskopie begrenzt, kann doch die Homogenität der Emulsion mehr als ein optischer Eindruck denn als eine klare Quantifizierung beurteilt werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch durch die Instabilität der Emulsion, die durch den hohen Chloroform-Gehalt und seine kontinuierliche Verdampfung gegeben ist, kaum möglich. Das fertige Produkt kann dagegen ohne weiteres in wässriger Lösung lichtmikroskopischen Untersuchungen unterzogen werden, wobei Partikelform, Größe einzelner Partikel, aber auch abschätzend die Größenverteilung einer Population bestimmt werden können. Die granuläre Erscheinung der Partikel unter dem Lichtmikroskop im Vergleich zur glatt homogenen Erscheinung anderer Liposomen unterstützt das Modell multivesiculärer Partikel (vgl. Abbildung 4). Die äußere Form und Oberflächenbeschaffenheit ist zusätzlich durch die rasterelektromikroskopische Darstellung demonstriert.

Eine weitere Methode der physikochemischen Charakterisierung der Partikel besteht in dem Verfahren des Gefrierbruchs. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer solchen Aufschließung eines fertigen Partikels. Auch hier ist das Ergebnis der Untersuchung konsistent mit den zuvor entwickelten Vorstellungen.

b. Partikelgröße

Nach dem gleichen Prinzip der Laserlicht-Streuung, das bereits für die Beurteilung der ersten Emulsion beschrieben wurde, wurden auch die fertigen Partikel in ihrer Größenverteilung analysiert, wodurch ebenfalls be-

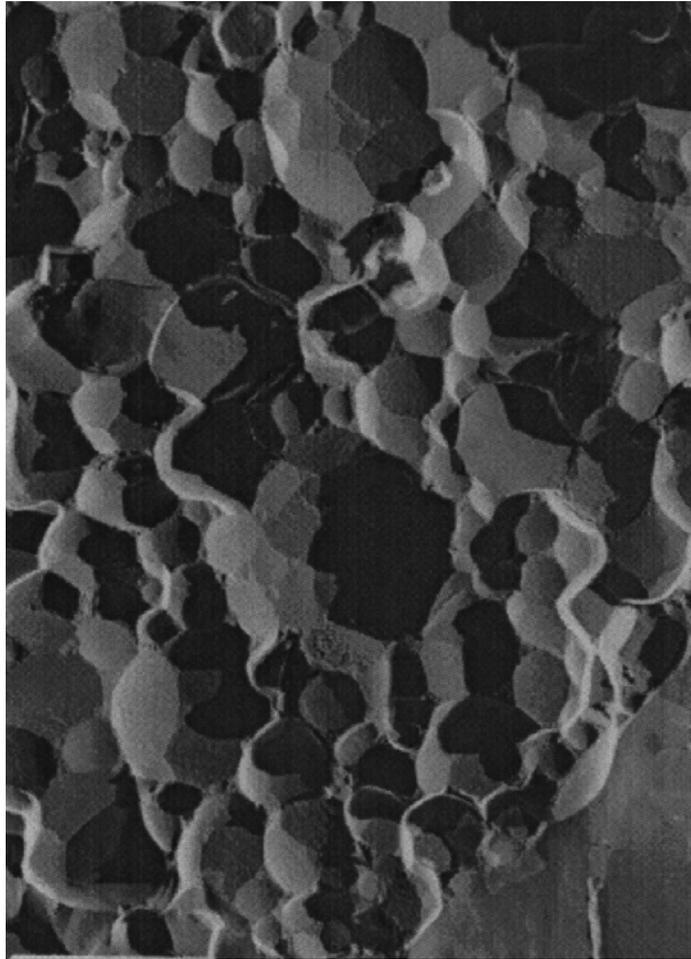
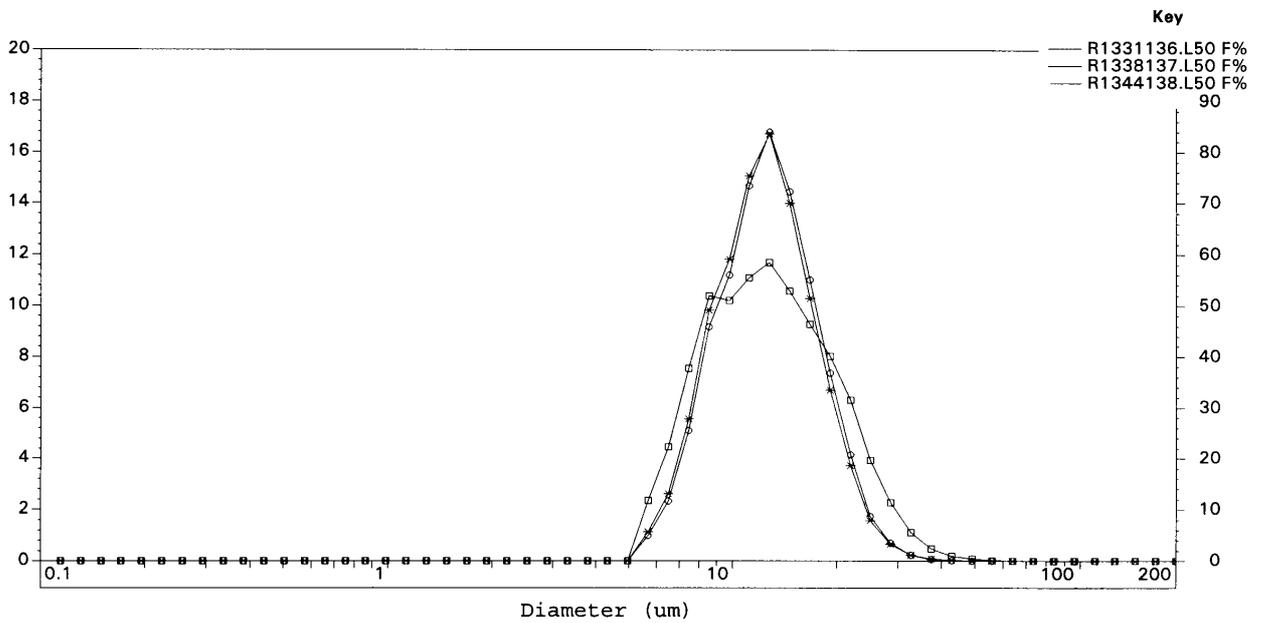


Abbildung 7: Gefrierbruch-Darstellung von multivesiculären Liposomen



Sample	Mean (um)	Median (um)	Spec. Area (cm ² /cm ³)	Std. Dev.
87	12.66	11.96	4241	1.11
88	12.89	12.22	4176	1.12
89	13.55	12.13	3677	1.58

Abbildung 8: Partikel-Größenbestimmung durch Laser-Lichtstreuung

stätigt wurde, daß die Größe der endgültigen Partikel unter anderem durch die beim zweiten Emulgierungsvorgang zugeführte Gesamtenergie (Zeit und Geschwindigkeit) bestimmt wird. Bei höherer Mischenergie und kleiner werdenden Partikeln wird die Größenverteilung homogener, die Verteilungskurve steiler. Bei abnehmender Mischenergie bleibt der Anstieg der Verteilungskurve immer noch relativ steil, da keine große Streuung zu kleineren Partikeln erfolgt, während der abfallende Schenkel eine größere Streubreite zu großen Partikeln aufweist, die dann bei der Mischung nicht ausreichend getroffen wurden. Abbildung 8 zeigt die Partikelgrößenverteilungskurve von drei Präparationen.

c. Analyse des Wirkstoff-Gehalts

Die Bestimmung von Amikacin im Serum zur Spiegelüberwachung bei antibiotischer Therapie ist klinische Routine. Dazu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zunächst besteht die Möglichkeit, die biologische Wirksamkeit von Antibiotika zur Konzentrationsanalyse heranzuziehen und die Konzentration nach der Hemmhofgröße zu bestimmen (82). In klinischen Laboratorien gebräuchliche Verfahren sind der Polarisationsassay von Abbot (83), der an die Verfügbarkeit des speziellen Tdx Assay-Analysengerätes gebunden ist und der von der Geräteausstattung her universeller anwendbare Emit® Assay (Syva, Palo Alto, CA, USA) (84). Die Reagentienausstattung beider Verfahren ist für die Bestimmung von Serumspiegelbestimmungen beim Menschen geprüft und zugelassen und wird nur durch die Originalhersteller geliefert, was für ein Forschungsprojekt in dem Hunderte von Analysen anfallen, finanziell nicht tragbar ist.

Als Alternative wurde daher ein Partikel-Konzentrations-Fluoreszenz-Immunassay (PCFIA) für Amikacin entwickelt. Das in der Literatur publizierte Verfahren des PCFIA (85), das Varma-Nelson für die Bestimmung von Gentamicin beschrieb (86), wurde an die Bedürfnisse der Amikacin-Bestimmung mit besonderer Berücksichtigung extrem niedriger Serumkonzentrationen bei lokaler Anwendung der Substanz angepaßt.

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Bindungskompetition zwischen Amikacin im Analysat und Fluoreszenz-markierten Amikacinmolekülen (The Binding Site, San Diego, CA, USA), die in definierter Konzentration beigefügt werden, um Antikörper, mit denen die Oberfläche von Polystyrol-Partikeln beschichtet wurde. Die Reaktion findet auf einer speziell für das Verfahren entwickelten 96 Loch-Platte statt, bei der der Boden jeder Vertiefung aus einem mikroporösen Sieb besteht. Nach Ablauf der kompetitiven Reaktion wird der Flüssigkeitsüberstand durch ein den Boden der Platte bildendes Filter abgesaugt. Dadurch setzt sich auf der Basis der Vertiefung eine Schicht von Polystyrolpartikeln ab, deren Fluoreszenzintensität auf von oben einfallendes Licht umgekehrt proportional der Konzentration von freiem Amikacin im Analysat ist. Die Amikacin-Konzentration wird dann gegen den Quotienten aus FITC- (535 nm) zu Phycoerythrin-Fluoreszenz (620nm) aufgetragen, woraus sich eine Regressionskurve zweiter Ordnung errechnen läßt. Platten und Fluorimeter sind speziell für dieses Verfahren entwickelt worden (Idexx, Pandex Laboratories, Il, USA). Abbildung 9 zeigt eine typische Kalibrierungskurve. Durch Einsetzen in die Regressions-gleichung werden die gesuchten Amikacin-Konzentrationen bestimmt.

Gegenüber den im klinischen Gebrauch üblichen Verfahren erlaubt diese Nachweismethode die Bestimmung von kleinsten Dosen, da die einzelnen Komponenten des Assays frei variierbar sind. So ließ sich zum Nachweis im Plasma bei verzögerter lokaler Freisetzung die Sensitivität auf einen Bereich zwischen 1 und 10 ng/ml und somit um einen Faktor 10^3 steigern. Um dies zu erreichen, wurde die Analysatmenge unverdünnt aufgetragen und gleichzeitig das Analysatvolumen erhöht, so daß sich eine 15 fach höhere Konzentration von Amikacin im Analysat ergibt, während zusätzlich die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Moleküls um 4 Verdünnungsstufen und die Zahl der verfügbaren Antikörper um einen Faktor 2 reduziert wurde. Unter diesen Umständen ist es jedoch erforderlich, die Kalibratoren auf die jeweilige zur Bestimmung gelangende Flüssigkeit einzustellen. Das heißt, das Bestimmungen von Harnproben auf Urin, Bestimmungen von

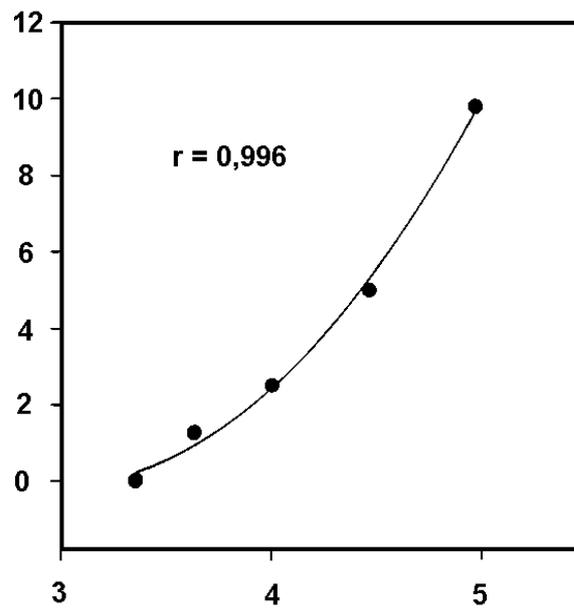
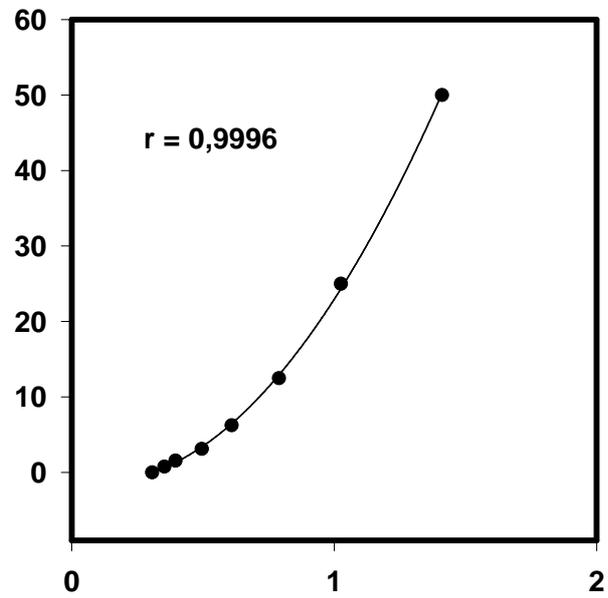


Abbildung 9: Kalibrierungskurve des Standard- (oben) und des „Nano-Assays“ (unten)

Analysat	Phosphatpuffer/ Serum 1:1		Phosphatpuffer/ Urin1:1	
	2,5ng	25ng	39ng	1250ng
eingesetzte Substanzmenge	2,5ng	25ng	39ng	1250ng
Wiederfindungsrate	116%	103%	116%	100%
Variationskoeffizient bei Vierfachbestimmung am gleichen Tag	17%	4%	5%	2%
Variationskoeffizient zwischen verschiedenen Tagen	7%	1%	1%	1%

Tabelle 1: Assayverhalten im Nanogrammbereich für Serum- und Urinproben

Blutproben auf Plasmastandards beruhen sollten. Mit diesem System erzielten wir die in Tabelle 1 dargestellte Leistungsfähigkeit.

d. Analyse der Lipidmembran und der Beistoffe

Zur weiteren Analyse der Partikel diente die Untersuchung der Lipidmembranen durch HPLC. Die Analysenwerte mit Standardabweichungen sind im Zusammenhang mit der Reproduzierbarkeit der Partikel tabellarisch dargestellt (Tabelle 2).

Umfangreiche Überlegungen wurden hinsichtlich des Verbleibs der eingesetzten Salzsäure des wässrigen Mediums der ersten Emulsion angestellt, da die Bestimmung der korrekten Ausgangsmolalität der wässrigen Phase von der Frage abhängt, ob die Salzsäure in den Partikeln verbleibt oder hinausdiffundiert. Auf Grund der geringen Molekülgröße war anzunehmen, daß dieser Bestandteil während der zweiten Emulgierungsphase in die Lysin-Lösung übergeht oder zumindest nachfolgend bei Waschungen mit NaCl aus den Partikeln herausdiffundiert. Eine Messung des pH in der Lysinlösung, die als Überstand nach Zentrifugieren der Partikel verbleibt, erschien auf Grund der Pufferkapazität

der Lysinlösung nicht aussagekräftig. In gleicher Weise weist nach Lyse der Partikel mit Methanol die resultierende Lösung zwar keinen sauren pH auf, aber angesichts der insgesamt 4 Aminogruppen des Amikacin-Moleküls verhindert auch hier die Pufferung eine verlässliche Aussage. Statt dessen wurde versucht, durch Nachweis des CL^- -Anions im Überstand die Frage zu klären. Beim Vergleich der Lysinlösung mit einer Standardlösung, die mit Chloridionen in definierter Konzentration hergestellt wurde, ergab sich dabei ein Ergebnis, das mit einer vollständigen Diffusion der Salzsäure aus den fertigen Partikeln in die Lysinlösung vereinbar ist.

Die Konzentration des Lysin im Lagerungsmedium nach zweimaliger Waschung in physiologischer NaCl-Lösung lag unterhalb der von der Food and Drug Administration festgelegten tolerablen Höchstgrenze für Verunreinigungen dieser Art.

Die Konzentration von Sucrose als neutralem Begleitstoff in den Partikeln wurde nicht analysiert.

e. Reproduzierbarkeit

Während die Herstellungsbedingungen anfänglich gefertigter Gentamicin-Partikel insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Reproduzierbarkeit unzureichend waren, sollte durch die Weiterentwicklung des Prozesses eine gleichbleibende Qualität, die auch für die Wiederholbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse von entscheidender Bedeutung ist, erreicht werden. Als Determinanten der Reproduzierbarkeit wurden verschiedene Parameter identifiziert.

Wesentliche Faktoren sind zunächst die Inhaltsstoffe. Darunter sind der Prozentsatz des eingesetzten Pharmakons, der verkapselt wurde, und dementsprechend auch die Konzentration des Wirkstoffs im fertigen Produkt, der Lipidanteil der überstandsfreien Liposomen nach Lyse, und die Konzentration der verschiedenen Membranlipide. Tabelle 2 zeigt ein Beispiel

eines Analysenergebnisses von drei in der Ausgangszusammensetzung gleichen, nacheinander gefertigten Chargen.

Substanz	Ausgangskonzentration		Analyse	
	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$
Amikacinsulfat	50,00	85,54	$24,05 \pm 0,39$	$40,82 \pm 0,91$
Sucrose	41,04	120	nicht best.	nicht best.
HCl		100		<1
DPPG	2,03	2,7	$0,66 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,12$
DOPC	9,5	12,1	$9,5 \pm 0,6$	$12,1 \pm 0,7$
Cholesterol	7,5	19,5	$4,9 \pm 0,94$	$12,7 \pm 2,4$
Triolein	2,1	2,3	$0,61 \pm 0,1$	$0,68 \pm 0,11$
Lipokrit			$13,95 \pm 0,43 \%$	
Partikelgröße			$19,85 \pm 1,05 \mu\text{m}$	
Ausbeute (Amikacin)			$48 \pm 1,1 \%$	

Tabelle 2: Ausgangskonzentrationen und Analysenergebnisse dreier Präparationen von Depot-Amikacin Partikeln

Neben dem Median der Partikelgröße ist die Größenverteilung eine Determinante konstanter Produktbeschaffenheit. Hier ist neben der subjektiv gefärbten Beurteilung des Präparates unter dem Mikroskop eine objektive Messung durch die Laserlicht-Streuung erforderlich. Abbildung 8 stellt Meßergebnisse für zwei Chargen, die unter den gleichen Bedingungen hergestellt wurden, dar. Daneben konnte eine andere durch ihre abweichende Partikelgröße identifiziert werden. Während die Ursachen für diese Art abweichenden Verhaltens nicht immer sicher geklärt werden können, wurden derartige Chargen von der tierexperimentellen Verwendung ausgeschlossen.

f. Stabilität

Die Partikel stellen ein recht komplexes Membransystem dar. Während der biologische Abbau im Gewebe und die spontane Desintegration mutmaßlich unterschiedliche Prozesse darstellen, schien es doch erforderlich,

grundlegende Information über den spontanen Zerfall und die Lagerungsstabilität zu gewinnen, damit nicht Alterung des Präparates, womöglich schon wenige Tage nach der Herstellung die Tierexperimente beeinflusst. Andererseits schienen von Untersuchungen der Lagerungsstabilität auch weitere Aufschlüsse über Reproduzierbarkeit von Chargen zu erwarten zu sein.

Es war rasch zu erkennen, daß eine Lagerung bei Raumtemperatur keine ausreichende Stabilität gewährleisten würde. Die Aufbewahrung der Partikel erfolgte daher üblicherweise bei 4° Celsius. Die dabei nur langsam erfolgende Desintegration ließ jedoch eine Stabilitätsuntersuchung in einem vertretbaren zeitlichen Rahmen nicht zu, so daß akzelerierte Untersuchungen mit Inkubation bei 37° C durchgeführt wurden. Die Validität dieses Ansatzes war von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Partikel mit dem Inhaltsstoff Cytosin-Arabinosid durchgeführt worden und wurde für Amikacin nicht wiederholt.

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurde gleichzeitig versucht, eine Optimierung der Zusammensetzung der Ausgangslösungen zu erzielen, wobei die Konzentration von HCl, von Sucrose als osmotischem Stabilisator und von Amikacinsulfat variiert wurde. Für jede der aufgeführten Gruppen wurden drei Chargen hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt und zeigen, daß die Konzentration der Salzsäure auf eine bislang nicht erklärbare Weise Einfluß auf die Membranstabilität nimmt, daß die Konzentration von Sucrose ebenfalls stabilitätsbestimmend wirkt und daß eine beliebige Steigerung der Konzentration von Amikacin nicht möglich ist, da dies einen destabilisierenden Effekt zu haben scheint. Neben diesen Untersuchungen wurden zusätzlich Experimente mit verschiedenen Lagerungsmedien durchgeführt. Neben NaCl-Lösung wurde eine Lagerung in Phosphatpufferlösung untersucht, die teilweise, jedoch nicht mit Verlässlichkeit, zu besseren Ergebnissen führte.

Gruppe	Sucrose (mMol)	HCl (mMol)	Amikacin (mg/ml)	% Verkapselung			Tag 6			Tag 10		
				Std.- Abweichung	%	Std.- Abweichung	Retention	Std. Abweichung	%	Retention	Std. Abweichung	
A	150	100	50	48,45	4,26	31,00	1,18	-	-	-	-	
B	180	100	50	43,79	0,17	58,97	47,63	20,92	49,59	20,92	49,59	
C	210	100	50	41,93	3,52	62,84	30,70	-	-	-	-	
D	150	150	50	49,12	2,30	85,99	2,31	66,38	8,30	66,38	8,30	
E	180	150	50	37,07	6,80	84,19	3,00	67,47	4,09	67,47	4,09	
F	210	150	50	46,29	6,86	78,66	2,73	63,36	2,79	63,36	2,79	
G	150	50	50	46,48	8,14	26,94	8,77	-	-	-	-	
H	180	50	50	41,42	1,34	29,21	2,81	-	-	-	-	
I	210	50	50	41,49	4,51	50,50	11,57	-	-	-	-	
J	150	100	100	64,97	6,78	31,48	20,46	14,44	5,74	14,44	5,74	
K	180	100	100	63,37	1,97	45,48	28,08	7,03	8,10	7,03	8,10	
L	210	100	100	54,32	6,62	81,93	6,09	31,92	46,49	31,92	46,49	
M	150	100	25	42,34	12,59	40,71	47,94	18,25	9,77	18,25	9,77	
N	180	100	25	47,49	8,36	84,41	7,37	25,34	14,83	25,34	14,83	
O	210	100	25	47,17	10,29	87,58	4,12	41,12	21,62	41,12	21,62	

Tabelle 3: Optimierung der Zusammensetzung der Ausgangslösung von Depot-Amikacin Partikeln

Ausgehend von der theoretischen Überlegung, daß die Diffusion des Antibiotikums aus den Partikeln minimiert werden könnte, wenn das Lagerungsmedium Amikacin in gleicher Konzentration enthält, wurden Versuche mit Amikacin/Sucroselösung als Medium durchgeführt, die eine deutlich bessere Stabilität ergaben als die Lagerung in NaCl oder in PBS.

Auch mit einer Glucose/Lysin - Lösung als Lagerungsmedium ließen sich bessere Ergebnisse als mit NaCl erzielen, jedoch in geringerem Umfang als mit Amikacin (Abbildung 10)

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Stabilität ergab sich bei der Untersuchung, ob Plasma möglicherweise durch die Gegenwart von Proteasen zu vorzeitiger Desintegration der Partikel führen könnte und somit in vivo eine durch in vitro Untersuchungen nicht vorhersehbare Destabilisierung der Partikel erfolgen könnte. Im Gegenteil zeigte sich, daß die Partikel offenbar mit einer schützenden Schicht von Plasmaproteinen überzogen werden, durch die die Stabilität wesentlich verbessert wird. Ähnliche Effekte ließen sich durch Zusatz von Humanalbumin zum Lagerungsmedium erzielen (Abbildung 10).

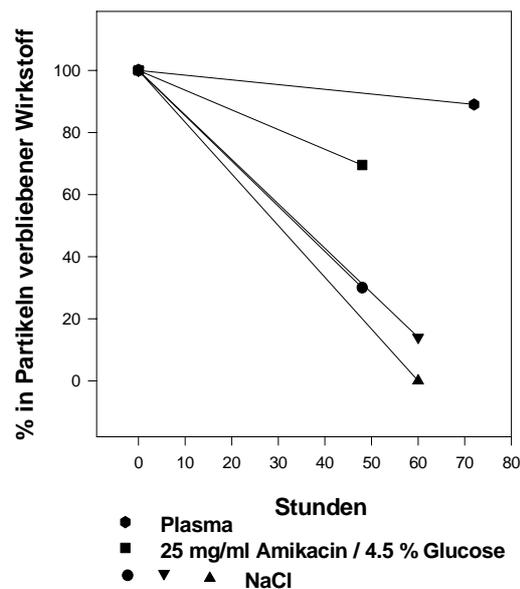


Abbildung 10: Einfluß verschiedener Lagerungsmedien auf die Stabilität von Depot-Amikacin Partikeln (Einfachbestimmungen)

g. Injizierbarkeit

Es muß sichergestellt sein, daß ein Therapeutikum, das als Suspension durch Injektion appliziert wird, durch die Injektion nicht soweit mechanisch alteriert wird, daß seine pharmakologischen Eigenschaften in vivo

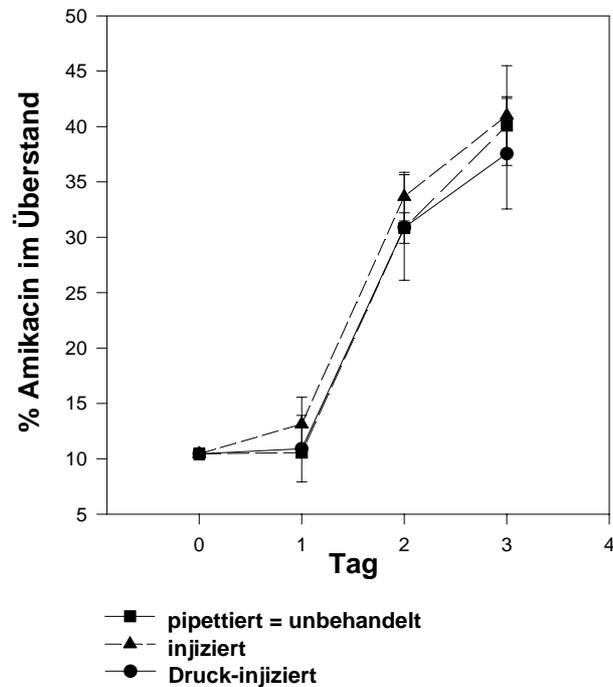


Abbildung 11: Einfluß von mechanischem Streß auf die Stabilität von Depot-Amikacin (Mittel aus drei Experimenten und Standardabweichungen)

modifiziert sind. Zu diesem Zweck wurde untersucht, wie sich die Stabilität einer Präparation verhält, wenn sie durch eine Nadel der Größe 27 (Insulin) gespritzt wird. Dabei wurde in einem Dreifachversuch die Suspension mit moderatem Druck durch die Nadel gespritzt, in drei weiteren Versuchen wurde sie jedoch mit maximalem Druck injiziert. Zum Vergleich dienten 3 Proben, die lediglich durch eine Pipette aufgezogen und wieder abgelassen worden waren.

Es zeigte sich, daß diese Behandlung der Suspension keinen Schaden zufügt. Zumindest im Kurzversuch der Inkubation in NaCl bei 37° C wurde keine schnellere Freisetzung des Amikacin aus den injizierten Partikeln im

Vergleich zu den lediglich pipettierten beobachtet. (Abbildung 11). Da nach Injektion des Präparates ja keine langfristige weitere Stabilität erforderlich ist, wurde aus dieser Beobachtung geschlossen, daß die Art der Applikation keinen Einfluß auf das Freisetzungsverhalten in vivo hat

h. Verträglichkeit mit Lokalanästhetika

Obwohl mögliche Anwendungen am Menschen sicher noch der Definition bedürften, wurde die Problematik antizipiert, daß die Injektion des Präparates schmerzhaft sein könnte und daher vom Patienten nicht toleriert würde. Daher ist es wünschenswert, das Präparat entweder mit Lokalanästhetikum vermischt oder in ein zuvor infiltriertes Gebiet zu injizieren. Da Lokalanästhetika wie alle neurotrophen Substanzen zumindest ein gewisses Maß an Lipophilie aufweisen müssen, war zu befürchten, dass

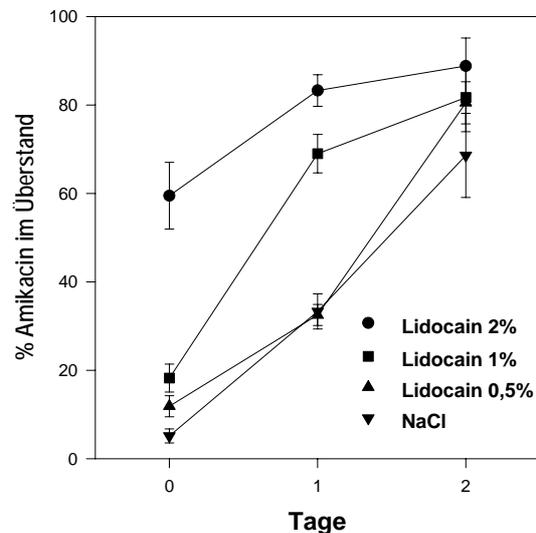


Abbildung 12: Auswirkung des Zusatzes von Lokalanästhetika zur Depot-Amikacin-Suspension (Mittel aus drei Experimenten und Standardabweichungen)

die Partikel unter diesen Umständen zerfallen. Um dieses Problem zu untersuchen, wurden die Partikel in einem Dreifachansatz nach Waschung mit NaCl, 0,5%, 1% und 2%igem Lidocain im Verhältnis 1:1 versetzt und bei

37° C inkubiert. Bei der Überprüfung der Retention von Amikacin in den Partikeln unter diesen Bedingungen zeigte sich, daß die Inkubation in 0,5 %igem und vermutlich auch in 1% Lidocain keine Destabilisierung hervorruft, daß dieses jedoch bei 2%igem Lokalanästhetikum der Fall zu sein scheint (Abbildung 12). Da nach Injektion des Lokalanästhetikums in das Gewebe die lokale Konzentration von Lidokain in jedem Fall weitaus niedriger ist, dürften aber keine Probleme bei einer Injektion in ein mit Lokalanästhetikum infiltriertes Gebiet zu erwarten sein.

2. Tierexperimente

A. Vorversuche mit Gentamicin Partikeln

Bereits vor der Entwicklung der Amikacin enthaltenden Partikel waren innerhalb der Arbeitsgruppe Vorversuche mit Gentamicin-Partikeln durchgeführt worden, wobei zwar die oben beschriebenen Einschränkungen zur Reproduzierbarkeit der Präparationen gemacht werden müssen, jedoch erste Hinweise auf die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik in vivo gewonnen werden konnten (78). Dabei erfolgten Injektionen des Präparates in die Bauchhaut von Mäusen, die nach Zeitintervallen von bis zu 5 Tagen excidiert und homogenisiert wurde und deren Gentamicin-Gehalt dann analysiert wurde. Die gefundene Freisetzungskarakteristik entsprach einer biexponentiellen Kinetik, eingeleitet von einer raschen α -Phase mit einer Halbwertszeit von 0,27 Stunden und gefolgt von einer langsamen β -Phase mit einer Halbwertszeit von 110 Stunden.

In einer anderen Untersuchung wurde 48 Stunden nach lokaler Injektion von 0,5 mg Gentamicin in multivesiculären Liposomen ein bakterielles Inoculum von $1,5 \times 10^8$ Staph. aureus in die gleiche Lokalisation injiziert. Weitere 48 Stunden später wurden die Tiere getötet, das Gewebe exzidiert, homogenisiert und in definierten Proben des Homogenisats nach stufenweiser Verdünnung in 1:10 Schritten auf Trypticase-Soja Nährboden

inkubiert. Hierbei ergab sich zwar auch in Gegenwart von Gentamicin-Partikeln Bakterienwachstum, jedoch war dies gegenüber unbehandelten Kontrollen und Behandlung mit freiem Gentamicin um vier logarithmische Stufen verringert.

In weiteren Untersuchungen zur Wirksamkeit der Präparation (87) wurden diese Erkenntnisse vertieft. In diesem Falle erfolgte zunächst die Injektion von verkapseltem Gentamicin, freiem Gentamicin und Liposomen ohne Wirkstoffinhalt in den Rücken von Mäusen nach dem Abszeß-induktionsmodell von Joiner (88). Zwei, vier, sechs und acht Tage nach der Vorbehandlung wurde dann ein bakterielles Inoculum von 10^8 staph aureus in das vorbehandelte Gewebe injiziert. 48 Stunden später wurden die Tiere getötet und das betreffende Gewebe bakteriologisch aufgearbeitet, wobei sich bei zwei und vier Tagen Vorbehandlungszeit eine Verminderung der Bakteriendichte um vier logarithmische Stufen ergab, während diese bei sechs- und achttägigem Intervall nur eine logarithmische Stufe betrug. In einem anderen Ansatz wurde die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen von verkapseltem Gentamicin untersucht. Dabei zeigte sich beim Vergleich von 0,5, 0,25 und 0,05 mg eine Zunahme der Wirkung mit ansteigender Konzentration. Alle drei Konzentrationen führten jedoch zu einer signifikanten Verminderung der Bakterienzahlen.

B. Tierversuche mit Amikacin-Liposomen

a. Pharmakokinetik

a1. Gewebsspiegel

Die Pharmakokinetik eines Präparates zur lokalen Antibiotikatherapie beeinflusst in entscheidender Weise das Wirkprofil und die Einsatzmöglichkeiten. Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz wurden daher in Tierexperimenten untersucht.

Zu diesem Zweck wurde 4-6 Wochen alten CF1-Mäusen von ca. 20 g Gewicht eine Substanzmenge von 1 mg liposomal verkapselten Amikacinsulfats injiziert. Die Injektion erfolgte nach umfangreichen Vorversuchen im Gegensatz zu den Wirksamkeitsuntersuchungen im Hüftbereich, um sicherzustellen, daß durch Mitnahme der Muskeln bei der Untersuchung der behandelten Gewebe alles durch die Injektion infiltrierte Gewebe erfaßt wurde. Bei Injektion im Nackenbereich wäre es auf Grund der dichten Adhärenz an der Wirbelsäule unmöglich gewesen, die darunter liegenden Muskeln mit zu excidieren. Nach definierten Zeitintervallen wurden die Tiere getötet und das mit dem Antibiotikum behandelte Gewebsareal excidiert, wobei die laterale Bauchwand und der gesamte Hinterlauf einbezogen wurden. Die Aufarbeitung der Gewebe erfolgte zunächst durch manuelle mechanische Zerkleinerung. Als nächster Schritt wurden verschiedene Verfahren angewandt. Nach einer Methode erfolgte eine 10 minütige Homogenisation des Gewebes mit dem TK Homo Mixer Modell M (American Triad, Anaheim, CA, USA) sowie versuchsweise mit einem zweiten Gewebshomogenisierer (Polytron Homogenizer PT 3000, Brinkmann, Westbury, NY, USA), wobei das Gewebe in einer Mischung von 50% NaCl und 50% Isopropanol suspendiert wurde. Der Isopropanolanteil diente zur Lyse der noch verbleibenden Lipidpartikel.

Neben diesem Verfahren wurden verschiedene andere Extraktionsmethoden erprobt, da immer wieder erhebliche Unregelmäßigkeiten in den Untersuchungsergebnissen auftraten. Dabei handelte es sich um eine Lyse des Gewebes durch konzentrierte KOH-Lösung, eine vorgeschaltete Chloroform-Methanol-Extraktion der Lipide (89) und um eine Gewebsverdauung mit Hilfe eines Enzymgemisches (90). In keinem der Fälle ließen sich bessere Ergebnisse erzielen als mit der einfachen Gewebshomogenisierung.

Durch Experimente, bei denen Amikacin-Liposomen in vitro in Gewebe injiziert wurden, konnte gezeigt werden, daß die Wiederfindungsrate vom verwendeten Homogenisierungssystem und vom pH des Homogenisates

abhängt (Abbildung 13), jedoch auch unter in vitro Bedingungen 70 bis 80% nicht übersteigt. Die Begründung zur Einstellung des pHs auf den stark alkalischen Wert von 10 liegt in dem Bemühen, Amikacin, das im Gewebe aus seiner Bindung an Sulfat dissoziieren kann und auf Grund seines hohen pK-Wertes Bindungen an negativ geladene Gewebskomponenten eingehen kann, möglichst vollständig freizusetzen, da andernfalls das Molekül für die Konkurrenz mit der Fluoreszenz-markierten Substanz im Assay nicht zur Verfügung steht.

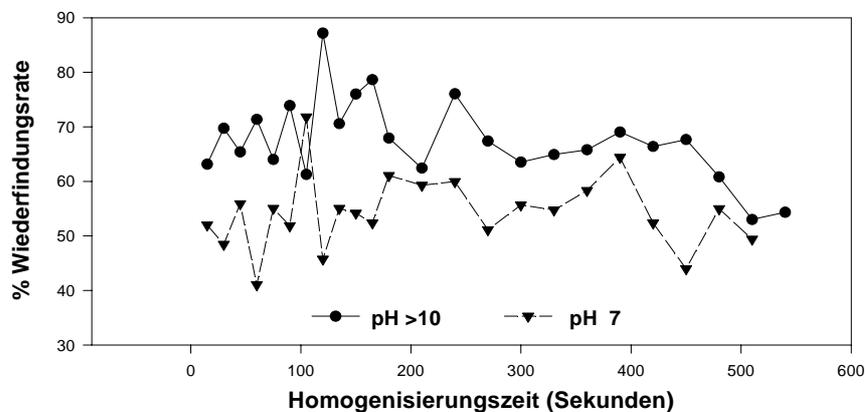


Abbildung 13: Wiederfindungsrate von Amikacin nach in vitro-Injektion in Gewebe

Mit der so optimierten Bestimmungsmethode ließ sich Amikacin am Injektionsort über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen nachweisen. Dabei wurden für jeden einzelnen Zeitpunkt 4 Tiere untersucht. Die Bestimmungen erfolgten anfangs in kurzen Abständen, später in Abständen von 2 Tagen. Es scheint damit eine Freisetzungskinetik 2. Ordnung vorzuliegen, bei der eine initiale Phase einer rascheren Freisetzung gefolgt ist von einer langsamen Phase, was phänomenologisch einem 2 Komponentensystem der Pharmakokinetik entspricht. Daß die anfänglichen Bestimmungen bereits nach wenigen Minuten nur eine Wiederfindungsrate von etwa 70 bis 80 % ergeben, verwundert nicht, da gezeigt wurde, daß auch nach postmortaler

Intervall	% Wiederfindungsrate
10 Minuten	71
30 Minuten	70
120 Minuten	62
480 Minuten	65
1 Tag	42
2 Tage	43
4 Tage	12
6 Tage	8,8
8 Tage	4,2

Tabelle 4: Wiederfindungsrate von Amikacin im Gewebe nach Injektion von Depot-Amikacin (Gruppen von je 4 Tieren)

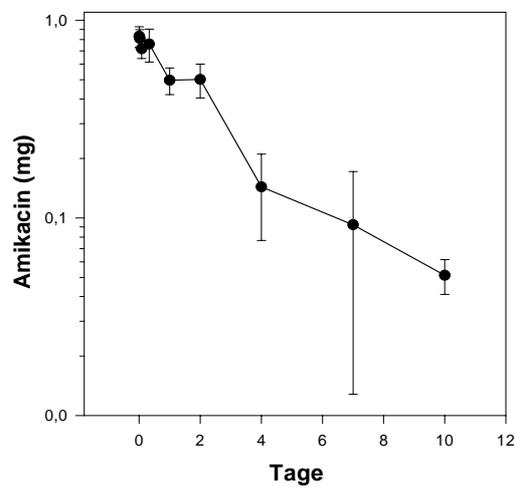


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der lokalen Amikacin-Gewebskonzentration nach Injektion von 1,2 mg Depot-Amikacin (Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Untersuchungen)

Injektion des Präparates unter optimierten Bedingungen keine größeren Anteile der injizierten Menge wiedergefunden werden konnten (Abbildung 14). Dabei ist hervorzuheben, daß sich alle Untersuchungen an liposomal verkapseltem Amikacin auf die Gesamt-Wirkstoffmenge beziehen. Die mutmaßlich vorhandene freie Menge von Amikacin wird zusammen mit der aus den Liposomen durch die Aufbereitung freigesetzten Menge der Wirksubstanz gemessen und kann davon nicht unterschieden werden. Zum Vergleich wurden Untersuchungen nach lokaler Injektion von freiem Amikacin durchgeführt, um auszuschließen, daß zumindest ein Teil des Effekts der verzögerten Wirkstofffreisetzung durch eine Gewebsbindung bedingt ist, die auch auf die Pharmakokinetik der freien Substanz zutrifft.

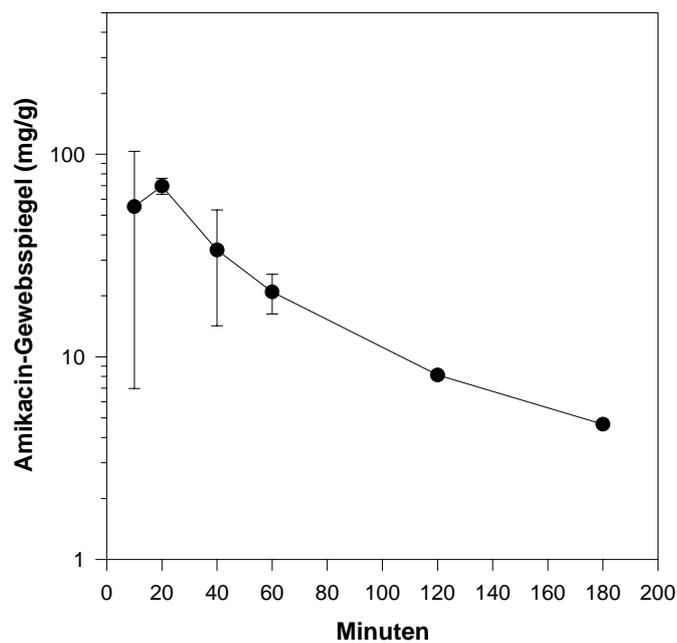


Abbildung 15: Gewebkonzentrationen von freiem Amikacin nach lokaler Injektion von 4 mg Substanz (Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Untersuchungen)

Dabei ergaben sich nach Injektion einer Menge von 4 mg Spitzenspiegel von 70 $\mu\text{g/g}$ Gewebe. Auch diese Kurve entspricht einer Ausscheidungskinetik 2. Ordnung, wobei die Spiegel nach 3 Stunden noch bei ca. 3,5 $\mu\text{g/g}$ Gewebe lagen (Abbildung 15).

a2. Plasmaspiegel

Weitere Informationen über das Verhalten der liposomal verkapselten Form von Amikacin im Vergleich mit der freien Substanz wurden durch die Bestimmungen der Plasmaspiegel gewonnen. Das Blut wurde zum Zweck dieser Untersuchungen durch retroorbitale Entnahme gewonnen. Obwohl pro Versuchstier theoretisch 2 Entnahmen in zeitlichem Abstand voneinander möglich sind, wurden die Tiere aus Tierschutzgründen nach der ersten retroorbitalen Blutentnahme getötet.

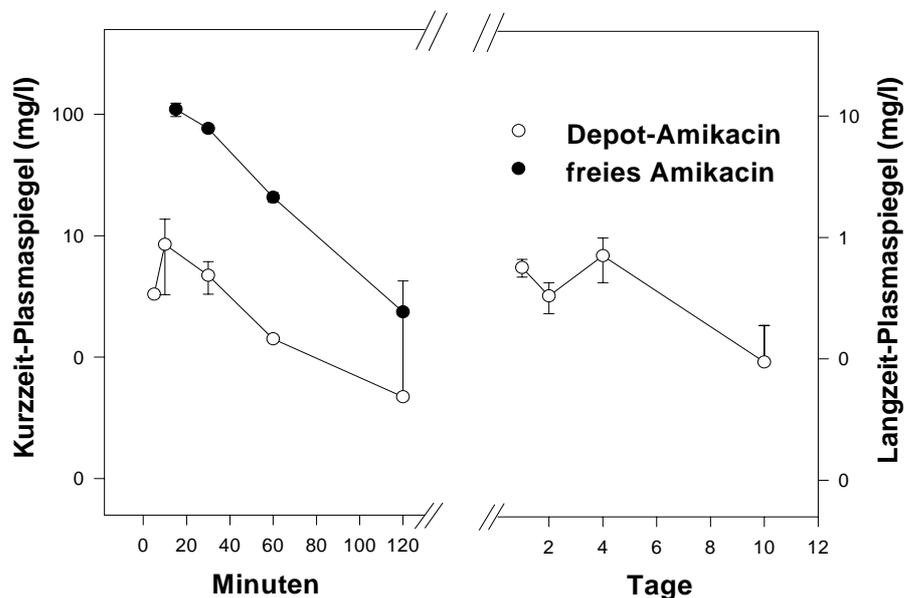


Abbildung 16: Amikacin-Plasmaspiegel nach Gabe von 1 mg freier Substanz und nach Gabe von 1 mg Depot-Amikacin (Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Einzeluntersuchungen). In der Abbildung sind die unterschiedlichen Einheiten der beiden Ordinaten, links für den Kurzzeit- und rechts für den Langzeitverlauf, zu beachten.

Für die Bestimmung der Plasmaspiegel nach Injektion von liposomalem Amikacin wurde der Assay wie beschrieben modifiziert und eine Reihe von Standards auf Plasmabasis verwendet. Abbildung 16 zeigt den raschen Abfall der Plasmaspiegel nach Injektion von freier Substanz, während nach Injektion von liposomaler Substanz die im Blut gemessenen Werte erst am 10. Tag nicht mehr von 0 unterschieden werden können.

Die systemischen Spiegel liegen bei Injektion von verkapselter Substanz nach einem initialen Spitzenwert von ca. 10 mg/l nur zu einem Bestimmungszeitpunkt zwischen 0,5 und 1 µg/ml. Während der gesamten übrigen Untersuchungsphase wurden Spiegel unter 0,5 µg/ml gemessen, womit eine systemische Toxizität auch nach Injektion hoher Dosen ausgeschlossen erscheint.

b. Wirksamkeitsuntersuchungen**b1. Wahl des Infektionsmodells**

Während in den Vorversuchen mit Gentamicin-haltigen Liposomen zunächst ein sehr einfaches Infektionsmodell gewählt worden war, sollte die Hauptversuchsreihe auf einem Modell basieren, das in höherem Maße einem klinischen Problem entspricht. Subcutane Abszesse können mit den konventionellen Mitteln der Chirurgie problemlos behandelt werden und der gewählte Modus der prophylaktischen Injektion der Wirksubstanz vor der Kontamination des Gewebes kann natürlich keinem in der klinischen Realität auftretenden Problem entsprechen. Die Ansprüche, die an ein sinnvolles Tiermodell zu stellen sind, können daher folgendermaßen definiert werden.

1. Simulation einer therapierbaren Kontaminations- / Infektsituation, was bedeutet, daß die Applikation der Substanz auch einem klinisch nachvollziehbarem Modus entsprechen muß und nicht vor der bakteriellen Kontamination erfolgen kann.
2. Infektproblem mit hoher Versagerquote konventioneller antibiotischer / chirurgischer Therapie.
3. Klinisch und ökonomisch relevantes Infektproblem.

In Analogie zu den häufigsten Anwendungen der bereits auf dem Markt befindlichen und anderer erprobter Substanzen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung lag es nahe, ein Fremdkörperinfektionsmodell zu wählen, da diese Infekte problematisch sind, die Behandlung mit hohen Kosten verbunden ist und letztlich in Abhängigkeit von der Art des Fremdkörpers und seiner Lokalisation für den Patienten eine erhebliche Beeinträchtigung bis hin zu Lebensgefahr besteht.

b2. Entwicklung des Versuchsaufbaus

In Anlehnung an die Forderung nach Realitätsnähe wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem zunächst ein Fremdkörper implantiert

wurde, der dann sekundär infiziert wurde. Die Entwicklung des Modells folgte in Grundzügen dem von Christensen beschriebenen Versuchsaufbau (91), wobei im Laufe der Vorversuche einige Modifikationen, die eine höhere Standardisierung erlaubten, eingeführt wurden. Wie schon von Christensen beschrieben, erschien eine simultane Implantation und Kontamination des Fremdkörpers nicht gut in standardisierter Weise durchführbar, da bei der offenen Wunde und möglicherweise den Fremdkörper umgebenden Gewebstaschen die letztlich am Implantat einwirkende Bakteriendosis schwer zu standardisieren war. Selbst eine nach Implantation verschlossene Wunde erwies sich im Gegensatz zur Beschreibung in der Literatur unter diesem Gesichtspunkt als problematisch, da zwischen den Nähten der sehr zarten Nagerhaut immer noch Anteile der Bakteriensuspension verloren gehen konnten. Es wurde daher vorgezogen, zwischen der Fremdkörperimplantation und der Kontamination einige Tage verstreichen zu lassen und somit eine Konsolidierung der lokalen Gewebsverhältnisse zu erzielen, um eine möglichst reproduzierbare Einwirkung der Bakterien auf den Fremdkörper zu gewährleisten.

Als Versuchstiere wurden vier bis sechs Wochen alte CF 1 Mäuse beiderlei Geschlechts (Charles River Labor, Wilmington, II, USA) gewählt. Einerseits war diese Spezies im Labor für andere Untersuchungen bereits eingeführt, andererseits schied angesichts der großen Anzahl von eingesetzten Versuchstieren eine größere Spezies aus. Als problematisch erwies sich jedoch die dünne Haut der Maus und das Fehlen des subcutanen Fettgewebes. Dies machte es besonders schwierig, den Fremdkörper in der lockeren epifaszialen Verschiebeschicht zuverlässig zu plazieren, so daß eine spezielle Implantationstechnik entwickelt wurde. Die Kontamination der Implantate erfolgte durch direkte Injektion der Bakteriensuspension auf den Fremdkörper.

Nach der Injektion der Bakterien erfolgte bis zum Versuchsende eine tägliche Kontrolle der Versuchstiere. Die Tiere wurden zum vorgesehenen Zeitpunkt, der so gewählt wurde, daß keine Restaktivität der Substanz mehr zu

erwarten war, durch Halswirbeldislokation unter Halothan-Narkose getötet. Danach wurde der Rücken sorgfältig mit Isopropylalkohol desinfiziert und dann unter sterilen Bedingungen zunächst der Fremdkörper geborgen und danach das ihn umgebende Gewebe excidiert.

b3. Fremdkörperimplantationstechnik

Während bei den Versuchen, die der Entwicklung des Tiermodells dienen, der Fremdkörper durch eine offene operative Technik eingebracht wurde, gelang im Laufe der Zeit aus Erfahrungen mit den Problemen, die mit dieser Technik verbunden waren, eine Verfeinerung der chirurgischen Vorgehensweise bis hin zu einem praktisch minimal invasiven Vorgehen. Der Fremdkörper wurde dabei durch eine atraumatische, halboffene Technik mit Hilfe eines Troikars plaziert. Zu diesem Zweck wurde das Implantat, ein etwa 1 cm langes Teilstück eines Teflon-Schlauches auf die Spitze einer langen Kanüle gesteckt, während der Rest der Nadel eine lange Hülle aus dem gleichen Material trug. Der Nadelschliff wurde durch diese Anordnung verdeckt (Abbildung17).



Abbildung17: Troicar Applicator System zur Fremdkörperimplantation

Nach sorgfältiger Desinfektion wurde den Mäusen unter Halothan-Narkose nahe der Schwanzwurzel auf dem Rücken eine 2mm lange quere Incision gesetzt, durch die der Troikar eingeführt und über den Rücken stumpf bis in den Nacken vorgeführt wurde. Während nun die Troikarhülle festgehalten wurde, konnte das Implantat durch Zurückziehen der Nadel von der Spitze

abgestoßen werden und verlässlich im Nacken plaziert werden. Danach wurde die Nadel mit der Hülse entfernt.

Trotz dieser atraumatischen und reproduzierbaren Implantationstechnik kam es mitunter noch zu dem Problem, daß nach Injektion der Bakteriensuspension ein Rückfluß durch den Implantationskanal zur Schwanzwurzel auftrat, der dadurch verhindert werden mußte, daß unmittelbar hinter dem Fremdkörper der Kanal durch eine tief durchgreifende Naht verschlossen wurde. Um Artefakte auszuschließen, die durch die Dochtwirkung eines geflochtenen Fadens hätten hervorgerufen werden können, wurde zu diesem Zweck monofiles Nahtmaterial gewählt.

b4. Bakteriologie

Staphylococcus aureus ist der am häufigsten für Fremdkörperinfektionen verantwortliche Keim. Wenngleich die Aminoglycoside nicht zu den Therapeutika der ersten Wahl bei Staphylokokkeninfekten zählen, ist somit doch die Wirksamkeit gegen diesen Keim auf Grund seiner herausragenden Bedeutung bei Fremdkörperinfekten nachzuweisen.

Der Stamm 25932 der American Tissue Type Culture Collection (ATCC) wurde von der mikrobiologischen Abteilung der University of California, San Diego, zur Verfügung gestellt. Die MHK dieses Keims für Amikacin liegt bei 1 µg/ml.

Die Bakterien wurden nach Resuspension in frischem Medium über Nacht bebrütet und dann durch Vergleich der Trübung mit den Mc Farland Standards entsprechend einer Konzentration von 10^7 - 10^8 verdünnt. Zum exakten Nachweis der im Versuch eingesetzten Bakterienzahl wurden nach Kontamination der Fremdkörper logarithmische Verdünnungen der verwendeten Bakteriensuspension angefertigt und auf Trypticase Soja Nährböden ausgebracht. Nach 48 Stunden wurden die entstandenen Kolonien gezählt und daraus die tatsächlich im Versuch eingesetzte Keimzahl bestimmt. Insgesamt wurden die Platten ebenso wie die

Nährmedien, in denen die Fremdkörper inkubiert wurden, sieben Tage bebrütet. Nach zwei Tagen ergaben sich jedoch in keinem Fall mehr Veränderungen. Bis auf wenige, bei den Ergebnissen jeweils kenntlich gemachte Ausnahmen lag dabei die Konzentration der verwendeten Bakteriensuspension bei $1-5 \times 10^7$.

Die Versuche wurden nach jeweils sieben bis zehn Tagen beendet. Nach Tötung der Tiere wurden die Implantate unter sterilen Bedingungen geborgen und das umgebende Gewebe exzidiert. Die Fremdkörper wurden daraufhin für die Dauer von sieben Tagen in Trypticase Soja Nährmedium inkubiert. In einigen Fällen wurde eine Rückkontrolle durchgeführt, um auszuschließen, daß freies oder noch liposomal verkapseltes Amikacin dem Fremdkörper anhaftete oder mit Spuren von Flüssigkeit in die Nährkultur überführt wurde und somit ein Bakterienwachstum nach Inkubation verhinderte. Zu diesem Zweck wurde nach 48ständiger Bebrütung bei sterilem Ergebnis dem Inkubationsmedium 1 ml Nährmedium zugesetzt, das nach Reihenverdünnungsversuchen ca. zehn Keime pro ml enthielt. In allen diesen Fällen war das Medium nach 48 Stunden getrübt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Fremdkörper bei fehlender Trübung des Mediums tatsächlich steril waren und kein falsch negatives Ergebnis durch anhaftendes Antibiotikum vorlag.

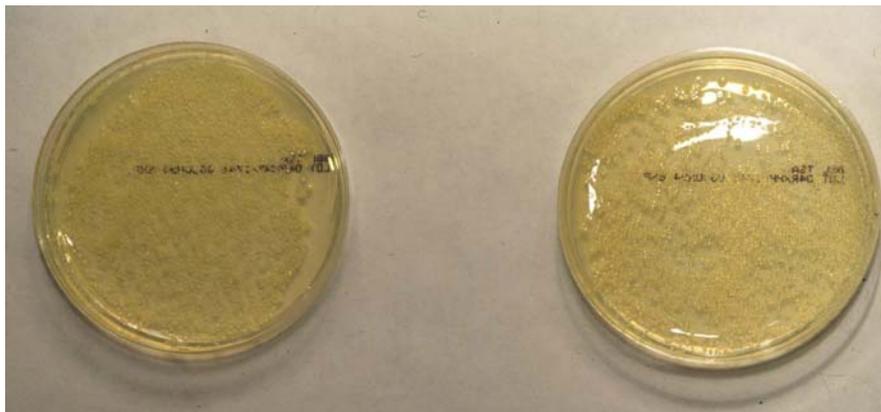
Die unter sterilen Bedingungen gewonnenen Excisate wurden nach mechanischer Homogenisierung in sterile Plastikbeutel gefüllt, und entsprechend dem Gewicht des Homogenisats mit Trypticase Soja Nährmedium versetzt, um gleiche Gewebekonzentrationen im Rahmen einer Verdünnung um eine logarithmische Stufe zu erzielen. Der Inhalt der Beutel wurde dann nochmals im geschlossenen Beutel von Hand homogenisiert und danach in einem speziell für diese Zwecke entwickelten Homogenisator (Stomacher 80, Seward Medical, London, UK) für weitere zehn Minuten bearbeitet.

Der daraus resultierende Gewebsbrei wurde, wie oben beschrieben, nach Anfertigen logarithmischer Verdünnungsstufen auf Nährböden ausgebracht

und für 48 Stunden bebrütet, wonach die Anzahl der Kolonien auf den Agar-Platten gezählt wurde.

Analog zu den Rückinfektionen steril gebliebener Implantate wurden Nährböden, auf denen die verarbeiteten Gewebeproben ausgebracht worden waren und die steril geblieben waren, mit Bakteriensuspension - allerdings höherer Konzentration kontaminiert, um Wachstumshemmung durch residuales Antibiotikum auszuschließen. Hierbei ergab sich kein Unterschied zwischen dem Wachstum auf frischen Nährböden und auf denen, die zuvor mit dem Gewebshomogenisat inkubiert worden waren (Abbildung 18).

Abbildung 18: Unbehandelter Kontrollnährboden (links) und nach



Bei Zählung der Kolonien auf den Nährböden wurden Keimzahlen von mehr als 240 als massenhaft bezeichnet.

b5. Auswertung und Statistik

Aus den auf den Nährböden ermittelten Keimzahlen wurde die Keimkonzentration pro g Gewebe errechnet, indem die ermittelten Anzahlen von Kolonien entsprechend dem Faktor der zuvor vorgenommenen Verdünnung multipliziert wurden und Durchschnitte der Keimzahlen verschiedener Verdünnungsstufen errechnet wurden. Wenn in allen Verdünnungen die Keimkonzentration als massenhaft bezeichnet worden war, wurde dies als eine logarithmische Verdünnungsstufe mehr als die höchste zählbare Keimzahl, somit als 2400 bezeichnet. Dieser Wert wurde von der höchsten Verdünnungsstufe, in der er auftrat, zurückgerechnet auf die Gewebekonzentration. Wenn also nach 10^5 facher Verdünnung massenhaft Kolonien auftraten, so wurde dies als $2,4 \times 10^3 \times 10^5$ und somit als eine Keimkonzentration von $2,4 \times 10^8$ bezeichnet. Aus diesen Werten wurden die jeweiligen Logarithmen berechnet, die dann für die jeweiligen Gruppen mit Hilfe des T-Testes verglichen wurden. Anzahlen infizierter Fremdkörper wurden zwischen Gruppen, die kleiner als 20 waren mit Hilfe des Fisher's Exact -Testes, bei größeren Gruppen als 20 mit Hilfe des korrigierten Chi-Quadrat Testes verglichen. Als Signifikanzniveau wurde 95% angesehen.

b6. Vorversuche zur experimentellen Entwicklung des Tiermodells und zur Dosisfindung

Nachdem in den Vorversuchen mit Gentamicin-haltigen Liposomen deutlich geworden war, daß die Gabe von 0,5 mg der Depotform die Entwicklung subcutaner Entzündungen nicht verhinderte, sondern nur die aus dem Herd anzüchtbare Keimzahl reduzierte, galt es, eine Wirkstoffkonzentration und eine Keimzahl zu finden, bei der im Fremdkörperinfektionsmodell das Implantat letztlich steril blieben.

Zu diesem Zweck wurde zunächst (Versuch Nr. 1) eine hohe Dosis von 4mg lipidverkapselten Amikacinsulfats eingesetzt. Die bakterielle Kontamination

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 4	log 6	
Kontrolle steril kein AB	3502 3501 3500 3499	infiziert steril steril infiziert	100 102 157 200	0 0 0 14	1000000 1020000 1570000 1700000
Kontrolle kontaminiert	3495 3497 3496 3498	infiziert infiziert infiziert wegen ulcerierter Abszedierung getötet	msh msh msh	msh msh msh	2400000000 2400000000 2400000000
Amikacin 0.4 mg 3e7 Staph aureus	3481 3503 3486 3482	infiziert infiziert steril infiziert	msh msh msh msh	220 8 msh 64	230000000 16000000 2400000000 152000000
Depot-Amik 4mg 3e7 Staph aureus	3489 3487 3488 3490	steril steril steril steril	0 74 msh 2	0 2 50 3	0 1370000 3700000 1510000
Amikacin 0.4 mg 3e8 Staph aureus	3486 3484 3483 3485	infiziert infiziert infiziert infiziert	msh msh msh msh	msh msh msh 134	2400000000 2400000000 2400000000 79000000
Depot-Amik 4mg 3e8 Staph aureus	3494 3491 3493 3492	infiziert infiziert infiziert infiziert	msh msh msh msh	msh msh 5 7	2400000000 2400000000 14500000 15500000

msh = massenhaft

Tabelle 5: Versuch 1

erfolgte nach Reihenverdünnung mit Konzentrationen von 10^7 und 10^8 Keimen. In der Annahme, daß die Toxizität von freiem Amikacin auf Grund der höheren Serumspiegel größer ist als die der lipidverkapselten Form, wurden als Vergleichsgruppe nur 0,4 mg Amikacin als freie Substanz systemisch angewendet. In einer Kontrollgruppe wurden keinerlei Intervention durchgeführt, sondern lediglich unbehandeltes Gewebe aufgearbeitet, in einer zweiten Kontrollgruppe erfolgte eine Kontamination mit 10^8 Keimen, aber keine Behandlung. Die Tiere wurden sieben Tage nach Behandlung der Fremdkörper getötet (Ergebnisdetails siehe Tabelle 5).

Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß ein Inoculum von 10^7 offenbar von der hohen Konzentration von 4 mg liposomalen Amikacins abgetötet werden kann, während die Therapie bei einer Inoculumkonzentration von 10^8 Keimen zu versagen scheint. In der infizierten Kontrollgruppe wurde ein Tier vor Beendigung des Versuches getötet, weil eine massive Ulceration im Bereich eines Abszesses an der Injektionsstelle aufgetreten war. Bedenken rief bei diesem Versuch die Tatsache hervor, daß die Gewebe von zwei Tieren der völlig unbehandelten Kontrollgruppe kontaminiert waren, was nur auf Sterilitätsfehler bei der Gewebsentnahme und Aufarbeitung zurückführbar sein kann.

Um eine Unterbewertung der Wirksamkeit der freien Form des Amikacin zu vermeiden, wurden im zweiten Versuch 4 mg der Depotform mit 4 mg freiem Amikacin verglichen (Versuch 2). Dabei waren nach Gabe des Depotpräparates alle neun Fremdkörper steril, nach Gabe von freier Substanz waren drei von acht Fremdkörpern steril, womit ein signifikanter Unterschied gegeben war.

In einem weiteren Versuch zur Dosisfindung der Wirksubstanz wurden nach Kontamination der Fremdkörper jeweils neun Tiere mit Konzentrationen von 8 mg, 4 mg und 2 mg und acht Tiere mit 1 mg des lipidverkapselten Wirkstoffs behandelt (Versuch 3). Dabei waren in allen Gruppen die Mehrzahl der geborgenen Fremdkörper steril. Auch in diesem Versuchsaufbau traten noch Ungenauigkeiten auf; denn nach Aufarbeitung der Gewebe zeigten sich auch bei sterilen Fremdkörpern mäßige, in der Gruppe mit 2 mg Behandlungsdosis auch hohe Keimzahlen bei der Aufarbeitung der Gewebshomogenisate. Dies wurde weiterhin als mangelhafte Technik bei der komplexen Aufarbeitung der Gewebe angesehen. Ansonsten schien der Versuch durchaus eine mit geringerer Dosis nachlassende Wirksamkeit des Depot-Amikacin zu zeigen.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 4	log 6	
Kontrolle	3588	infiziert	0		0
steril	3589	steril	16		160000
kein AB	3590	steril	0		0
Kontrolle	3591	infiziert	trotz makroskopisch erkennbarer Abszesse kein Bakterienwachstum		
kontaminiert	3592	infiziert			
2,5 e 7	3503	infiziert			
Staph.aur.	3595	infiziert			
freies	3598	infiziert			0
Amikacin	3599	steril			0
4mg	3600	steril			0
2,5 e 7	3601	infiziert	58		580000
Staph.aur.	3602	infiziert			0
	3603	steril			0
	3604	infiziert	220		2200000
	3605	infiziert	84		840000
Depot-	3607	steril			0
Amikacin	3609	steril			0
4mg	3610	steril			0
2,5 e 7	3611	steril			0
Staph.aur.	3612	steril	2		2000
	3613	steril			0
	3614	steril			0
	3615	steril			0

Tabelle 6: Versuch 2

Für die weiteren Untersuchungen wurde auf Grund der bisher gemachten Erfahrungen die Dosierung von 1 mg als die Standarddosis festgelegt. Außerdem wurde aus dieser Untersuchung, bei der die Tiere bereits nach sieben Tagen getötet wurden, die Schlußfolgerung gezogen, daß bei den hohen Konzentrationen von lipidverkapseltem Amikacin möglicherweise noch Reste des Antibiotikums im Gewebe vorhanden waren, so daß das Wachstum der Bakterien auf den Nährböden dadurch behindert wurde, während dies bei der niedrigen Konzentration von 1mg nicht mehr der Fall gewesen zu sein schien. Als Konsequenz aus dieser Beobachtung wurde für

alle weiteren Untersuchungen ein Intervall von zehn Tagen zwischen der Antibiotikagabe und der Tötung der Versuchstiere gewählt.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
Depot-Amik 8mg 10 e7 Staph.aur.	3626	s	3	0	3000
	3627	inf	2	0	2000
	3628	s	1	0	0
	3629	s	1	0	0
	3632	s	1	0	0
	3633	s	1	0	0
	3634	s	26	3	28000
	3635	s	1	0	0
	3636	s	1	0	0
4 mg	3637	s	0	0	0
	3638	s	15	2	37500
	3639	s	3	0	3000
	3640	s	2	0	2000
	3641	s	57	1	35500
	3642	s	10	1	10000
	3643	inf	2	0	2000
	3644	s	1	0	1000
	3645	s	8	0	8000
2mg	3646	s	31	4	35500
	3649	inf	9	0	9000
	3650	inf	34	1	22000
	3651	s	msh	32	320000
	3652	s	msh	6	1230000
	3653	inf	msh	23	1315000
	3654	s	msh	4	1220000
	3655	s	msh	4	1220000
	3660	s	2	0	2000
1mg	3656	inf	230	3	265000
	3657	s	101	0	101000
	3658	s	86	2	53000
	3661	inf	8	0	8000
	3662	s	33	0	33000
	3663	s	12	0	12000
	3664	s	8	0	8000
	3665	inf	92	6	76000

Tabelle 7: Versuch 3

Im nächsten Versuch wurde als Konsequenz aus den bisherigen Ergebnissen ein Vergleich zwischen der Wirksamkeit von 1 mg der

Depotform und 1mg freien Amikacins durchgeführt (Versuch 4). Die Inoculumkonzentration erwies sich bei der nachträglichen Auszählung der Kolonien mit $1,5 \times 10^6$ als etwas niedriger als geplant. Nicht infizierte Fremdkörper der Kontrolltiere blieben steril, kontaminierte infizierten mit einer Ausnahme das Bebrütungsmedium. Alle sieben mit Depot-Amikacin behandelten Implantate waren steril, während sechs von acht mit freier Substanz behandelten Implantaten infiziert waren.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebesverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
sterile Kontrolle	3701	s	12	5	31000
	3702	s	14	1	12000
	3703	s	19	5	34500
	3704	s	3	3	16500
	3705	s	12	2	16000
	3706	s	7	0	7000
	3707	s	3	2	11500
infizierte Kontrolle 1,5e 6 Staph. aureus	3723	inf	msh	44	1420000
	3724	inf	1	1	5500
	3725	s	1	1	5500
	3726	inf	88	8	84000
	3727	inf	msh	95	1675000
	3728	inf	95	6	77500
	3729	inf	msh	48	1440000
3730	inf	msh	59	1495000	
1mg freies Amikacin 1,5e 6 Staph aureus	3715	s	8	2	14000
	3716	inf	msh	11	1255000
	3717	inf	msh	msh	24000000
	3718	inf	9	0	9000
	3719	s	11	1	10500
	3720	inf	msh	56	1480000
	3721	unbek	msh	159	1995000
3722	inf	msh	36	1380000	
1mg Depot- Amikacin 1,5e 6 Staph aureus	3607	s	11	1	10500
	3609	s	14	0	14000
	3610	s	11	2	15500
	3611	s	10	0	10000
	3612	s	6	1	8000
	3613	s	95	8	87500
	3614	s	20	3	25000

Tabelle 8: Versuch 4

Nachdem eine weiterer Versuch wegen methodischer Fehler nicht ausgewertet werden konnte, wurde im nächsten Ansatz (Versuch 6) versucht, die Ergebnisse von Versuch 4 zu wiederholen und mit der Wirksamkeit gegen ein Inoculum von 10^7 zu vergleichen. Aus Gründen, die letztlich nicht geklärt werden konnten, war Depot-Amikacin in dieser Untersuchung nahezu wirkungslos.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
1mg freies Amikacin lokal 1,5e 6 Staph aureus	3771	i	8	0	8000
	3772	i	40	10	70000
	3773	s	16	1	13000
	3774	i	120	17	145000
	3775	s	96	17	133000
	3776	s	13	5	31500
	3777	i	148	16	154000
	3778	s	0	0	0
1mg Depot-Amikacin 1,5e 6 Staph aureus	3779	i	20	6	40000
	3780	s	7	2	13500
	3781	i	19	5	34500
	3782	i	9	2	14500
	3783	i	5	0	5000
	3784	i	0	0	0
	3785	s	1	0	1000
	3786	s	1	0	1000
1mg freies Amikacin lokal 1,5e 6 Staph aureus	3787	i	210	21	210000
	3788	i	250	70	475000
	3789	i	95	0	95000
	3790	i	89	16	124500
	3791	i	msh	180	2100000
	3792	i	140	78	460000
	3793	i	msh	170	2050000
	3794	i	41	17	105500
1mg Depot-Amikacin 1,5e 6 Staph. aureus	3795	i	3	0	3000
	3796	i	21	2	20500
	3797	i	23	1	16500
	3798	s	7	2	13500
	3799	i	13	2	16500
	3800	s	1	1	5500
	3801	i	2	2	11000
	3782	i	2	0	2000

Tabelle 9: Versuch 6

Wie in späteren Versuchen sichtbar wurde, kann fehlende Wirksamkeit im Tierversuch darauf zurückgehen, daß die Charge des lipidverkapselten

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 2	log 2	
sterile Kontrolle	3891	inf	msh	msh	1320000
	3892	inf	80	20	14000
	3893	inf	195	22	20750
	3894	s	117	15	13350
Kontrolle 2e6 Staph aureus	3871	inf	msh	82	161000
	3897	inf	msh	75	157500
	3898	inf	msh	msh	1320000
	3899	inf	128	11	11900
freies Amikacin 1mg lokal 2e6 Staph aureus	3845	inf	msh	38	139000
	3846	inf	msh	msh	1320000
	3847	inf	41	12	8050
	3848	inf	msh	msh	2400000
	3849	inf	msh	msh	2400000
	3850	inf	msh	msh	2400000
	3851	inf	msh	151	195500
	3853	s	3	1	650
Depot-Amikacin 1mg lokal 2e6 Staph aureus	3862	inf	msh	msh	2400000
	3863	inf	msh	msh	2400000
	3864	inf	60	4	5000
	3865	s	201	34	27050
	3866	s	24	5	3700
	3967	inf	0	0	0
	3868	inf	msh	240	240000
	3869	s	4	1	700
freies Amikacin 1mg lokal 2e7 Staph aureus	3837	inf		msh	2400000
	3838	inf		msh	2400000
	3839	inf		msh	2400000
	3840	inf		msh	2400000
	3841	inf		msh	2400000
	3842	inf		msh	2400000
	3844	s		10	10000
3870	inf		msh	2400000	
Depot-Amikacin 1mg lokal 2e7 Staph aureus	3854	inf		7	7000
	3855	s		2	2000
	3856	inf		10	10000
	3857	s		3	3000
	3858	s		18	18000
	3859	s		10	10000
	3860	s		2	2000
3861	inf		24	24000	

Tabelle 10: Versuch 8

Amikacin instabil ist und das Antibiotikum zu schnell freisetzt. Auch in Versuch 6 wurde diese Möglichkeit diskutiert und als Konsequenz daraus ein Versuch durchgeführt, in dem eine Charge, die sich in vitro als instabil erwies, mit einer normalen Charge verglichen. Das Ergebnis ist jedoch nicht sehr aussagekräftig, da die Inoculumkonzentration nur 10^5 betrug. In diesem Fall waren nur drei der insgesamt 27 Implantate infiziert.

Versuch 8 diente erneut dem Vergleich von freiem und verkapseltem Amikacin in der Standarddosierung von 1 mg und bei Inoculumkonzentrationen von 10^6 und 10^7 . Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ergebnissen ergab sich hier wieder eine bessere Wirksamkeit. Die paradoxe Tatsache, daß die Wirksamkeit bei niedriger Keimzahl schlechter war als bei hoher Keimzahl, veranlaßte letztlich, Ungenauigkeiten der Kontaminations- und Behandlungstechnik, die mutmaßlich durch Leckagen an der Implantationsstelle entstanden, durch Einführung des als Standardtechnik beschriebenen Troikarsystems auszuschließen. Zusätzlich wurden die getöteten Tiere durch Tauchen in das Desinfektionsmittel, das danach zunächst verdunstete, vor der Entnahme der Fremdkörper und der Excision der Gewebe verlässlicher desinfiziert.

c. Standardisierte Tierversuche

Nach der in den Vorversuchen dargestellten experimentellen Entwicklung des Versuchsaufbaus erfolgten alle weiteren Untersuchungen in der zuvor beschriebenen in Tabelle 11 zusammengefaßten standardisierten Form. Zugunsten der Übersichtlichkeit werden die Versuche 14 und 15 mit freiem Amikacin, die in der Abfolge mit denen, in denen die Depotsubstanz verwendet wurde, wechselten, am Ende des Paragraphen dargestellt.

c1. Prophylaktische Anwendung

Nach Definitionen in der Literatur (92) sind Antibiotikagaben, die früher als sechs Stunden nach einer Kontamination einsetzen, als prophylaktische Gaben zu werten, da die Bakterien noch kein Infektmilieu geschaffen haben, das, durch die Auseinandersetzung des Organismus mit dem infektiösen Agens hervorgerufen, die Penetration von Antibiotika erschweren könnte. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Anwendung der Substanz in der Mehrzahl der vorgestellten Experimente als prophylaktisch einzustufen.

Tag	Maßnahme
1	Chemische Depilation des Rückens der Versuchstiere (Nair®)
2	Fremdkörperimplantation
5	Kontamination der Implantate, Therapiebeginn nach verschiedenen Schemata
15	Tötung der Tiere, Entnahme und Inkubation der Implantate, Aufarbeitung und Inkubation des umgebenden Gewebes
17	Ablesen der Ergebnisse
23	nochmalige Kontrolle der bisher steril gebliebenen Nährböden und Medien, in einigen Fällen Kontrollinfektion der Medien
25	Ablesen der Ergebnisse der Kontrollinfektion

Tab 11: Standardisierter Versuchsablauf

Die Standardbedingungen, deren Entwicklung zuvor beschrieben wurde, beinhalten eine Inoculumkonzentration von 10^7 Bakterien, die standardisierte minimal invasive Platzierung des Implantates und ein Intervall von 10 Tagen zwischen der Anwendung des Antibiotikums und der Beendigung des Versuches.

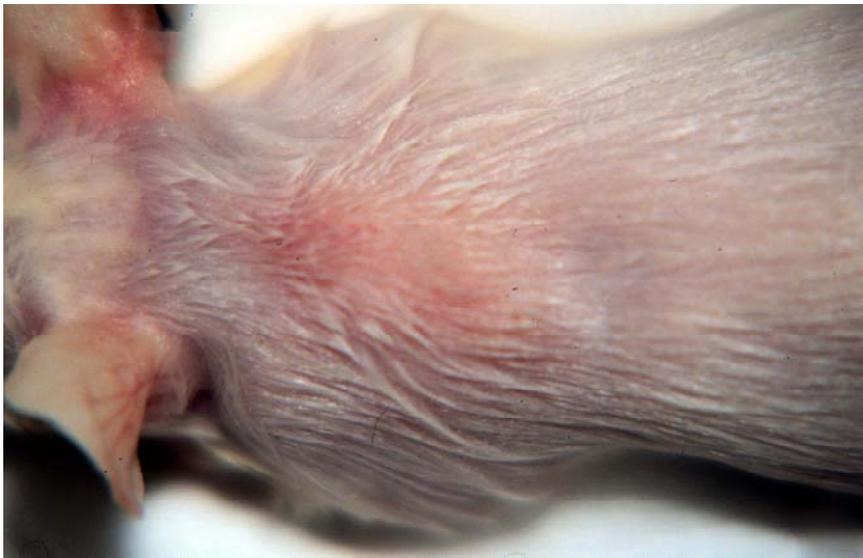
**a****b**

Abbildung 19: Reizlos eingeeiltes (a) und abszedierend infiziertes (b) Implantat, jeweils nach bakterieller Kontamination und Behandlung.

In der ersten Untersuchung dieser Art wurden drei Gruppen gebildet, in denen jeweils sieben Tiere mit verkapselter Substanz und sieben Tiere mit freiem Antibiotikum behandelt wurden. Weitere sieben Tiere wurden als infizierte Kontrollen eingesetzt (Versuch 9). Bei den Ergebnissen herrschte weitestgehende Konsistenz zwischen dem Zustand der Implantate und der bakteriellen Untersuchung der Gewebe. Von sieben Fremdkörpern waren nach Behandlung mit freiem Amikacin einer, nach Behandlung mit lipidverkapselter Substanz vier steril. Das typische Aussehen eines nach Kontamination und Behandlung abszedierend infizierten und eines sterilen Implantates ist in Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 18Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsver- dünnung		Keimzahl- Durchschnitt
			log 3	log 4	
Kontrolle 2.5*10e7 Staph aureus	3881	inf	tntc	512	5120000
	3882	inf	tntc	450	4500000
	3883	inf	tntc	tntc	24000000
	3884	inf	45	1	27500
	3888	inf	tntc	248	2480000
	3889	inf	tntc	tntc	24000000
	3696	inf	tntc	136	1360000
freies Amikacin lokal 2.5*10e7 Staph aureus	3834	inf	0	0	0
	3836	inf	tntc	69	6900000
	3885	inf	tntc	202	2020000
	3886	s	3	0	3000
	3887	inf	520	64	580000
	3893	inf	tntc	109	1090000
	3894	inf	62	7	132000
Depot- Amikacin 2.5*10e7 Staph aureus	3833	s	0	0	0
	3889	s	0	0	0
	3890	s	0	0	0
	3891	inf	9	1	9500
	3895	inf	28	0	28000
	3896	inf	6	0	6000
	3897	s	3	4	3500

Tabelle 12: Versuch 9

In der nächsten Untersuchung (Versuch 11) wurden zwei verschiedene Chargen der liposomalen Substanz miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte mit einer der Formulierungen eine Behandlung erst eine Stunde nach der bakteriellen Kontamination des Fremdkörpers, so daß wiederum

Gruppen	Tier	Impl.	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschn.	Rück-infekt	Resid. Amik. Konz.	p vs Kontr.
			log 4	log 6				
sterile Kontrolle	4411	s	0	0	10000	msh	0,02	
	4412	s	0	0		msh	0,016	
	4413	s	1	0		msh	0,054	
	4414	s	0	0		msh	0,039	
	4415	s	0	0		msh	0,01	
	4416	s	0	0		msh	0,026	
	4417	s	0	0		msh	0,011	
Mittel Residual-Amik.							0,025	
Charge 3F	4419	s	1	0	10000	msh	0,114	0,00236
	4420	s	4	0	40000	msh	0,084	
	4421	s	0	0		msh	0,181	
	4422	s	0	0		msh	0,115	
	4423	s	0	0		msh	0,116	
	4425	s	0	0		msh	0,191	
	4426	i	2	0	20000	msh	0,041	
Mittel Residual-Amik.							0,12	
Charge qe3-83p	4427	s	0	0	24000000	msh	0,353	0,00098
	4428	i	0	0		msh	0,202	
	4429	s	0	0		msh	0,22	
	4430	s	0	0		msh	0,307	
	4432	s	0	0		msh	0,134	
	4433	s	0	0		msh	0,14	
	4472	i	msh	msh		msh	0,387	
Mittel Residual-Amik.							0,249	
Charge qe3-83p 1h Verzögerung	4416	s	0	0	24000000	msh	0,076	0,00870 ²
	4424	s	0	0		msh	0,363	
	4434	s	0	0		msh	0,144	
	4435	s	0	0		msh	0,194	
	4436	i	msh	msh		msh	0,467	
	4437	i	msh	msh		msh	0,372	
	4438	s	1	0		10000	msh	
Mittel Residual-Amik.							0,246	

Tabelle 13: Versuch 11

drei Gruppen von je sieben Tieren bestanden. Die Ergebnisse aller drei Gruppen sind vergleichbar. Von 21 Tieren war der Fremdkörper in fünf Fällen infiziert. In dieser Untersuchung wurde zusätzlich die Gesamtmenge des im Gewebe verbliebenen Wirkstoffs bestimmt. Die dabei ermittelten Werte lagen überwiegend in der Größenordnung von 0,1 bis 0,2 mg, erreichten jedoch vereinzelt auch 0,4 mg. Auch die unbehandelten Proben ergaben nach dem

Assay keinen exakten 0-Wert , so daß von einer Ungenauigkeit des Assays bei der Analyse von Gewebshomogenisaten auszugehen ist. Die bei den Kontrolltieren gemessenen Werte waren jedoch fünffach niedriger als die nach Amikacin-Behandlung gemessenen.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebss- verdünn.		Keimzahl- Durchschn.	resid. Amik. Konz.
			log 3	log 4		
sterile Kontrolle	4462	s	0	0	0	0,0179
	4470	s	0	0	0	0,0145
	4478	s	0	0	0	0,0135
	4486	s	0	0	0	0,0193
Depot- Amikacin Präp. 2-F 1mg lokal 2e6 Staph aureus	4455	i	33	2	26500	0,1567
	4456	s	4	0	4000	0,0925
	4457	s	0	0	0	0,119
	4458	i	1	1	5500	0,0938
	4459	s	0	0	0	0,1236
	4460	i	0	0	0	0,14
4461	i	msh	500	5000000	0,0598	
Depot- Amikacin Präp. 2-4 1mg lokal 2e6 Staph aureus sofortige Injektion	4463	s	0	0	0	0,1801
	4464	s	2	0	2000	0,109
	4465	s	0	0	0	0,1037
	4466	s	msh	2	2400000	0,1875
	4467	s	115	51	332500	0,0192
	4468	s	0	0	0	0,0077
	4469	s	msh	412	4120000	0,1819
Depot- Amikacin Präp. 4-2 1mg lokal 2e6 Staph aureus	4471	i	msh	300	3000000	0,0458
	4472	s	5	0	5000	0,1002
	4473	s	1	0	1000	0,0446
	4474	s	2	0	2000	0,099
	4475	s	0	0	0	0,0972
	4476	i	59	3	44500	0,0852
4477	i	0	0	0	0,1191	
Depot- Amikacin Präp. 4-2 0,5mg lokal 2e6 Staph aureus	4479	s	0	0	0	0,0069
	4480	s	70	13	100000	-0,0166
	4481	i	1572	103	1301000	0,0663
	4482	s	9	0	9000	0,1773
	4483	i	msh	msh	24000000	0,0794
	4484	i	msh	516	5160000	0,0437
4485	s	3	0	3000	0,1543	

Tabelle 14: Versuch 12

Auffallend war, daß drei der fünf Tiere, deren Fremdkörper infiziert war, hohe residuale Wirkstoffspiegel aufwiesen, so daß möglicherweise nicht genügend Antibiotikum freigesetzt wurde.

Um eine Rücktestung vorzunehmen, bei der bewiesen werden sollte, daß in den auf Agar-Platten ausgebrachten Verdünnungen keine wachstumshemmende Wirkung mehr vorhanden ist, wurden Agarnährböden, die zuvor steril geblieben waren ebenso wie frische Agar-Nährböden mit einer auf 10^3 verdünnten Bakterien-Stammlösung kontaminiert. In allen Fällen, auch in denen mit hohem Rest-Wirkstoff, ergab sich dabei rasenförmiges Bakterienwachstum auf den Agar-Platten.

Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde im nächsten Experiment (Versuch 12) gewählt. Es wurden drei verschiedene Chargen eingesetzt. Die Rate an infizierten Fremdkörpern lag in der gleichen Größenordnung wie im Vorversuch. Das Gleiche gilt für die Ergebnisse der Bestimmung residualen Amikacins. Es konnte hier in einer zusätzlichen Gruppe gezeigt werden, daß auch eine Dosierung von nur 0,5 mg Gesamtdosis noch wirksam ist. Im Gegensatz zu den Vorversuchen, bei denen Probleme bei der Aufarbeitung der Gewebe aufgetreten waren, konnten jetzt bei Tieren, aus denen das Implantat steril geborgen wurde, nur noch selten vereinzelte Kolonien von Bakterien nach einer Verdünnung des Gewebes um einen Faktor 10^3 nachgewiesen werden.

Während nach den bisherigen Ergebnissen klar zu sein scheint, daß etwa 70% der Fremdkörper steril geborgen werden können, wenn die Injektion des Antibiotikums unmittelbar auf die Inokulation folgt, wurden im folgenden Experiment Intervalle von ein und zwei Stunden zwischen Kontamination und Antibiotikagabe eingeführt (Versuch 13). Leider wurden in der Gruppe, die zwei Stunden nach Kontamination antibiotisch behandelt wurde, zwei Implantate bei der Entnahme kontaminiert, von denen, nach den Keimzahlen im Gewebe zu urteilen, eines infiziert und das zweite steril gewesen sein dürfte. In jedem Falle wäre hier die Anzahl der sterilen Fremdkörper kleiner

gewesen als die der infizierten, während die Verzögerung um nur eine Stunde keine Reduktion der Wirksamkeit nach sich zog.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung			Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	log 5	
Depot-Amikacin Präp. 4-4 1mg sofortige Behandlung	4491	s	0	0		0
	4492	s	0	0		0
	4493	s	0	0		0
	4494	s	0	0		0
	4495	s	0	0		0
	4496	i	0	0		0
	4497	s	0	0		0
	4498	i	0	0		0
	4499	s	0	0		0
4500	s	0	0		0	
Depot-Amikacin Präp. 4-4 1mg 1 h Verzög.	4501	s		0	0	0
	4502	s		tntc	tntc	24000000
	4503	i		tntc	524	5240000
	4504	i		0	0	0
	4505	s		0	0	0
	4506	s		tntc	tntc	24000000
	4507	i		tntc	485	4850000
	4508	s		0	0	0
	4509	s		0	0	0
	4510	*		81	12	1005000
Depot-Amikacin Präp. 4-4 1mg 2 h Verzög.	4511	s		0	0	0
	4512	s		tntc	tntc	24000000
	4513	*		0	0	0
	4514	i		0	0	0
	4515	i		1360	145	1405000
	4516	i		tntc	tntc	24000000
	4517	s		tntc	tntc	24000000
	4518	i		173	28	2265000
	4519	*		8	0	8000
4520	*		tntc	tntc	24000000	

* = Fremdkörper bei Entnahme kontaminiert

Tabelle 15: Versuch 13

Eine weitere Untersuchung (Versuch 16) betraf die Fragestellung, ob von der Amikacinkonzentration im Überstand der Liposomenpräparation ein Einfluß auf die Wirksamkeit ausgeht. Drei Gruppen von je zehn Tieren wurden mit jeweils 1mg Amikacin behandelt, wobei in der ersten Gruppe 0%, in der zweiten Gruppe 25 % und in der dritten Gruppe 50% der Wirksubstanz in

freier, die übrige Menge in liposomaler Form vorlagen. Wiederum ergaben die Ergebnisse nur geringe Differenzen zwischen den Gruppen. Insgesamt blieben 25 von 30 Fremdkörpern steril.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
Depot-Amikacin 1 mg Präp. 5-4 0 % im Überstand	4752	s	0	0	0
	4752	s	0	0	0
	4753	inf	0	0	0
	4754	s	0	0	0
	4755	inf	10	2	1500
	4756	s	0	0	0
	4857	s	0	0	0
	4759	s	0	0	0
4760	s	0	0	0	
4784	inf	tntc	tntc	24000000	
Depot-Amikacin 1 mg Präp. 5-4 25% im Überstand	4761	s	0	0	
	4762	s	4	0	
	4763	s	27	4	63500
	4764	s	0	0	
	4765	s	2	0	2000
	4766	s	2	0	
	4767	s	0	0	
	4768	s	1	0	1000
4769	s	0	0		
4770	s	0	0		
Depot-Amikacin 1 mg Präp. 5-4 50% im Überstand	4771	s	0	0	
	4772	s	0	0	
	4773	s	0	0	
	4774	s	tntc	308	3080000
	4775	s	0	0	
	4776	i	0	0	
	4777	i	0	0	
	4778	s	0	0	
4781	s	0	0		
4785	s	0	0		

Tabelle 16: Versuch 16

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
Depot-Amikacin 1mg Präp. 6-3 1,5 * 10e7 Staph aureus	4882	s	0	0	0
	4883	s	0	0	0
	4885	s	0	0	0
	4886	s	2	0	2000
	4887	s	0	0	0
	4888	s	22	4	31000
	4889	inf	25	0	25000
	4890	s	0	0	0
	4891	s	0	0	0
	4892	inf	0	0	0
	4893	s	0	0	0
	4894	s	0	0	0
	4895*	s	0	0	0
4896	s	0	0	0	
Depot-Amikacin 1mg Präp 6-3 1,5 * 10e7 Staph aureus	4888	s	0	0	0
	4889	s	0	0	0
	4900	s	2	1	6000
	4901	s	1	0	1000
	4903	inf	msh	420	4200000
	4904	s	0	0	0
	4905	s	0	0	0
	4906	s	10	3	20000
	4907	s	0	0	0
	4909	s	10	2	15000
	4910	s	1	0	10000
4911	s	1	0	10000	
4913	inf	2	1	15000	

* = bei Versuchsende kein Fremdkörper auffindbar

Tabelle 17: Versuch 20

In einer letzten Untersuchung zu diesem Problem (Versuch 20) wurden nochmals insgesamt 27 Tiere nach dem Standardschema mit liposomenverkapseltem Amikacin aus zwei verschiedenen Präparationen behandelt, wobei vier Fremdkörper infiziert waren und ein Implantat trotz intakter Haut nicht wieder aufgefunden wurde, so daß 22 sterile Fremdkörper resultierten. Beide Chargen wiesen die gleiche Wirksamkeit auf.

In den bisherigen dargestellten Experimenten ist, abgesehen von den Vorversuchen, in denen keine exakt standardisierten Bedingungen

geherrscht hatten, die Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Applikationsmodi des freien Amikacins unzureichend untersucht. An dieser Stelle werden daher nachträglich zwei Experimente dargestellt (Versuche 14 und 15), die den Effekt dieser Applikationsform als systemische Therapie näher untersuchten und in die übrige Versuchsreihe eingeschoben waren.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	
freies Amikacin systemisch 0,5 mg 2 x/Tag	4523	inf	msh	20	2000000
	4524	inf	msh	28	2800000
	4525	inf	msh	61	6100000
	4526	inf	1	0	10000
	4527	inf	msh	msh	240000000
	4528	inf	106	6	840000
	4529	inf	msh	msh	240000000
	4530	inf	220	12	1700000
	4531	inf	msh	70	7000000
	4532	inf	msh	140	14000000
<hr/>					
freies Amikacin systemisch 0,5 mg 2 x/Tag	4533	inf	msh	19	1900000
	4534	inf	0	0	0
	4535	inf	msh	86	8600000
	4536	inf	msh	141	14100000
	4537	inf	28	4	3400000
	4538	inf	msh	48	4800000
	4539	inf	0	3	0
	4540	inf	msh	85	8500000
	4541	inf	msh	126	12600000
	4541	inf	msh	34	3400000

Tabelle 18: Versuch 14

Es wurde nach den Vorversuchen angenommen, daß die einmalige Applikation von freiem Amikacin ohne Wirkung auf die Fremdkörper ist. Daher wurden jetzt zwei Applikationsschemata verglichen, bei denen einmal 0,5 mg 12 stündlich und im anderen Fall 1 mg 24 stündlich jeweils über sieben Tage dorsal in den panniculus carnosus der Versuchstiere injiziert wurden. Die bakterielle Kontamination entsprach den Standardbedingungen. Die erste Injektion des Antibiotikums erfolgte entsprechend den klinischen Gepflogenheiten prophylaktischer Antibiotikabehandlung kurz vor der Kontamination der Implantate. Aus diesen 20 Versuchstieren konnte kein

Fremdkörper steril geborgen werden. Entsprechendes zeigte auch das Ergebnis der Gewebsuntersuchungen, bei denen reichliches Bakterienwachstum noch bis zur Verdünnungsstufe von 10^5 nachweisbar war. Wurde die Dosis von freiem Amikacin auf 5 mg erhöht (Versuch 15), so ergaben sich Wirksamkeitsraten in der Größenordnung von 50 %. Die Applikationsart (5 mg Einzeldosis lokal, 5 mg einmal täglich für zehn Tage und 2,5 mg zweimal täglich für zehn Tage), schien bei zehn Versuchstieren pro Gruppe keinen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis auszuüben.

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung			Keimzahl-Durchschnitt
			log 3	log 4	log 5	
freies Amikacin 5mg / Tag systemisch Einzeldosis	4719	s	5	0		5000
	4720	inf	19	2		19500
	4721	s	3	0		3000
	4722	inf	msh	msh		2400000
	4723	s	13	2		16500
	4724	inf	4	0		4000
	4725	s	4	0		4000
	4726	inf	msh	145		1450000
	4727	s	1	1		5500
	4728	s	0	0		
freies Amikacin 5mg Einzeldosis lokal	4709	inf	0	1		0
	4710	inf	1	0		1000
	4711	s	0	1		0
	4712	inf	7	0		7000
	4713	s	1	0		1000
	4714	s	msh	39		390000
	4715	s	3	0		3000
	4716	inf	208	13		169000
	4717	s	0	2		0
	4718	s	0	0		0
freies Amikacin 2,5mg 2 x tgl. systemisch	4729	s		0	0	0
	4730	inf		4	0	4000
	4731	inf		msh	msh	24000000
	4732	s		0	0	0
	4733	inf		64	3	470000
	4734	inf		62	11	365000
	4735	s		0	1	0
	4736	inf		msh	213	2130000
	4737	inf		83	6	171500
	4738	s		0	0	0

Tabelle 19: Versuch 15

Gruppen	Tier	Implantat	Gewebsverdünnung		Keimzahl-Durchschnitt
			log 2	log 2	
Depot-Amikacin	4925	s	0	0	0
1mg lokal	4926	s	0	0	0
1,5 * 10e7	4927	s	0	0	0
Staph. aureus	4928	s	0	0	0
2 Stunden	4930	s	0	0	0
Verzögerung	4931	inf	11	2	1550
	4933	inf	8	0	400
	4934	s	0	0	0
	4935	s	0	0	0
	4937	s	0	0	0
Depot-Amikacin	4914	s	0	0	0
1mg lokal	4915	inf	528	30	135000
1,5 * 10e7	4917	inf	msh	89	164500
Staph. aureus	4918	inf	18	2	1900
4 Stunden	4919	s	0	0	0
Verzögerung	4920	s	0	0	0
	4921	s	0	0	0
	4922	s	9	77	38950
	4923	s	13	0	650
	4932	inf	160	14	15000
freies Amikacin	a	inf	msh	135	187500
5mg lokal	b	inf	msh	2400	1320000
1,5 x 10e7	c	inf	msh	2400	1320000
Staph. aureus	d	inf	msh	2400	1320000
2 Stunden	e	s	2	3	1600
Verzögerung	f	s	0	0	0
	g	inf	1	0	50
	h	inf	msh	2400	1320000
	i	inf	msh	186	213000
	j	inf	msh	83	161500
freies Amikacin	a	inf	msh	118	179000
5mg lokal	b	inf	msh	112	176000
1,5 x 10e7	c	inf	msh	msh	1320000
Staph. aureus	d	inf	msh	132	186000
4 Stunden	e	inf	msh	msh	1320000
Verzögerung	f	inf	13	197	99150
	g	s	msh	0	120000
	h	inf	43	24	14150
	i	inf	msh	46	143000
	j	inf	msh	msh	1320000
	k	inf	msh	60	150000

Tabelle 20: Versuch 21

Zusätzlich zu den bislang vorgenommenen Kontrollen erfolgte eine Untersuchung, in der zehn Tiere mit einer Präparation von Liposomen behandelt wurden, die statt Amikacin ausschließlich den osmotischen Stabilisator Sucrose enthielt. Nach dieser Behandlung waren alle zehn eingesetzten Implantate infiziert.

Nachdem die Wirksamkeit liposomal verkapselten Amikacins als Prophylaktikum unter den entwickelten Standardbedingungen auch im Vergleich mit der maximalen Dosis von freier Substanz ausreichend gesichert erschien, wurde detaillierter untersucht, welchen Einfluß eine Verzögerung der Behandlung gegenüber der bakteriellen Kontamination ausübte (Versuch 19). Dazu wurde noch einmal das Intervall von zwei Stunden nach Kontamination untersucht, zusätzlich erhielten zwei Gruppen von Tieren das Antibiotikum erst vier Stunden nach Gabe der Bakteriensuspension. Die Behandlung erfolgte in vier Gruppen. Jeweils zwei Gruppen wurden mit 1 mg der Depotsubstanz und mit 5 mg freien Amikacins behandelt. Jede Gruppe umfaßte acht Tiere, wobei bei Behandlung mit Depotsubstanz nach dem zweistündigem Intervall zwei Fremdkörper und nach dem vierstündigen Intervall vier Implantate infiziert waren. Die Behandlung mit freiem Amikacin resultierte im Gegensatz dazu in einem und zwei sterilen Implantaten, während alle anderen 17 Fremdkörper infiziert waren. Entsprechend fanden sich signifikante Unterschiede der Gewebskeimzahlen.

Betrachtet man zusammengefaßte Versuchsergebnisse, so wurden insgesamt 107 Versuchstiere unter Standardbedingungen mit 1 mg Depot-Amikacin behandelt. von denen bei einigen eine Verzögerung des Behandlungsbeginns um eine Stunde bei anderen um zwei Stunden vorlag. In der ganzen Gruppe traten 24 Therapieversager auf, deren Implantate nach Entnahme nicht steril waren. Im Gegensatz dazu war bei einer Behandlung mit freiem Amikacin in der gleichen Dosierung, allerdings täglich über sieben Tage verabfolgt, nicht ein Implantat steril. Beim Vergleich der Anzahl steriler Implantate nach Behandlung mit 1 mg der Depotsubstanz und

1mg freier Substanz liegt der p-Wert des Chi Quadrat Testes weit unter 0,005. Bei Erhöhung der Dosis von freiem Amikacin auf bis zu 7x5 mg wird das Signifikanzniveau jedoch nicht mehr erreicht, sondern der p-Wert des Chi Quadrat Testes liegt bei 0,13.

Wegen der großen Varianz zwischen den infizierten (2400000 Keime) und den sterilen Gewebskulturen ergibt der T-Test bei Vergleich der reinen Keimzahlen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit 1 mg Depotsubstanz und 1 mg freier Substanz. Betrachtet man dagegen die 10er Logarithmen der Keimzahlen, so liegen die Werte für die Behandlung mit 1 mg der Depotsubstanz signifikant niedriger als bei der einmaligen oder wiederholten Behandlung mit freiem Amikacin ($p=10^{-9}$). Bei einer Erhöhung der Dosis des freien Amikacin auf einmalige oder mehrfache Gabe von 5 mg freier Substanz wurde ein gewisser Erfolg beobachtet. Dennoch ist die Wirksamkeit von 1 mg der Depotsubstanz signifikant besser ($p = 0,0054$).

	Mittelwert Keimzahl	Mittelwert \log_{10} Keimzahl	p	p
5mg frei	1092863	3,389	0,0054	10^{-9}
1mg Depot	1292921	1,7		
1mg frei	18759000	6,192		

Tabelle 21: Vergleich der Keimzahlen zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen

c2. Therapeutische Anwendung

Nachdem festgestellt worden war, daß die lokale Gabe von 1 mg des Depotpräparates der Applikation von 5 mg freier Substanz sowohl lokal als auch in verschiedenen Schemata systemisch verabfolgt, überlegen war, sollte geprüft werden, ob eine Wirksamkeit auch über die als zeitliche Grenze der prophylaktischen Gabe angesehene Grenze von sechs Stunden hinaus

besteht. Bei diesen Untersuchungen wurden lediglich Behandlungen mit dem Depotpräparat durchgeführt. Da die Versuchsbedingungen ein schwerwiegenderes Infektproblem als in den zuvor beschriebenen Experimenten darstellten, wurde eine Einmaldosierung von 5 mg gewählt. Der Versuch wurde im Gegensatz zu den vorbeschriebenen Ergebnissen erst 20 Tage nach der Kontamination beendet. Bei diesen Versuchen erfolgte keine Analyse von Gewebshomogenisaten.

In der über Stunden nach Kontamination behandelten Gruppe war eines von acht Implantaten kontaminiert, bei einer Verzögerung von zehn Stunden drei von sieben Implantaten.

	Intervall	
	7h	10h
steril	1	3
infiziert	7	4

Tabelle 22: Versuch 22. Behandlung mit 5 mg Depot-Amikacin 7 und 10 Stunden nach der Kontamination

In einem zweiten Versuch wurde ein Zeitraum von 24 Stunden zwischen der Injektion von Bakterien und der Gabe des Antibiotikums gewählt. In diesem Fall wurden 10 mg des Präparates lokal als Einmaldosis injiziert. Kontrolltiere wurden mit freiem Amikacin behandelt, das in einer Dosierung von 5 mg täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen verabfolgt wurde. Nach zehn Tagen wurden die Tiere getötet und die Implantate geborgen. Von zehn Fremdkörpern, die mit Depotsubstanz behandelt worden waren, waren sechs steril, während nur einer von elf Fremdkörpern, die mit einer Gesamtdosis von 35 mg Amikacin behandelt worden waren, steril blieb. Auch in diesem Experiment wurden keine Gewebskeimzahlbestimmungen durchgeführt, jedoch erfolgte der Versuch der Rückinfektion der steril gebliebenen Inkubationsmedien, was mit einer Keimzahl von zehn in allen Fällen gelang.

	Status		p
	steril	infiziert	
Depot-Amikacin 10mg Einzeldosis	6	4	0,024
freies Amikacin 5mg/Tag über 7 Tage	1	10	

**Tabelle 23: Behandlung mit Depot-Amikacin oder mit freiem Amikacin
24 Stunden nach Kontamination**

d. Weitere Infektionsmodelle

d1. Katheterprotektionsmodell

Nach den positiven Erfahrungen mit der Behandlung und Protektion von implantierten Fremdkörpern durch Depot-Amikacin wurde die Frage untersucht, ob auch Fremdmaterialien, die die Haut durchdringen, wie zum Beispiel zentrale Venenkatheter, Hickman-Katheter, CAPD-Katheter und Schanz'sche Schrauben oder Steinmann-Nägeln bei Verwendung eines Fixateur extern durch das liposomal verkapselte Amikacin vor Infekten geschützt werden können.

Zur Untersuchung dieses Problems wurde ein Tiermodell entwickelt, bei dem ca 2 cm lange Abschnitte von sehr flexiblen Zentralvenenkathetern ähnlich dem zuvor beschriebenen Prinzip vom Nacken her subcutan nach caudal in den Rücken eingeführt und dann an der Hautperforationsstelle mit einer Annahrt gesichert wurden. In die Umgebung der Hautperforationsstelle wurde dann in einem Volumen von 0,25 ml 1 mg des Depotpräparates injiziert, gefolgt von täglicher Behandlung des aus der Haut herausragenden Kathetersegmentes mit einer Bakteriensuspension. Die Versuchsdauer betrug lediglich vier Tage. Am fünften Tag wurden die Tiere wie zuvor

beschrieben, getötet. Kontrolltiere wurden wiederum täglich mit 5 mg freier Substanz systemisch behandelt. Weitere Kontrolltiere blieben unbehandelt und entwickelten in allen Fällen Infekte der subcutanen Katheterspitze.

Eine erste Versuchsserie mit einer Bakterienkonzentration von 10^8 Staphylokokken führte zum Infekt aller implantierten Katheter, auch im Bereich der von der Hautperforation ca. 3 cm entfernten Katheterspitze.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde daraufhin die Bakterienkonzentration auf 10^6 reduziert. Nach Behandlung mit Depot-Amikacin blieben acht von 14 implantierten Kathetern im Bereich der tiefen Katheterspitze steril, während dies bei den mit freier Substanz behandelten Tieren nur bei vier von 13 Implantaten kontaminiert der Fall war. Obwohl dieses Resultat auf eine Wirksamkeit des Präparates auch in diesem Modell hinweist, war der Unterschied der Ergebnisse statistisch nicht signifikant.

	Depot-Amikacin	freies Amikacin	p
Anteil infizierter Katheterspitzen	6/14	9/13	n.s.

Tabelle 24: Resultate des Katheterinfektionsmodells

d2. Haut-Autotransplantationsmodell

In Weiterführung der Untersuchungen, die initial mit Gentamicin-haltigen Liposomen vorgenommen worden waren, wurde ein weiteres Modell einer Weichteilinfektion entwickelt, um das Potential des Präparates zu überprüfen. Dazu wurden Vollschicht-Hauttransplantate der Maus mit Bakterien kontaminiert und danach in das Entnahmebett retransplantiert, Es wurden verschiedene Modi ausprobiert, um die Transplantate vor dem Infekt zu schützen.

Im Einzelnen wurde bei erwachsenen CF1-Mäusen ein 2x2 cm großes Hautareal auf dem Rücken als Vollhauttransplantat entnommen. Dieses

Gewebsstück wurde durch Eintauchen in eine Bakterienlösung von 10^8 Staphylokokken kontaminiert und danach wieder auf dem Rücken in der Entnahmestelle fixiert. Die Behandlung erfolgte nach verschiedenen Schemata in insgesamt vier Gruppen. Fünf Tiere blieben als Kontrolltiere unbehandelt (Gruppe 1). Bei sieben Tieren (Gruppe 2) wurde 1 mg Depot-Amikacin nach der Reimplantation der Haut unter das Implantat injiziert. In Gruppe 3 (sieben Tiere) wurde das Depotpräparat vor der Reimplantation des Autotransplantates subfaszial auf dem Rücken injiziert und bei weiteren sieben Tieren (Gruppe 4) erfolgte eine Vorbehandlung des Grafts vor der Entnahme, wobei gehofft wurde, daß die liposomale Substanz dann zum Teil dem entnommenen Gewebe, zum Teil noch der Unterlage anhaften würde.

Postoperativ wurden die Transplantate mit Okklusivverbänden geschützt, deren Intaktheit täglich kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert wurde. Nach zehn Tagen wurden alle Verbände geöffnet und die Einheilung der Transplantate durch einen Untersucher beurteilt, dem nicht bekannt war, welcher Gruppe das einzelne Tier angehörte. Eine vollständige Einheilung wurde dabei mit 1 bewertet, ein vollständiges Absterben des Transplantates wurde mit 5 bezeichnet. Abszesse kamen nicht vor, weil die lockeren Hautnähte verhinderten, daß sich infizierte Flüssigkeit unter den Transplantaten sammeln konnte.

Ein Tier aus Gruppe 2 starb, so daß nur sechs Tiere zu beurteilen waren, während Gruppen 3 und 4 jeweils sieben Tiere umfaßten.

Während die Qualität der Einheilung bei allen infizierten Kontrolltieren mit 5 beurteilt wurde, was bedeutet, daß alle Transplantate abgestorben waren, fand sich bei den behandelten Tieren ein wechselndes Erfolgsmaß.

Bei Gruppe 3 (Depot-Amikacin unter das Transplantat injiziert.) war - abgesehen von einem einzigen Tier mit vollständiger Einheilung - das gleiche Ergebnis wie bei unbehandelten Tieren festzustellen. In Gruppe 4 und Gruppe 5 waren jeweils bei zwei von sieben Tieren vollständige Transplantatnekrosen aufgetreten. Insgesamt ergab die subfasziale Injektion

die besten Ergebnisse. Das Ergebnis erreichte gegenüber den Kontrollen in dieser Gruppe Signifikanzniveau.

Gruppe	Behandlung	Einheilungsgrad (5=Totalnekrose, 1=komplette Einheilung)
1	unbehandelte Kontrolle (nur Transplantation)	5 ± 0 *
2	Injektion von Depot- Amikacin unter das Transplantat	4,3 ± 1,6
3	subfasciale Injektion von Depot-Amikacin vor Transplantation	2,4 ± 1,3 *
4	Vorbehandlung des Grafts vor Entnahme mit Depot- Amikacin	3 ± 1,7

* p < 0,05 T-Test

Tabelle 25: Protektion von Haut-Autotransplantaten der Maus durch Depot-Amikacin

Diskussion

1. Lokale Behandlung mit Antibiotika

Gentamicin-PMMA Ketten stellen seit Jahrzehnten ein bewährtes Therapeutikum in der Traumatologie und Orthopädie bei Knocheninfekten dar. Die Pharmakokinetik des Präparates ist gut untersucht (19,20); Nebenwirkungen sind außerordentlich gering. Patienten wurden teilweise über mehr als ein Jahrzehnt nach Behandlung mit den Ketten nachuntersucht (9,10,11,14) und wiesen dabei gute Therapieerfolge auf. Überraschend ist jedoch, daß es so lange Zeit nach Einführung des Präparates nicht gelungen ist, eine prospektive, randomisierte und womöglich multizentrische Untersuchung durchzuführen, die das Präparat mit der konventionellen systemischen Antibiotikatherapie vergleicht. Eine verfügbare kleinere vergleichende Untersuchung kommt zu dem Schluß, daß in der Wirksamkeit kein Unterschied zwischen lokaler und systemischer antibiotischer Behandlung besteht (16). Eine große amerikanische Studie an über 700 Patienten mit sogenannten „compound fractures“ hingegen weist einen Vorteil der kombinierten lokalen und systemischen Antibiotikatherapie gegenüber der alleinigen systemischen Therapie bei Grad III Frakturen nach einer amerikanischen Klassifikation auf (14). Diese Untersuchung wurde jedoch retrospektiv durchgeführt, was die Aussagefähigkeit einschränkt, wenn auch bei der entsprechenden Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der nur systemisch behandelten und der systemisch und lokal behandelten Patienten festzustellen war. Diese Situation spiegelt sich in der Tatsache wieder, daß bis heute keine Zulassung des Präparates für den amerikanischen Markt existiert, wobei es allerdings gängige Praxis ist, daß die Ketten, die offenbar im Labor leicht herzustellen sind, von den Traumatologen selbst im kleinen Rahmen produziert werden und den Patienten nach Ausschluß von Haftungsausschlüssen auch implantiert werden.

Unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten müßte die Möglichkeit der Lokalthherapie dadurch begrenzt sein, daß durch das hohe Konzentrationsgefälle zwischen einem Blutgefäß und dem Interstitium, in das die Wirksubstanz abgegeben wird, eine sehr hohe lokale Clearance stattfindet (93). Dies ist jedoch in der Praxis offenbar nicht immer der Fall, wofür Diffusionshindernisse der Gefäßwand oder Vernarbungen mit konsekutiv vermindertem lokalen Blutfluß verantwortlich sein können. Bei einigen Antibiotika kommt es aber offenbar auch zu Bindungen zwischen Geweben und Antibiotikum, wodurch die lokale Clearance vermindert wird (93,94). Der Nachweis von Wirkspiegeln im Abstand von mehreren Zentimetern vom Implantationsort der Kette (19) kann jedoch nur möglich sein, wenn ein vorbestehender Hohlraum mit den Ketten aufgefüllt wird. So liegt in dieser Applikationsform der Haupt-Anwendungsbereich der PMMA-Ketten, nämlich in der Auffüllung eines knöchernen Defektes, so daß der Infekt ausgeheilt werden kann und der nachfolgenden Spongiosaplastik der Weg bereitet wird.

Theoretisch erscheint die gleichmäßigere Abgabe der Wirksubstanz an die Umgebung, wie sie den PMMA-Ketten im Vergleich zum Gentamicin-impregnierten Kollagenschwamm zu eigen ist, geeigneter als die raschere Freisetzung der Hauptmenge von Wirksubstanz (31). Da aber diesbezügliche Untersuchungen nicht vorliegen, kann ein Urteil über die Eignung einer Freisetzungskinetik überhaupt nicht gefällt werden. Möglicherweise spielen auch die spezifischen Eigenschaften der verwendeten Antibiotika eine Rolle, bei denen im Falle der Aminoglycoside ein hoher Peak einen besonders starken Effekt hat (95), wobei in der folgenden Periode auch subinhibitorische Konzentrationen über den in dieser Substanzgruppe besonders ausgeprägten postantibiotischen Effekt einen Einfluß haben können (96), während eine kontinuierliche Abgabe der Substanz eher im Falle von Betalaktam-Antibiotika wünschenswert ist.

Gegenüber den beiden eingeführten Gentamicin-Trägern sind alle anderen Konzepte zur lokalen Antibiotikatherapie als experimentell anzusehen.

Calcium-Hydroxylapatit als Träger (4,43,45)) ist selbstverständlich von hohem Interesse in der Knochenchirurgie, da bei Anwendung dieser Substanz als Knochenersatz kein Fremdkörper aus dem Situs mehr geborgen werden muß und maximale Konzentrationen am Wirkort realisiert sind.

Die Möglichkeit, die hohe Toxizität der Aminoglycoside durch liposomale Verkapselung zu reduzieren und dabei gleichzeitig die Wirksamkeit zu erhalten, hat in den 80er Jahren zu erheblichen forscherschen Aktivitäten geführt (48,49,51,52,97). Karlowsky und Zhanel (67) faßten die Möglichkeiten der liposomal verkapselten Aminoglycoside in einem Übersichtsartikel zusammen und folgerten, daß die ursprüngliche Hoffnung des "active targeting", bei dem Liposomen mit Eigenschaften ausgestattet werden sollten, die eine selektive Akkumulation an bestimmten Krankheitsherden triggern, so daß die transportierte Substanz dann dort freigesetzt würde (98,99,100), sich nicht erfüllte, weil die Partikel zu rasch durch das RES aus der Zirkulation entfernt werden (101). Statt dessen sehen sie Perspektiven in der Behandlung intrazellulärer Infekte (102,103,) und beispielsweise in der lokalen Infektbehandlung (50,51,97).

Gegenüber Ketten, Kollagenschwamm, Fibrinclots und ähnlichen applizierbaren Formen von Antibiotika stellen liposomal verkapselte Formen als injizierbare Präparationen ein grundsätzlich anderes Prinzip dar. Dies kann vorteilhaft, aber auch von Nachteil sein. Das Verteilungsvolumen der Substanz kann beliebiger definiert werden und es können Gewebsareale in dreidimensionaler Form vom Antibiotikum erfaßt werden. Die Substanz kann gleichzeitig in das Gewebe eingebracht werden und einen Fremdkörper umgeben, ohne daß um diesen durch implantierbare Träger ein erneuter Hohlraum entsteht, der im Endeffekt die Einheilung des Implantates erschweren kann, unabhängig davon, ob der Infekt letztlich beherrscht wird oder nicht. Andererseits ist die Anwendung bei vorbestehenden Hohlräumen oder auch bei Anlage von Saugdrainagen problematisch, wenn nicht von vornherein unmöglich. Ein weiterer Vorteil besteht sicherlich auch darin, daß

die Substanz prinzipiell mehrfach ohne Eröffnung der Haut angewandt werden kann.

Unter den liposomalen Präparationen nimmt die verwendete multivesiculäre Form eine Sonderstellung ein, da sie von Seiten des Herstellungskonzeptes und der Freisetzungseigenschaften von anderen Liposomen weit abweicht. Zweifelsohne liegt ein theoretischer Vorteil gegenüber den unilamellären Liposomen, ob sie nun groß oder klein sind, in dem Aufbau aus zahlreichen einzelnen inneren Kammern. Dies sichert zumindest theoretisch eine langsame und kontinuierliche Freisetzung der Wirksubstanz, wobei am Anfang, bedingt durch die große Oberfläche, eine größere Anzahl von Vesikeln gleichzeitig arrodieren könnte, während gegen Ende des Abbaus der Partikel nur noch eine geringe Anzahl von Vesikeln den Wirkstoff gleichzeitig freisetzen kann.

Der Herstellungsprozeß der multivesiculären Liposomen, wie er ursprünglich von Kim und Mitarbeitern beschrieben wurde, basiert auf früheren Arbeiten der gleichen Autoren (104) mit univesiculären Liposomen und wurde hinsichtlich der Zusammensetzung der Lipide unverändert übernommen. Unter anderem bestimmt die Zusammensetzung liposomaler Membranen die Eigenschaften der Partikel. So kann beispielsweise durch eine Erhöhung des Anteils von Cholesterol die Stabilität gesteigert werden (105). Bei der Entwicklung der Amikacin-Liposomen wurde jedoch auf derartige Modifikationen bewußt verzichtet.

2. Entwicklung Amikacin-haltiger multivesiculärer Liposomen

Bei der Auswahl des Antibiotikums sind die Grenzen relativ eng gesteckt. Die Bedingungen werden auch klar, wenn man sieht, daß sich nahezu die gesamte Literatur über liposomale Verkapselung von Antibiotika auf Aminoglycoside bezieht, wie in der Übersichtsarbeit von Karlowsky dargestellt wird (67). Dennoch ist die Verwendung dieser Substanzen nicht

unproblematisch, da in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß sie mit biologischen Membranen reagieren und diese alterieren können (106,107). Zum Zeitpunkt der Laborarbeiten der vorliegenden Untersuchung waren die Chinolone, die durch ihre Stabilität in wässriger Lösung ebenfalls für die liposomale Verkapselung geeignet sind, noch eine relativ neue Substanzgruppe. Der Patentschutz für Ciprofloxacin wird jedoch in Kürze enden, so daß dann diese Substanzen problemlos für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung stehen werden. Die massenbezogene Wirksamkeit ist bei dieser Substanz mindestens ebenso groß wie bei Amikacin. Da die Gyrasehemmer aber nicht so alkalisch reagieren wie die Aminoglykoside, sind Vorteile im Bereich der Interaktion mit anderen Molekülen denkbar. Die Toxizität der Aminoglycoside scheint dagegen bei der lokalen Applikation eine untergeordnete Rolle zu spielen und von Seiten des antibakteriellen Spektrums bieten sich keine Vorteile für die Gyrasehemmer, so daß gefolgert werden kann, daß heute allenfalls von der physikochemischen Seite Gyrasehemmer den Aminoglycosiden vorzuziehen wären.

Der Aufbau des gesamten Fertigungsprozesses für die zu Tierexperimenten erforderlichen Präparationen erforderte Rücksichtnahme auf verschiedene Bedingungen. Die Herstellung von Emulsionen ist ein in der Pharmazie und in der Lebensmitteltechnologie ubiquitärer Prozess (79, 80). Die einfachste Methode ist die eines einfachen Mixverfahrens, das durch exzentrische Anordnung des Mixers und durch Einbuchtungen in den Mischbehälter, die die kreisende Bewegung der Emulsion unterbrechen, intensiviert werden kann. Steigerung der Mischintensität ist durch Rotor-Stator Anordnungen möglich, bei denen ein geeigneter Impeller das Material ansaugt oder abstößt und es dabei durch der ursprünglichen Mischrichtung entgegengesetzt angeordnete Kanäle preßt. Andere Verfahren, bei denen Emulsionspartikel im Nanometerbereich hergestellt werden können, beruhen auf Injektion der diskontinuierlichen Phase durch eine Düse in die kontinuierliche Phase. Allen diesen hocheffizienten Verfahren gemeinsam ist

eine mehr oder weniger ausgeprägte Erwärmung des Materials, die im vorliegenden Falle vermieden werden sollte, da Aminoglycoside zwar sehr thermostabil sind, die eingesetzten Lipide jedoch durch Erhitzung alteriert werden können (108). Gegenüber anderen hocheffizienten Verfahren wurde daher einer einfachen Mischanordnung der Vorzug gegeben. Dabei war das Problem zu bewältigen, daß die eingesetzten Komponenten Chloroform und Salzsäure eine Vielzahl von Materialien von der Verwendung ausschließen (81), so daß schließlich eine Apparatur, in der die wesentlichen Komponenten aus Teflon und Glas bestanden, entwickelt wurde. Die in Abbildung 5 dargestellte Anordnung erfüllt alle Anforderungen an eine experimentelle Herstellung der Präparationen mit Ausnahme einer möglichen Undichtigkeit für Chloroform-Verdampfung. Diese besteht entlang der rotierenden Welle über das Motorgehäuse und von dort in die Umgebung. Ein relevanter Einfluß wurde jedoch durch einfache Gewichtsbestimmung, bei der weniger als 1% des Ausgangsgewichtes während der Emulgierung verloren ging, ausgeschlossen.

Die Bemühungen, durch Zusatz von Sucrose osmotische Neutralität der Partikel und eine andere Größenverteilung sowie nicht zuletzt eine höhere Stabilität der Partikel zu erzielen, beruhen auf rein hypothetischen Ansätzen. Die morphologisch auffallende Abweichung der Amikacin-Partikel von bekannten Partikeln, die Cytosin-Arabinosid enthielten (109) war letztlich entscheidendes Motiv für diese Veränderungen, die zumindest teilweise die erwünschten Ziele erreichten.

Die Bedeutung des Zusatzes von Salzsäure zur wässrigen Ausgangslösung bleibt unklar. Auch für Cytosin-Arabinosid enthaltende Liposomen wurde die Beobachtung gemacht, daß dadurch die Stabilität der Partikel erhöht wird und daß in den fertigen Partikeln keine Salzsäure mehr enthalten ist (110). Die Optimierungsversuche, deren Ergebnisse in Tabelle 3 dargestellt sind, unterstreichen diese Beobachtung. Auch hier sind die Partikel, die die höchste HCl-Konzentration in der wässrigen Ausgangslösung haben, die stabilsten. Daneben scheint der Zusatz von Sucrose vor allem bei

niedrigeren Konzentrationen von HCl zur Stabilisierung beizutragen, während ein Einfluß der verschiedenen Sucrose-Konzentrationen bei der höchsten HCl-Konzentration nicht feststellbar ist. Wenngleich ein Teil dieser Effekte durch die Einstellung der wässrigen Ausgangslösung auf eine optimale osmotische Konzentration erklärbar zu sein scheint, dürften doch auch andere, bisher unerkannte Faktoren von Bedeutung sein.

Die Größenbestimmung der Partikel ist selbstverständlich ohne Umstände mit Hilfe eines Lichtmikroskops möglich, indem eine Population von beispielsweise 100 Partikeln mit Hilfe eines Okularmikrometers gemessen wird und eine Verteilungskurve erstellt wird, wie von Kim angegeben (110). Häufigere Bestimmungen lassen sich dagegen mit wesentlich geringerem Arbeits- und Zeitaufwand mit Hilfe eines Partikelgrößen-Analysators durchführen. Dieses Verfahren hat dabei dann den Vorteil, daß es routinemäßig zur Charakterisierung von Präparationen herangezogen werden kann und Abweichungen von der Norm aufdecken kann. Das Verfahren der Laserlicht-Streuung ist dabei eine in der wissenschaftlichen und industriellen Routine angewandte Methode, die ihrerseits im Falle der fertigen Partikel keiner weiteren Validierung bedarf. Die Messung in wässriger Lösung in der Meßküvette birgt keine Besonderheiten und entspricht der Routineanwendung des Gerätes. Anders verhält es sich dagegen mit den Untersuchungen der primären Wasser-in-Öl-Emulsion. Diese stellen nur eine orientierende Untersuchung dar, da das verwendete Gerät keine exakte Messung bis in den Bereich von 1 μm zuläßt, sondern die Wellenlänge der verwendeten Laser-Quelle hier nur Extrapolationen zuläßt. Die Messungen wurden zwar wiederholt durchgeführt, aber es handelte sich um Mehrfachmessungen ein und derselben Lösung in der Küvette, die unter diesen Bedingungen nahezu keine Streuung aufwies. Auf eine zweite Untersuchung wurde verzichtet, da das System jeweils in relativ aufwendiger Form über Alkoholspülungen wieder in den Meßzustand für wässrige Lösungen versetzt werden mußte. Die Ergebnisse sind jedoch zumindest hinsichtlich der erreichbaren Größenordnung der Partikel konsistent mit licht-

und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, daß Emulsionen, deren Partikelgröße 1 µm deutlich unterschreitet, im Gegensatz zu den hergestellten Präparationen transparent sind (79, 80).

Das gewählte Analyseverfahren zur Amikacinbestimmung erwies sich gegenüber den unterschiedlichen Anforderungen als genau und anpassungsfähig. Neben der wesentlich kostengünstigeren Verfahrensweise im Vergleich zu handelsüblichen Assays bestanden weitere Vorteile in der Modifizierbarkeit der Parameter je nach den Gegebenheiten des Analysates und nach der zu erwartenden Amikacin-Konzentration. Insbesondere bei den Plasmaspiegel-Bestimmungen des Depot-Präparates sind von den konventionellen Methoden (TDX[®] und Siva-Emit[®]) keine verlässlichen Resultate zu erwarten, da bei diesen Verfahren die Nachweisgrenze bei 0,6µg/ml liegt, ein Wert, der nur in Ausnahmefällen erreicht wurde. Anfälligkeiten und Fehlerquellen des PCFIA beruhten auf unzureichender Beschichtung der Partikel mit Antikörpern gegen Amikacin sowie auf Alterung der beschichteten Partikel. Entscheidend für die Qualität der Antikörperbeschichtung war eine gründliche Ultraschallbehandlung der Partikel vor Beginn des Beschichtungsverfahrens. Unzuverlässiges Verhalten des Assays ließ sich an einem niedrigen Korrelationskoeffizienten (< 0,98) bei der Erstellung der Eichkurve erkennen. Eine typische Eichkurve des „Nano-Assays“ ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei sind, wie man in der Abbildung erkennen kann, die niedrigen Konzentrationen störanfälliger, jedoch wurden die Wiederfindungsraten angesichts des Einsatzbereiches des Assays als akzeptabel angesehen; da es bei diesen Dimensionen nur um das Verfolgen der Substanz und keineswegs um die Untersuchung womöglich toxischer Konzentrationen geht.

Die Reproduzierbarkeit der Liposomen-Präparationen ist insofern von wesentlicher Bedeutung im experimentellen Konzept, als die Ergebnisse von Tierversuchen selbstverständlich nicht auf der zufälligen Zusammensetzung

einer einzelnen Präparation der Partikel beruhen dürfen. Die Analyse der fertigen Partikel (Tabelle 2) stellt dabei nur einen Aspekt dar, ist aber selbstverständlich von grundlegender Bedeutung. Andere Gesichtspunkte betreffen die Größenverteilung, von der auch pharmakodynamische Eigenschaften mitbestimmt werden. Hier weisen die in Abbildung 8 dargestellten Kurven von drei unter gleichen Bedingungen hergestellten Präparationen eine sehr geringe Streubreite zwischen zwei Präparationen auf, während eine dritte auf Grund ihrer Größenverteilung als unbrauchbar erkannt werden kann. Somit sind Einflüsse unerkannt unterschiedlicher Partikelgrößen auf das in vivo-Verhalten praktisch ausgeschlossen.

Da die Depot-Amikacin Partikel recht komplexe Strukturen darstellen, ist zumindest die Lagerungsstabilität bis zum Einsatz im Tierversuch zu überprüfen und zu gewährleisten. Diese Problematik wurde umfänglich untersucht, wobei verschiedene Ansätze verfolgt wurden. Grundlegende Verbesserungen ließen sich durch die Optimierungsversuche, deren Ergebnisse in Tabelle 3 dargestellt sind, erzielen. Ein gemeinsamer Effektor der verschiedenen Einflußgrößen könnte in der Osmolalität der verkapselten wässrigen Lösung zu sehen sein. Dabei würde bei hoher Säurekonzentration die Stabilität mit zunehmender Sucrosekonzentration im Sinne einer osmotischen Destabilisierung abnehmen, da die optimale Osmolalität überschritten wird, während bei niedriger Salzsäurekonzentration mit zunehmendem Zuckerzusatz eine Zunahme an Stabilität mutmaßlich bis zu einem osmotischen Optimum erreicht wird. Angesichts mangelnder Kenntnis der Einflüsse verschiedener Inhaltsbestandteile schien der Ansatzpunkt, in größeren Untersuchungen über die Zusammensetzung der Ausgangsstoffe die Partikel zu optimieren, nicht lohnend, zumal völlig offen war, wie das in vitro Verhalten, das ja offenbar ähnlich wie bei den kleineren Liposomen SUV und LUV von rascher Interaktion mit Proteinen gekennzeichnet ist, mit dem in vivo untersuchten Verhalten korreliert.

Ein vielversprechender Ansatz zeigte sich bei dem Versuch, durch Modifikation der Lagerungsbedingungen eine Verbesserung der in vitro-

Stabilität zu erzielen. Die ungünstigsten Lagerungsbedingungen scheinen Ionenlösungen darzustellen, während Plasmaproteine eine protektive Wirkung haben. Ähnliche, wenn auch nicht gleich ausgeprägte Effekte konnten mit Albuminlösung erzielt werden. Die Lagerung in Amikacin/Glucose-Lösung verfolgte das Ziel, die Diffusion von Amikacin aus den Partikeln in das Lagerungsmedium durch Verringerung des Konzentrationsgradienten zu reduzieren. Obwohl dies in vitro erfolgreich zu sein scheint, muß man das Ergebnis mit Vorsicht beurteilen; denn es ist denkbar, daß die Partikel trotz der relativ stabilen Amikacinbeladung destabilisiert sind und in vivo ein völlig anderes Verhalten als in vitro zeigen. Ähnliches gilt auch bei Lagerung in Proteinlösungen, aber in diesem Falle beschränkt sich der möglicherweise membranaktive Effekt des Amikacins (106,107) auf die Innenseite der Membranen.

In jedem Fall wurden bei diesen Untersuchungen nur mögliche Lösungsansätze aufgezeigt, wobei festzuhalten ist, daß Lagerungsprobleme in der vorliegenden Arbeit nur von untergeordneter Bedeutung sind.

Von größerer Bedeutung ist die Frage, ob sich die fertige Suspension tatsächlich injizieren läßt. Dabei war zunächst die Frage zu klären, ob eine Veränderung der Partikel bei der Passage durch eine Kanüle von minimalem Durchmesser erfolgt. Zu diesem Problem wurde eine orientierende Analyse mit dem Ziel durchgeführt, grobe Veränderungen der Partikel zu erkennen. Während es auch unabhängig vom Ergebnis dieses Versuches denkbar ist, daß das Verhalten in vivo nach der Injektion verändert ist, konnte zumindest gezeigt werden, daß keine so nachhaltigen Veränderungen der Partikel erfolgen, daß bei akzelerierter in vitro Stabilitätsuntersuchung eine beschleunigte Desintegration stattfindet.

Auch die Verträglichkeit mit Lokalanästhetika ist von gewisser Bedeutung. Wenngleich Überlegungen zur etwaigen klinischen Anwendung sicherlich verfrüht sind, ist die Frage, ob eine Mischung mit einem Lokalanästhetikum die Partikel angreift, von Bedeutung. Es zeigte sich, daß die Kombination mit 0,5 % Lidocain keinerlei Veränderungen hervorrief, während bei 1 %iger

Lösung anfangs eine Destabilisierung zu erfolgen scheint, die jedoch nach zwei Tagen nicht weiter fortgeschritten ist als im Falle der Kombination mit 0,5 % Lidocain. 2 % Lidocain rief im Gegensatz dazu sofort einen Austritt von Amikacin in das Medium hervor. Wenngleich die weitere Diffusion dann nicht proportional zu den geringer konzentrierten Lösungen erfolgte, ist dennoch eine weitere Diffusion in das Medium festzustellen und man muß festhalten, daß gleich zu Anfang knapp 60% in das Medium übertraten, so daß die Menge, die noch weiter aus den Partikeln verloren gehen kann, nicht sehr groß ist. Wenngleich damit ein Beschädigung der Partikel durch die Einwirkung des Lokalanästhetikums gegeben zu sein scheint, muß dieser Effekt bei praktischer Anwendung nicht unbedingt eine Rolle spielen, da im Experiment eine Exposition über Tage stattfand, während der Kontakt in höheren Konzentrationen nur einige Minuten betragen würde und bei Injektion in zuvor infiltriertes Gewebe nur eine niedrige Konzentration über den begrenzten Zeitraum bis zur Resorption des Lokalanästhetikums einwirkte.

3. Pharmakokinetik und Wirksamkeitsuntersuchungen

Die mit Gentamicin-haltigen Partikeln durchgeführten Vorversuche waren so aufgebaut, daß ihre Resultate Rückschlüsse sowohl auf pharmakokinetisches Verhalten als auch auf die Wirksamkeit der Partikel zulassen. Gleichzeitig jedoch sind die möglichen Aussagen zu beiden Problemen recht unscharf. Die dabei gefundene Freisetzungskinetik mit einer $t/2$ der β -Phase von 110 Stunden beeindruckt zwar im Hinblick auf die gewonnene Halbwertszeit, wirft aber die Frage auf, inwieweit denn im Gewebe während dieser Zeit überhaupt bakterizide Konzentrationen des Antibiotikums vorliegen können. Hier kann man nur mutmaßen, daß ein Gleichgewicht zwischen Freisetzung und Resorption durch die Blutbahn vorliegen muß, das die lokale Konzentration an freier Substanz steuert. Im vorliegenden Fall

eines unveränderten Gewebes ist es schwer vorstellbar, daß die Resorption so stark verzögert wird, daß nennenswerte lokale Gewebsspiegel bestehen. Genaue Erkenntnisse zu diesem Problem lassen sich aber nur durch die sehr aufwendige und an Mäusen kaum durchführbare Technik der Mikrodialyse gewinnen (111).

Unter dem Gesichtspunkt der Effektivität konnte eine Reduktion der Keimzahlen im Gewebe um 4 Zehnerpotenzen gezeigt werden, wenn die Injektion des Depot-Präparates 48 Stunden vor dem bakteriellen Inoculum erfolgte. Beim Vergleich mit der Wirksamkeit freien Antibiotikums kann dies natürlich keinen Effekt mehr haben, wenn die Behandlung zum Zeitpunkt der Kontamination 48 Stunden zurück liegt. Unklar bleibt in gewissem Maße das Ergebnis einer zweiten Versuchsreihe, in der in verschiedenen Zeitabständen nach der Gabe von Depot-Gentamicin die im Gewebe verbliebenen Keimzahlen untersucht wurden; denn hier wurde zwischen einem Vorbehandlungsintervall von 4 Tagen und einem solchen von 6 Tagen ein Unterschied in den Keimzahlen von 3 Zehnerpotenzen gefunden. Dies überrascht; denn nach den Ergebnissen der Pharmakokinetik hätten die Tiere nahezu der gleichen Menge antibiotischer Wirksubstanz ausgesetzt sein müssen.

Wenn somit auch zunächst in diesen Versuchen für Gentamicin-haltige Partikel ein Wirksamkeitsnachweis erbracht werden konnte, bleiben doch noch zahlreiche Fragen zu diesem Problemkreis offen.

Die Untersuchung von Gewebsspiegeln von Amikacin erwies sich als problematisch. Zahlreiche Bemühungen unter Zuhilfenahme in der Literatur publizierter Methoden (89,90), im Gewebe die eingesetzte Menge der Substanz bei der Analyse wiederaufzufinden, erwiesen sich nicht als wirkungsvoller als einfache Gewebshomogenisierung. Es wurde daher angenommen, daß durch die in der Literatur beschriebene Bindung des Antibiotikums an Gewebsstrukturen (94) ein bestimmter Anteil der Substanz nicht zur Competition um Bindungsorte an den Antikörpern im Assay zur

Verfügung steht. Um dieses Verhalten genauer zu charakterisieren, wurde Depot-Amikacin postmortal in Gewebsproben injiziert, die dann entsprechend dem sonst angewendeten Homogenisierungsverfahren aufgearbeitet wurden. Dabei zeigte sich, daß auch unter solchen Bedingungen die Wiederfindungsrate 70% nicht überschritt. Es erwies sich zusätzlich als sinnvoll, das Homogenisat zu alkalisieren, wodurch möglicherweise Ionenbindungen des stark basischen Amikacinmoleküls an Gewebsstrukturen vermieden werden konnten.

Die mit dieser Methodik ermittelte Gewebskonzentrationskurve des Depot-Amikacin entspricht der Pharmakokinetik eines 2 Komponentensystems, also beispielsweise einer Substanz, die zum Teil in freier Form im Blut vorliegt und zum Teil an Plasmaproteine gebunden ist. Vermutlich kann man diese Modelle der vorliegenden Kinetik jedoch nicht überstülpen, sondern muß sich auf eine deskriptive Kurvenbeschreibung beschränken, da nicht bekannt ist, auf welche Art und Weise die Freisetzung aus den Partikeln erfolgt und welche Mechanismen dabei involviert sind. Mit größerer Sicherheit läßt sich angeben, daß bei der Gewebs-Pharmakokinetik der freien Substanz offenbar keine Bindungseffekte involviert sind, die einen verzögerten Abbau der Substanz verursachen würden. Der initiale Anstieg der Kurve in Abbildung 15 ist wahrscheinlich durch eine nachlassende Verdünnung der Substanz in dieser Phase durch das injizierte Volumen zu erklären, während die nachfolgenden Meßpunkte vermutlich in entscheidender Weise durch Rückverteilungsphänomene nach Resorption der Substanz in das Blutgefäßsystem beeinflußt sind.

Bei Hunden wurden nach Injektion von 20 mg/kg KG freier Substanz maximale Plasmaspiegel von 22 µg/ml erzielt (112). Der abfallende Schenkel der Konzentrationskurve verläuft zwar bei Hunden und Menschen (113) flacher als die ermittelte Kurve, aber Vergleichbarkeit ist hier nur bedingt gegeben, da der Stoffwechsel kleiner Tiere wie der Nager erheblich schneller abläuft und somit die Werte nicht exakt vergleichbar sind (114). Die gleiche Einschränkung gilt für Abbildung 16, die darstellt, im welchem niedrigem Bereich

sich die Plasmaspiegel von Amikacin nach Injektion von Depot-Amikacin im Verlaufe der Resorption des Substanzdepots bewegen.

Bei allen pharmakologischen Überlegungen muß festgehalten werden, daß über die therapeutisch entscheidende Höhe des Spiegels an freier Substanz im Gewebe am Injektionsort nur indirekte Schlußfolgerungen möglich sind, da kein Verfahren außer der Mikrodialyse zur Verfügung steht, das eine Trennung zwischen freier und noch gebundener Substanz im Gewebe bei der Aufarbeitung der Proben ermöglichen würde.

Die Entscheidung, im Tierversuch ein Fremdkörperinfektionsmodell zu wählen, ist unter verschiedenen Gesichtspunkten naheliegend. Ein entscheidendes Argument besteht darin, daß man eine neue Applikationsform an einem Problem erproben sollte, für das bisher nur unbefriedigende Lösungen existieren. Gleichzeitig stellen Fremdkörper-assoziierte Infekte ein medizinisches und damit ökonomisch-gesellschaftliches Problem erheblichen Ausmaßes dar. In den USA wurden 1987 bei einer geschätzten Anzahl von 4000 infizierten Hüftgelenkprothesen pro Jahr Behandlungskosten dieser Komplikation von 100 000 000 \$ veranschlagt (115). Eine vergleichbar große Zahl von Infekten kommt bei Herzschrittmachern, Gefäßprothesen, kosmetischen Implantaten und Ähnlichem vor, so daß das Problem von erheblicher medizinischer wie volkswirtschaftlicher Bedeutung ist.

Die Entwicklung von Tiermodellen zur Untersuchung dieser Infekte erstreckt sich bereits über nahezu 50 Jahre (116,117,118). Während die früheren Untersuchungen zunächst das höhere Infektionsrisiko von Fremdkörpern bearbeiteten und dabei verschiedene subcutane Nahtmaterialien als Fremdkörper verwendeten, wurden in den in den 80er Jahren Modelle definierter Fremdkörper entwickelt und deren Infektoresistenz und -Suszeptibilität sowie mögliche Behandlungsansätze untersucht (91,119,120). Zimmerli beschrieb 1982 ein Modell, in dem Meerschweinchen PTFE- (Polytetrafluorethylen) Käfige implantiert wurden, die dann nach-

folgend infiziert wurden (120). Das Modell erwies sich als besonders geeignet, weil die dreidimensionale Struktur der Käfige die Entnahme von Gewebsflüssigkeit aus dem Inneren erlaubte und so Keimkonzentrationen oder auch Antibiotikaspiegel am Wirkort bestimmen ließ. Andere Autoren griffen dieses Modell auf (121,122), so daß hiermit ein gewisser Standard eines Fremdkörperinfektionsmodells gesetzt wurde. Wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet, mußte jedoch auf kleinere Fremdkörper zurückgegriffen werden (123,124)

Christensen (91) entwickelte dabei ein Versuchsmodell der subcutanen Implantation von Kathetersegmenten, das den Erfordernissen des Versuchsaufbaus der vorliegenden Untersuchungen weitgehend entsprach, und somit die Basis der Entwicklung des angewandten Fremdkörperinfektionsmodells darstellte.

Im Gegensatz zu Christensens Vorschlag der Implantation eines Fremdkörpers in die Flanke der Versuchstiere erwarteten wir hierbei Probleme durch Nagen an den Wunden und entschieden uns für eine Platzierung des Fremdkörpers im Nacken der Tiere. Das Abweichen von der offenen chirurgischen Implantationstechnik zugunsten einer halb geschlossenen Technik reduzierte sicherlich die operationsbedingten Einflüsse auf das Ergebnis der Untersuchungen. PTFE[®] (Teflon) als Fremdmaterial entspricht einem Standardvorgehen in vielen der zitierten Arbeiten.

Die bakteriologische Arbeitsweise entspricht Standards auf diesem Gebiet. Der relativen Ungenauigkeit der Keimzahlbestimmungen durch Vergleich der Stammlösung mit den Lösungen des Mc Farland Standards wird üblicherweise Rechnung getragen, indem die tatsächlich verwandten Bakteriensuspensionen nach Serienverdünnungen in Zehnerschritten auf Nährböden ausgebracht werden und so die genaue Keimzahl bestimmt wird. Ein Problem bei der bakteriologischen Aufarbeitung der Gewebe liegt in der Möglichkeit, daß noch vorhandene Reste des Antibiotikums auf den Agar-Platten wachstumshemmend wirken können und auf diese Weise Sterilität

oder niedrige Keimzahlen vortäuschen, während in Wirklichkeit nur die Wachstumshemmung durch das noch vorhandene Antibiotikum beobachtet wurde. Dieser Artefakt wurde jedoch kontrolliert, indem Agarplatten, die nach Bebrütung mit Gewebshomogenisat steril geblieben waren, mit kontrollierter Keimzahl infiziert wurden, wobei sich gleiches Wachstum ergab wie auf frischen Platten.

Die Keimzahl von ca. 10^7 , die für die Versuche verwendet wurde, entspricht auch anderen Untersuchungen in der Literatur. Detaillierte Untersuchungen zu diesem Problem stellten Citak und Mitarbeiter an, die bakterielle Inocula in Gegenwart bakterizider Konzentrationen von Cephalosporinen untersuchten und mit 10^7 Keimen in 50% der Fälle Abszesse erzeugten (125). Eine Steigerung der Antibiotikakonzentration um das 4 fache konnte die Abszesse in allen Fällen verhindern, was die These unterstützt, daß die zu erwartende hohe lokale Konzentration von Antibiotika auch in Gegenwart von Fremdkörpern Infekte verhindern kann. Bouchenaki und Mitarbeiter zeigten, daß eine einzelne Dosis eines Antibiotikums die Infektionsrate von subcutan implantierten Teflon Käfigen bei einer Bakterienkonzentration von 10^5 um 50% senken kann (121), so daß die Verwendung höherer Bakterienkonzentrationen sinnvoll erschien.

Da ein Modell entwickelt werden sollte, in dem eine Infektion durch konventionelle systemisch wirksame Antibiotikagabe nicht verhindert werden kann, um zu überprüfen, ob die lokale Applikation der Depotform hierbei mit Erfolg angewendet werden kann, wählten wir die Keimkonzentrationen von ca. 10^7 .

Der erste orientierende Tierversuch ergab einen Anhaltspunkt für die mögliche Wirksamkeit der Depotpräparation, wobei im wesentlichen zwei Probleme auftraten. Einerseits waren auch Fremdkörper und Gewebe steriler Kontrolltiere zum Teil infiziert, was auf eine unzureichende Präparationstechnik zurückgeführt wurde und in den folgenden Experimenten verbessert werden konnte. Andererseits war die Dosierung der freien Substanz sehr niedrig gewählt.

Bei der Ermittlungen von Äquivalenzdosen von Medikamenten für Mäuse im Vergleich zu Menschen geben Freireich und Mitarbeiter in einer Arbeit, die sich allerdings auf Chemotherapeutika bezieht (114), für die Nager eine 12 fach höhere Dosis als für Menschen an. In der einschlägigen Literatur über Amikacin wurde die Toxizität nur an größeren Labortieren untersucht, so daß hierzu keine Daten vorhanden sind. Beim Vergleich physiologischer Parameter zwischen Menschen und Nagern beträgt der renale Blutfluß bei Nagern das 3 fache des Volumens beim Menschen (114). Da Amikacin nur renal ausgeschieden wird, mag dies ebenfalls ein Hinweis auf die korrekte Dosierung sein. Danach stellen 0,4 mg auf jeden Fall eine Unterdosierung dar, so daß im nächsten Versuch 4 mg Depotsubstanz mit 4 mg freier Substanz verglichen wurden. Da diese Dosierung bereits mehr als das 12 fache der beim Menschen anzuwendenden oberen Dosisgrenze darstellt, ergibt sich praktisch kein weiterer Spielraum der Dosissteigerung mehr, wobei auch die Wirkung sehr hoch gewählter Maximaldosen freier Substanz hinter der der Depotsubstanz zurückblieb.

Selbstverständlich darf das signifikant unterschiedliche Ergebnis in einem solchen Versuch (Nr. 2) nicht darüber hinwegtäuschen, daß ein einziger infizierter Fremdkörper in der mit Depot-Amikacin behandelten Gruppe das Resultat vereitelt hätte, so daß weitere Untersuchungen erforderlich waren.

Nach den zur Verfügung stehenden pharmakokinetischen Daten wäre eine Dosierung des Depot-Präparates mit 8 mg ohne weiteres möglich. Nach der Analyse im Versuch 3 erschien jedoch 1 mg zu Beurteilung der Wirksamkeit ausreichend, so daß vorgezogen wurde, mit einer Substanzmenge zu arbeiten, bei der die Gefahr von Artefakten durch residuale Wirksubstanz nach Beendigung des Versuchs gering ist.

Die zum Teil noch widersprüchlichen Ergebnisse der folgenden Versuche wurden auf Probleme der Fremdkörperimplantationstechnik und des Versuchsaufbaus zurückgeführt, nachdem in den anfänglichen Experimenten der Nachweis der Wirksamkeit geführt zu sein schien. Als Fortschritt wurde insbesondere die äußerst standardisierte Implantation und Kontamination

des Fremdkörpers, die im Versuch 9 erstmalig angewendet wurde, angesehen. Die Bestimmung residualen Amikacins im Gewebshomogenisat im zweiten unter standardisierten Bedingungen durchgeführten Versuch erlaubte nochmals den Ausschluß einer Wachstumshemmung *in vitro* durch Antibiotikaresten. Zwar waren in einigen Fällen noch bis zu 450 µg im unverdünnten Gewebshomogenisat meßbar, nach einer Verdünnung um 4 Zehnerpotenzen entspricht dies jedoch nur einer unwirksamen Konzentration. Daneben fällt bei der Beurteilung der Daten auf, daß ausgerechnet bei vier der fünf Tiere mit hohen Residualkonzentrationen spontan Keime wuchsen und die Fremdkörper infiziert waren, so daß die Schlußfolgerung denkbar erscheint, daß in diesen Fällen nur eine nicht zur Behandlung der Keime ausreichende Menge an Antibiotikum aus den Partikeln freigesetzt wurde und dadurch die hohe Residualkonzentration ebenso wie das Therapieversagen erklärt werden kann. Während die Bestimmung des residualen Amikacins auch in der Gruppe der nicht behandelten Tiere nicht 0 ergab, waren die Unterschiede der Assayresultate zwischen den behandelten Gruppen und der unbehandelten Kontrollen doch signifikant oder hochsignifikant unterschiedlich.

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen wurde beim Versuch 11 in einer Gruppe von 8 Tieren das Antibiotikum nur mit einer Verzögerung von einer Stunde nach der Inoculation der Bakterien angewendet. Während bei klinischen Untersuchungen unter solchen Bedingungen die Wirkung einer Antibiotikaprophylaxe vermindert erschien (126), war hier kein Unterschied zur sofortigen Gabe feststellbar, was aber auf die kleine Fallzahl zurückführbar sein kann.

Ein weiterer Ansatz, die Grenzen der Wirksamkeit auszuloten, erfolgte im Versuch Nr. 12. Hier wurden in einer Versuchsgruppe nur 0,5 mg Depot-Amikacin verabfolgt, womit in etwa die in anderen Versuchen gefundene Wirksamkeit von 5mg freier Substanz erzielt wurde. Wenn man die Höchstdosis freier Substanz bei der Maus mit etwa 4 mg ansetzt, so würde die niedrige Dosierung von 0,5 mg der Depotsubstanz umgerechnet einer

Gabe von etwa 30 mg Gentamicin und damit etwa der an 4 PMMA Kugeln gebundenen Menge beim Menschen entsprechen. Die eingesetzte Bakterienkonzentration erwies sich in diesem Versuch jedoch als etwa eine Zehnerpotenz niedriger als in den meisten anderen Experimenten, so daß die Ergebnisse nur unvollständige Aussagen erlauben.

Im Versuch Nr. 13 wurde nochmals die Frage der Wirksamkeit bei verzögerter Gabe untersucht, wobei sich zumindest bei den Gewebskeimzahlen ein Trend zu einem geringeren Antibiotika-Effekt bei zweistündiger Verzögerung ergab.

Weitere Versuche betrafen den Vergleich zweier verschiedener Paräparationen und die Frage, ob sich Unterschiede in der Wirksamkeit ergeben, wenn unterschiedliche Kombinationen von freiem und gebundenem Amikacin verwendet werden. Immerhin ist vorstellbar, daß eine initiale Bakterizidie durch einen relativ hohen Anteil freier Substanz, gefolgt von einer Art Konsolidierungstherapie mit liposomal verkapselter und langsam, in geringen Mengen frei gesetzter Substanz, der Situation in besonders hohem Maße gerecht werden könnte. Die Unterschiede zwischen den Gruppen ließen solche Rückschlüsse jedoch nicht zu.

Die sorgfältigere Analyse der Wirkung freien Amikacins zunächst in einer der Depotform äquivalenten Dosis, dann in Maximaldosierung ergab im günstigsten Fall eine Wirkung, die hinter derjenigen von 1 mg Depotsubstanz zurückblieb, wobei allerdings mit $p = 0,13$ das Signifikanzniveau verfehlt wurde. Wenn man allerdings die acht Tiere aus den Vorversuchen, die mit 4 mg der freien Substanz behandelt wurden, in die Gruppe der Tiere einschließt, bei denen 5 mg freier Substanz in verschiedenen Applikationsschemata verabfolgt worden waren, so lag auch hier bei allen anwendbaren statistischen Tests ein Signifikanzniveau $< 0,005$ vor. Man kann damit schlußfolgern, daß Infektprophylaxe durch Depot-Amikacin mit einem Fünftel der Wirkdosis freier Substanz dieser in der Wirkung überlegen ist. Dabei ist hervorzuheben, daß eine höhere, intensivere oder andere Dosierungsweise der freien Substanz nicht erreichbar ist. Die heutzutage

übliche Applikationsform der Aminoglycoside mit einer einmaligen Gabe der täglichen Gesamtdosis (127,128) wurde ebenso simuliert wie über den Tag verteilte Gaben, ohne daß die Wirksamkeit verbessert werden konnte.

Dieses Ergebnis wirft die Frage nach weiteren Anwendungen der Depot-Präparation unter problematischeren Bedingungen und in höherer Dosierung auf. Entsprechend experimentellen Untersuchungen und klinischen Ergebnissen läßt sich der Begriff der „prophylaktischen Antibiotikagabe“ auf einen Zeitraum von bis zu 6 Stunden nach der Inokulation anwenden (126,129). Bei der Untersuchung der Wirksamkeit von 5 mg der Depotsubstanz nach Intervallen von sieben und elf Stunden zwischen Injektion der Antibiotika und der bakteriellen Kontamination ließen sich Effekte zeigen, die in etwa der Wirkung von 1 mg mit sofortiger Gabe nach Kontamination vergleichbar waren. Allerdings schien bei dem längeren Intervall eine nachlassende Wirkung erkennbar zu sein.

Bei Ausnutzung des Dosierungsspielraumes der Depotsubstanz konnte schließlich auch 24 Stunden nach massiver Kontamination noch eine Wirksamkeit in mehr als 50% der Fälle gezeigt werden, wiederum vergleichbar der Wirkung von freier Substanz bei Gabe unmittelbar vor der Kontamination.

Einschränkend muß allerdings festgehalten werden, daß sich bei der hohen Partikelkonzentration in der Behandlungslösung, die unter solchen Umständen angesichts der Amikacin-Konzentration in den Partikeln erforderlich ist, eine visköse und bei der Injektion schwierig zu handhabende Lösung ergibt.

Weitaus weniger experimenteller Aufwand wurde mit zwei weiteren Tiermodellen betrieben, die jedoch zumindest auch Teilaspekte der Wirksamkeit beleuchten.

Unter dem Gesichtspunkt, daß die Infekte zahlreicher die Haut perforierender Implantate wie CAPD- und Hickman-Katheter, Zentralvenenkatheter, Steinmannnägel oder externe herzunterstützende Geräte in der Klinik eine

herausragende und zum Teil vitale Bedeutung haben, sollte untersucht werden, inwieweit sich ein Schutz eines solchen Implantates mit Hilfe von Depot-Amikacin erzielen läßt. Die Ergebnisse waren weniger eindrucksvoll als die zuvor beschriebenen. Man muß jedoch wiederum bedenken, daß nur 1 mg der Depotsubstanz mit wiederholter Gabe von 5mg der freien Substanz verglichen wurden. Dies und die Tatsache, daß es praktisch nicht möglich ist, einen Katheter durch eine systemische Dauer-Antibiotikatherapie zu schützen, wirft ein anderes Licht auf die Resultate. Wenngleich auch die systemische Amikacin-Gabe wirksam war, so ist sie doch in der Klinik praktisch nicht durchführbar. Eine Injektion eines Depotpräparates an die Hautperforationsstelle zumal nach lokaler Anästhesie, ist jedoch leicht durchführbar und unter dem Gesichtspunkt der Resistenzentwicklung für den Gesamtorganismus wesentlich unbedenklicher als eine systemische Gabe von Antibiotika. Zumindest in Situationen wie der Knochenmarksaplasie bei Chemotherapie ist eine solche Schutzmaßnahme vorstellbar. Dabei muß zusätzlich noch die extrem hohe angewendete Inoculumkonzentration in Rechnung gestellt werden. Denkbar ist immerhin, daß ein sehr effizienter Schutz von perforierenden Implantaten bei geringeren, den Konzentrationen der Hautkeime vergleichbaren Keimzahlen besteht. Andererseits muß man aber den Einwand gelten lassen, daß zur Hautflora auch Streptokokken gehören, gegen die die Aminoglykoside grundsätzlich wirkungslos sind. Ob sich bei extrem hohen Antibiotikakonzentrationen eine Wirksamkeit auch gegen diese Keime erzielen läßt, kann nicht beurteilt werden.

Weniger überzeugend sind die Ergebnisse der Transplantatprotektion durch Depot-Amikacin. Die Kontaminationsform ist in diesem Modell allerdings als sehr artifizell anzusehen. Zusätzlich ist zu erwähnen, daß es schwierig ist, bei Nagern die erforderlichen Okklusivverbände intakt zu halten, daß aber Luftexposition und Austrocknung des Transplantates sehr rasch zu Nekrosen führen können. Ein weiteres Problem stellt die geringe Schichtdicke der Nagerhaut dar, die es schwierig macht, eine sinnvolle Platzierung des Präparates durchzuführen. Möglicherweise würden Untersuchungen an

größeren Versuchstieren und eine Optimierung der Bedingungen günstigere Ergebnisse erzielen lassen.

In den beschriebenen Versuchsserien konnte die Wirksamkeit der Präparation vor allem bei der Kontamination und Infektion von Fremdkörpern nachgewiesen werden. Die Untersuchung verschiedener Dosen von Depot-Amikacin im Vergleich zur Wirksamkeit freier Substanz zeigt, daß im Tierexperiment Infektsituationen geschaffen werden können, in denen freies Amikacin keine Wirkung hat, während die lipidverkapselte Depotsubstanz den Maximalerfolg der Behandlung, nämlich die Sterilisierung des kontaminierten oder infizierten Fremdkörpers in situ ermöglichte. Keimreduktionen im Gewebe allein können nicht als Beweis einer klinisch sinnvollen Behandlungsmöglichkeit angesehen werden, da nur der Zustand des Implantates letztendlich entscheidend ist. Hierbei ergeben sich aber auch noch Einschränkungen der Aussage insofern, als nicht untersucht werden konnte, wie sich die Fremdkörper in situ in einem Langzeitversuch verhalten. Immerhin wäre analog zu entsprechenden Infektproblemen beim Menschen ein Wiederaufflackern des Infektes nach Monaten möglich. Dennoch sprechen verschiedene Fakten dafür, daß tatsächlich eine Behandlungsmodalität entwickelt wurde, die gegenüber vorhandenen Mitteln eine höhere Wirksamkeit hat.

Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, daß eine Dosis- oder Intensitätssteigerung der systemischen antibiotischen Behandlung oder Prophylaxe nicht möglich ist, wobei die Depotpräparation auch bei Versagen der systemischen Therapie noch eine gute Wirksamkeit zeigte. Unterstützt werden die dargestellten Ergebnisse durch die Arbeit von Huh und Mitarbeitern (50), die die publizierte Präparation der multivesiculären Amikacin-Liposomen aufgriffen und damit das Einheilen kontaminierter Aortenprothesen in Kaninchen erreichten. Damit gehen zwei der ganz wenigen Untersuchungen, in denen es gelang, im Tierexperiment kontaminierte Fremdkörper zu sanieren, auf die gleiche Therapieform zurück.

Die bekannten Wirkungen eingeführter Produkte zur verzögerten Freisetzung von Antibiotika bei lokaler Infektbehandlung lassen auch in Abwesenheit einer prospektiv angelegten randomisierten Studie die Vermutung zu, das in der Klinik Infektprobleme vorkommen, die bei Versagen systemischer Therapie durch lokale Maßnahmen zu beherrschen sind, so daß die injizierbare Form eines solchen Präparates vorhandenen, wirksamen Methoden als eine neue zusätzliche Behandlungsform zur Seite gestellt werden kann. Schließlich ist die Situation eines massiv infizierten, jedoch in situ verbleibenden Fremdkörpers ein in der Klinik ungewöhnlich schweres Infektproblem. Die übliche Verfahrensweise würde eher im Débridement, dem Wechsel des Implantates und darauf folgender Behandlung bestehen. Wenn Depot-Amikacin auch ohne Wechsel des infizierten Fremdmaterials letztlich einen Erhalt des Implantates im Tierexperiment ermöglichte, so sind die dargestellten Ergebnisse so zu werten, daß das Präparat eine sinnvolle Ergänzung des vorhandenen Spektrums antiinfektöser Medikamente und Maßnahmen darstellt.

IV. Zusammenfassung

In Klinik und Praxis steht ein Arsenal von antiinfektiösen Medikamenten zur Verfügung, das in den meisten Situationen durch systemische Applikation ausreichende Wirkspiegel am Ort eines Infektes und somit eine wirkungsvolle Therapie ermöglicht. In Ausnahmefällen wie chronischen Infekten, womöglich in Verbindung mit Fremdkörpern, Narbenbildung, Infektresthöhlen und ähnlichen Behandlungerschwernissen, in denen die systemische Therapie nicht ausreichend wirksam ist, können lokal applizierte Präparationen von Vorteil sein. In dieser Form sind seit langem Gentamicin freisetzende Polymethylmethacrylat-Kugeln und Antibiotika-haltiges Kollagenvlies bewährt. Andere Träger wie Calciumhydroxylapatit, Fibrinkleber oder liposomale Verbindungen befinden sich in mehr oder weniger weit fortgeschrittenen Stadien der Entwicklung, die aber oft noch nicht die in vitro Versuche überschritten haben. Injizierbare Präparationen, wie sie auf Basis von Liposomen hergestellt werden könnten, haben auf Grund Ihrer Applikationsweise bestimmte Vorteile, jedoch wurden tierexperimentelle Erfolge bisher hauptsächlich bei intrazellulären Infektionen des RES beschrieben. Dies liegt unter anderem daran, daß die meist verwendeten kleinen unilamellären Liposomen, die zur Verkapselung wasserlöslicher Wirkstoffe verwendet werden, auf Grund ihrer Größe sowohl aus der Blutbahn als auch aus dem Gewebe durch Zellen des retikuloendothelialen Systems sehr schnell entfernt werden.

Mit sogenannten multivesiculären Liposomen, die ursprünglich von Kim und Mitarbeitern für die Behandlung mit Cytosin-Arabinosid, einem Cytostatikum entwickelt wurden, werden diese Nachteile insbesondere bei lokaler Applikation umgangen. Diese Partikel enthalten den Wirkstoff in sehr zahlreichen kleinen inneren Kammern eingeschlossen, aus denen er im Verlaufe der Arrosion von außen langsam freigesetzt wird.

Nach Vorversuchen mit 1 ml großen Präparationen von Gentamicin Partikeln wurde ein versatiles Mischsystem zur Herstellung Amikacin-haltiger

multivesiculärer Liposomen in unterschiedlichen Chargengrößen unter strikt reproduzierbaren Bedingungen entwickelt. Die Partikel enthalten neben 24 mg Amikacin pro ml Lösung Sucrose als Stabilisator. Die Lipidmembran besteht aus Triolein, Cholesterol, Dioleylecithin und Dipalmitoylphosphatidylcholin, die im molaren Verhältnis von 1: 1,3: 5,3: 8,5 in Chloroform gelöst eingesetzt wurden. Die fertigen Partikel messen ca. 13 μm im Durchmesser und können unter Kühlung in verschiedenen Medien aufbewahrt werden. Dabei zeigte sich, daß ionisierte Medien einen ungünstigen Einfluß auf die Stabilität der Partikel zu haben scheinen, während der Zusatz von Proteinen zur Lösung die Partikel stabilisiert. Es wurde gezeigt, daß Verträglichkeit mit klinisch üblichen Konzentrationen von Lokalanästhetika besteht und daß die Partikel ohne erkennbare Beschädigung durch eine Nadel der Größe 27 (Insulin) injiziert werden können.

Im Gewebe setzen die Partikel bei Untersuchungen an Mäusen die eingeschlossene Wirksubstanz über einen Zeitraum von ca. zehn Tagen im Sinne einer biexponentiellen Funktion frei. Im Vergleich zu freiem Amikacin, das am Injektionsort nach 5 Stunden nicht mehr nachweisbar war, aber entsprechend hohe Plasmaspiegel hervorrief, blieben die Plasmaspiegel nach Injektion von 1 mg der Depotsubstanz unter 1 μg . Mit Hilfe eines modifizierten Fluoreszenzassays konnten dabei die Spiegel bis in den Bereich von wenigen Nanogramm dokumentiert werden.

Die in vivo Wirksamkeit des Präparates wurde in einem Tiermodell einer Fremdkörperinfektion untersucht. Dabei wurde durch Vorversuche eine hochgradige Standardisierung des angewandten Verfahrens erzielt. In einer halboffenen Technik wurden Teflonschlauch-Segmente von 1 cm Länge Mäusen unter die Nackenhaut implantiert. drei Tage später erfolgte eine Kontamination der Implantate mit 10^7 Staphylokokken. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurde dann sowohl Depot-Amikacin als auch freies Amikacin zur Behandlung der damit gesetzten Fremdkörperinfektion eingesetzt. zehn Tage danach wurden die Tiere getötet, die Fremdkörper

steril geborgen und in Medium inkubiert. Das umgebende Gewebe wurde exzidiert und ebenfalls mikrobiologisch aufgearbeitet, so daß die im Gewebe vorhandenen Keimzahlen bestimmt werden konnten.

Nach Behandlung mit 1 mg der Depotsubstanz waren von 107 in verschiedenen Versuchsreihen eingesetzten Implantaten nur 24 infiziert. Im Gegensatz dazu scheiterte eine siebentägige Behandlung mit 1 mg freier Substanz pro Tag in allen Fällen. Nach Erhöhen der Menge freier Substanz auf die maximale Tagesdosis von 5 mg ergab sich eine Wirksamkeit in etwa der Hälfte der Fälle, wobei der Unterschied zwischen der Effektivität von 1mg Depotsubstanz und 5mg freier Substanz ein Signifikanzniveau von nur 0,13 ergab. Wurde andererseits die Dosierung des Depotpräparates auf 5mg erhöht, so ergab sich eine Wirksamkeit in sieben von acht Fällen bei siebenstündiger und in drei von sieben Fällen bei elfstündiger Verzögerung der Behandlung gegenüber der Kontamination. Nach einem 24 stündigen Intervall zwischen der Injektion der Bakteriensuspension und der antibiotischen Behandlung mit 10 mg der Depotsubstanz konnten noch sechs von zehn Fremdkörpern steril geborgen werden.

Die Gewebskeimzahlen wurden wegen der hohen Streuung der rohen Zahlen zwischen sterilen und infizierten Tieren innerhalb der Behandlungsgruppen logarithmiert und mit Hilfe des T-Testes verglichen. Dabei ergaben sich in allen Vergleichssituationen zwischen den mit Depot-Amikacin und den mit freier Substanz behandelten Tieren hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,005$).

In einem anderen experimentellen Ansatz wurde versucht, die Haut perforierende Katheter, analog der klinischen Situation von CAPD-Kathetern, Demers- oder Hickman-Kathetern durch Injektion des Depot-Präparates an die Haut-Perforationsstelle vor Infektion zu schützen. Gegenüber unbehandelten Kathetern war dabei eine Wirkung festzustellen, aber ein Vergleich zu systemisch behandelten Kontrolltieren ergab keinen wesentlichen Wirksamkeitsvorteil.

In einem dritten experimentellen Ansatz konnten Haut-Autotransplantate, die vor der Re-Implantation in eine Bakteriensuspension getaucht worden waren, durch Injektion von Depot Amikacin zum Teil vor der Etablierung des Infektes geschützt werden.

Es konnte somit gezeigt werden, daß die entwickelte Form eines liposomal verkapselten Antibiotikums mit verzögerter Wirkstofffreisetzung tierexperimentell unter verschiedenen Umständen eingesetzt werden kann und dabei der Wirkung freien Amikacins überlegen ist.

V. Literatur

1. Reding R. Stellenwert der Taurolin-Behandlung bei Sepsis. Chirurgische Gastroenterologie 10 (Suppl.2);1994:75-79.
2. Browne MK, Mac Kenzie AM, Doyle PJ. A controlled clinical trial of Taurolin in established bacterial peritonitis. Surg Gyn Obst 146;1978:721-724.
3. Krukowski ZH, Al-Sayer HM, Reid TMS, Matheson NA. Effect of topical and systemic antibiotics on bacterial growth kinesis in generalized peritonitis in man. Br J Surg 74;1987:303-306.
4. Pelosi E, Bar F, Battista S, Bello M, Bucchi MC, Alabiso O, Molino G, Bisi G. Hepatic arterial infusion chemotherapy for unresectable confined livermetastases: prediction of systemic toxicity with the application of a scintigraphic and pharmacokinetic approach. Cancer Chemother Pharmacol 44;1999:505-510.
5. Delaloye JF, Tran L, Leyvraz S, Bauer J, De Grandi P. Intraperitoneal carboplatin in advanced ovarian carcinoma. Gynäkol Geburtshilf Rundsch 33;1993:25-30.
6. www.fda.gov/cder/Warn/dec99/wl121599.pdf
7. Müller-Oerlinghausen B, Lasek R, Düppenberger H, Munter KH (Hrsg). Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Urban & Fischer, München 1999, S.52 ff.
8. Klemm KW. Antibiotic bead chains. Clin Orthop 295;1993:63-73.
9. Schmidt, HG. Anwendung und Erfahrungen mit Gentamicin-PMMA-Ketten bei 500 Osteitidfällen aus 7 Jahren. Aktuelle Probl Chir Orthop 31;1987:245-248.
10. Jerosch J, Lindner N, Fuchs S. Langfristige Therapieergebnisse der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis mit Gentamicin-PMMA-Ketten. Unfallchirurg 98;1995:338-343.
11. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin PMMA beads: 100 patients followed for 1 -12 years. Acta orthop Scand 69;1998:518-522.
12. Jenny G. Local antibiotic therapy using gentamicin-PMMA chains in post-traumatic bone infection. Short and long term results. Reconstr Surg Traumatol 20;1988:2036-2046.
13. Klemm K. Behandlung der posttraumatischen Osteomyelitis mit Antibiotika-haltigen Kunststoffkugeln. Symposium traumatologicum (cum participatione internationale), Brünn 14.-16.10.1974.
14. Ostermann PAW, Henry SL, Seligson D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. Clin Orth Rel Res 295;1993:102-111.
15. Asche G. Spül-Saug-Drainage oder Gentamicin PMMA-Kugeln in der Therapie infizierter Osteosynthesen. Eine retrospektive vergleichende Analyse. Unfallheilkunde 81;1978:463-468.
16. Nelson CL, Evans RP, Blaha JD, Calhoun J, Henry SL, Patzakis MJ. A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected

total hip and knee arthroplasty. Clin Orthop 295;1993:96-101.

17. Asche G. Behandlung einer Hohlhand und Sehnenscheiden-Phlegmone nach Aponeurektomie mit Gentamicin-PMMA-Miniketten. Handchir Mikrochir Plast Chir 16;1984:93-96.
18. Rosen HR, Marczell AP, Czerwenka E, Stierer MO, Spoula H, Wasl H. Local gentamicin application for perineal wound healing following abdominoperineal rectum excision. Am J Surg 162;1991:438-441.
19. Wahlig H, Dingeldein E, Bergmann R, Reuss K. Experimentelle und pharmakokinetische Untersuchungen mit Gentamicin-PMMA-Kugeln. Zbl Chirurgie 104;1979:923-933.
20. Walenkamp GHIM, Vree TB, Gueln PJM, Jongman-Nix B, Huygen PLM. Untersuchung auf Nebenwirkungen von Gentamicin nach Implantation von Gentamicin-haltigen PMMA in Form der Kugel-Ketten. Aktuelle Probl Chir Orthop 31;1987:254-256.
21. Hettfleisch J, Schottle H. Lokale Antibiotikaphylaxe bei der Marknagelung mittels Gentamicin-imprägnierter Biomaterialien. Aktuelle Traumatol 23;1993:68-71.
22. Leyh RG, Bartels C, Sievers HH. Adjuvant treatment of deep sternal wound infection with collagenous Gentamicin. Ann Thor Surg 68;1999:1648-1651.
23. Rutten HJ, Nijhuis PH. Prevention of wound infection in elective colorectal surgery by local application of a gentamicin-containing collagen sponge. Eur J Surg Suppl 587;1997:31-35.
24. Holdsworth J. Treatment of infective and potentially infective complications of vascular bypass grafting using gentamicin with collagen sponge. Annals R Coll Surg Engl 81;1999:166-170.
25. Horch R, Kronung G. Infektprophylaxe bei Teflonprothesen für den Dialysezugang. Erfahrungen mit einem resorbierbaren Kollagen-Antibiotikum-Verbundsystem. Vasa 18;1989:30-34.
26. Schweiger H, Lang W. Sulmycin Implant[®] als Infektionsprophylaxe bei Gefäßeingriffen. Angio 15;1993:223-226.
27. Guzman-Valdivia-Gomez G, Guerrero TS, Lluck MC, Delgado FJ. Effectiveness of collagen-gentamicin implant for treatment of dirty abdominal wounds. World J Surg 23;1999:126-127.
28. Fischer A. Kann die Rate von Problemwunden nach Anus praeter Rückverlegung durch die Implantation von gentamicinhaltigem Kollagenschwamm gesenkt werden? Zentralbl. Chir. 121 Suppl.;1996:75.
29. Vogel P, Lenz J. Die Behandlung des Sinus pilonidalis mittels Excision und Primärnaht unter Verwendung eines lokalen resorbierbaren Antibioticaträgers. Chirurg 63;1992:748-763.
30. Zink PM, Frank AM, Trappe AE. Prophylaxis of postoperative lumbar spondylodiscitis. Neurosurg Rev 12;1989:297-303.
31. Letsch R, Rosenthal E, Joka T. Local antibiotic administration in osteomyelitis treatment - a comparative study with two different carrier substances. Aktuelle Traumatol 23;1993:324-329.

32. Humphrey JS, Mehta S, Seaber A, Vail TP. Pharmacokinetics of a degradable drug delivery system in bone. *Clin Orthop and Rel Res.* 349;1998:218-224.
33. Mehta S, Humphrey JS, Schenkman DI, Seaber AV, Vail TP. Gentamicin distribution from a collagen carrier. *J Orthop Res.* 14;1996:749-754.
34. Jørgensen LG, Sørensen TS, Lorentzen JE. Clinical and pharmacokinetic evaluation of Gentamicin containing collagen in wound infections after vascular reconstruction. *Eur J Vasc Surg* 5;1991:87-91.
35. Focht J, Nösner K. Erregerhäufigkeit und Resistenzsituation bei Peritonitis 1996. *Langenbecks Arch Chir* 382 (Suppl. 1);1997:1-4.
36. Kresken M, Hafner D. Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in Central Europe during 1975-1995. Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Infection* 27 (suppl. 2);1999:2-8.
37. Moser A. Comparative human pharmacokinetics of two gentamicin containing collagen carriers. In: Walenkamp GHIM, Hrsg: *Biomaterials in Surgery*. Thieme, Stuttgart-New York; 1998:S.21-25.
38. Bang K, Sampram E, Funding M, Christensen TM, Baandrup U, Hjortdal VE. Gentacoll[®] hampers epithelialization on neovascularization in excisional wounds in hairless mice. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 32;1998:129-133.
39. Habib M, Onyilfor S, Obube NK, Owusu-Ababio G. Preparation and characterization of ofloxacin microspheres for the eradication of bone associated bacterial biofilm. *J Microencapsul* 16;1999:27-37.
40. Owusu-Ababio G, Rogers JA, Morck DW, Olson ME. Efficacy of sustained release ciprofloxacin microspheres against device-associated pseudomonas aeruginosa biofilm infection in a rabbit peritoneal model. *J Med Microbiol* 43;1995:368-376.
41. Atkins TW, Peacock SJ, Yates DJ. Incorporation and release of vancomycin from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Microencaps* 15;1998:31-44.
42. Mauduit J, Bukh N, Vert M. Gentamicin/poly(lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. II. The case of Gentamicin sulfate in high molecular weight poly(DL-lactic acid) and poly (L-lactic acid). *J contr Release* 23;1993:221-230.
43. Amaro-Martins VC, Goissis G. Nonstoichiometric hydroxyapatite-anionic collagen composite as support for the double sustained release of gentamicin and norfloxacin/ciprofloxacin. *Artif Organs* 24;2000:224-230.
44. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics [see comments] Comment in: *J Bone Joint Surg Br* 75;1993:334-335. *J Bone Joint Surg Br* 74;1992:600-604.
45. Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR. Efficacy of Gentamicin impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating

- osteomyelitis in a rat model. *J Orthoped Trauma* 13;1999:102-106.
46. Itokazu M, Yamamoto K, Yang WY, Aoki T, Kato N, Watanabe K. The sustained release of antibiotic from freeze-dried fibrin-antibiotic compound and efficacies in a rat model of osteomyelitis. *Infection* 25;1997:359-363.
 47. Park MS, Kim YB. Sustained release of antibiotic from a fibrin-gelatin-antibiotic mixture. *Laryngoscope* 107;1997:1378-1381.
 48. Juliano RL. Liposomes as drug carriers in the therapy of infectious diseases. In: Roerdink FHD, Kroon AM, eds: *Drug Carrier Systems*, John Wiley&Sons Ltd, 1989.
 49. Cabanes A, Reig F, Garcia-Anton JM, Arboix M. Evaluation of free and liposome-encapsulated Gentamicin for intramuscular sustained release in rabbits. *Res Vet Sci* 64;1998:213-217.
 50. Huh J, Chen JC, Furman GM, Malki C, King B, Kafie F, Wildon SE. Local treatment of prosthetic vascular graft infection with multivesicular liposome-encapsulated amikacin. *J Surg Res* 74;1998: 54-58.
 51. Price CI, Horton JW, Baxter CR. Topical liposomal delivery of antibiotics in soft tissue infection. *J Surg Res* 49;1990:174-178.
 52. Price CI, Horton JW, Baxter CR. Enhanced effectiveness of intraperitoneal antibiotics administered via a liposomal carrier. *Arch Surg* 124;1989:1411-1415.
 53. Fierer J, Hatlen L, Lin JP, Estrella D, Mihalko P, Yau-Young A. Successful treatment using gentamicin liposomes of *salmonella dublin* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 34;1990:343-348.
 54. Klemens SP, Cynamon MH, Swenson CE, Ginsberg RS. Liposome-encapsulated-gentamicin therapy of *mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrob Agents Chemother* 34;1990:967-970.
 55. Kwok CS, Wan C, Hendricks S, Bryers JD, Horbett TA, Ratner BD. Design of infection resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *J Control Release* 62;1999:289-299.
 56. Kwok CS; Horbett TA; Ratner BD. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers. II. Controlled release of antibiotics through a plasma-deposited thin film. *J Control Release* 62;1999:301-311.
 57. Benoit MA, Mousset B, Delloye C, Bouillet R, Gillard C. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *Int Orthop* 21;1997:403-408.
 58. Matsuda K, Suzuki S, Isshiki N, Yoshioka K, Okada T, Hyon SH, Ikada Y. A bilayer of "artificial skin" capable of sustained release of an antibiotic. *Br J Plast Surg* 44;1991:142-146.
 59. Sasmor MT, Morain WD, Balestrero LM., Camp BJ. Investigation of a biodegradable implantation antibiotic delivery system on rate of wound infection. *Ann Plastic Surg* 30;1993:525-530.

60. Cullis P. Liposomes as pharmaceuticals. In: Ostro M, ed.: Liposomes: From biophysics to therapeutics. Marcel Dekker, NY;1987:39-72.
61. Ostro MJ. Liposomes. *Sci Am* 256;1987:102-111.
62. Bonte F, Juliano RL. Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids* 40;1986:359-372.
63. Gregoriadis G, Kirby C, Senior J. Optimization of liposome behaviour in vivo. *Biol Cell* 47;1983:11-18.
64. Allen TM, Hansen C, Rutledge J. Liposomes with prolonged circulation times: Factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 98;1989:27-35.
65. Juliano RL. Microparticulate drug carriers. In: Robinson J and Lee V (eds): Sustained and controlled release drug delivery systems. Marcel Dekker, NY,1987.
66. Hwang C. Liposome pharmacokinetics. In: M. Ostro (ed.) Liposomes: From biophysics to therapeutics. Marcel Dekker, NY,1987.
67. Karlowsky JA, Zhanel GG. Concepts on the use of liposomal antimicrobial agents: Applications for aminoglycosides. *Clin Inf Dis* 15;1992:654-676.
68. Morgan JR, Williams KE, Davies RL, Leach K, Thomson M, Williams MAP. Localization of experimental staphylococcal abscesses by ^{99m}Tc-technetium-labelled liposomes. *J Med Microbiol* 14;1981:213-217.
69. Morgan JR, Williams LA, Howard CB. Technetium-labelled liposome imaging for deep-seated infection. *Br J Radiol* 58;1985:35-39.
70. Tümer A, Kirby C, Senior J, Gregoriadis G. Fate of cholesterol-rich liposomes after subcutaneous injection into rats. *Biochim Biophys Acta* 760;1983:119-125.
71. Kim S, Turker MS, Chi EY, Sela S, Martin GM. Preparation of multivesicular liposomes. *Biochim Biophys Acta* 728;1983:339-348.
72. Gerding DN, Larson TA. Aminoglycoside resistance of gramnegative bacilli during increased amikacin use. *Am. J. Med.* 79 (suppl.IA);1985:1-7.
73. Edson RS, Terrel CL. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc* 66;1991:1158-1164.
74. Sidi E, Hincky M, Langueville R. Cross-sensitization between Neomycin and streptomycin. *J Invest Dermatol* 30;1958:225-231.
75. Samsøen M, Metz R, Melchior E, Fossereau J. Cross-sensitivity between aminoglycoside antibiotics. *Contact Dermatitis* 6;1980:141.
76. Betts RF, Valenti WM, Chapman SW, Chonmaitrée T, Mowrer G, Pincus P, Messner M, Robertson R. Five-year surveillance of aminoglycoside usage in a university hospital. *Ann Int Med* 100;1984:219-222.
77. Lee JT. Three-year experience with amikacin sulfate as an exclusive surgical aminoglycoside in a large acute care hospital. *Am J Med*

- 79;1985:37-42.
78. Grayson LS, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Kim T, Kim S. Pharmacokinetics of DepoFoam gentamicin delivery system and effect on soft tissue infection. *J Surg Res* 55;1993:559-564.
 79. Lagaly G. *Dispersionen und Emulsionen: Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale*. Steinkopff, Darmstadt, 1997.
 80. Asche, H. *Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen*. Wiss. Verl. Ges., Stuttgart, 1984.
 81. Dillon CP, Rahoi DW, Tuthill AH. Stainless steel for bioprocessing, part 3: Corrosion phenomena. *Biopharm* 6;1992:40-44.
 82. Lund ME, Blazevik DJ, Matsen JM. Rapid Gentamicin bioassay using a multiple antibiotic resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 4;1973:569-573.
 83. Jolley ME, Stroupe CD, Wang CJ, Panas HN, Keegan CL, Schmidt RL, Schwenzer KS. Fluorescence polarization immunoassay I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. *Clin Chem* 27;1981:1190-1197.
 84. Kabakoff DS, Leung D, Singh P. An Emit[®] assay for Gentamicin. *Clin Chem* 24;1978:1055.
 85. Jolley ME, Wang CJ, Ekenberg SJ. Particle concentration fluorescence Immunoassay: A new rapid immunoassay technique with high sensitivity. *J Immunol Methods* 67;1984:21-35.
 86. Varma-Nelson P, Nelson JE, Belknap SM. Particle concentration fluorescence immunoassay for gentamicin. *Therapeut Drug Monit* 13;1991:160-162.
 87. Grayson L.S, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Kim T, Morgan JL, Roehrborn A, Kim S. Soft tissue infection prophylaxis with gentamicin encapsulated in multivesicular liposomes. *Crit Care Medicine* 23;1995:84-91.
 88. Joiner KA, Onderdonk AB, Gelfand JA, Bartlett JG, Gorbach SL. A quantitative model for subcutaneous abscess formation in mice. *Br J Exp Pathol* 1980;61:97-107.
 89. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley JH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226;1957:497-509.
 90. De Groot G, Wubs KI. A simple enzymatic digestion procedure of intact tissue samples in pharmacokinetic drug analysis. *J Analyt Toxicol* 11;1987:175-178.
 91. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 40;1983:407-410.
 92. Waldvogel FA, Vaudaux PE, Pittet D, Lew PD. Perioperative antibiotic prophylaxis of wound and foreign body infections: Microbial factors affecting efficacy. *Rev Inf Dis* 13 (suppl.10);1993:782-789.

93. Bergeron MG. Tissue Penetration of Antibiotics. Clin Biochem 19;1986:90-100.
94. Kunin C. Binding of antibiotics to tissue homogenates. J Inf Dis 121;1970:55-63.
95. Kumana C. Parenteral aminoglycoside therapy. Selection, administration and monitoring. Drugs 47;1994:902-913.
96. Zhanel GG, Karlowky JA, Hoban DJ, Davidson RJ. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of aminoglycosides against *pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing curve method and the postantibiotic effect. Chemotherapy 37;1991:114-121.
97. Price CI, Horton JW, Baxter CR. Liposome encapsulation: A method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. Surgery 115;1994:480-487.
98. Williams BD, O'Sullivan MM, Saggi GS, Williams KE, Williams LA, Morgan JR. Synovial accumulation of technetium labelled liposomes in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 46;1987:314-318.
99. Presant CA, Proffitt RT, Smith JD, Mc Kenna RJ. Evidence for solid tumor accumulation of intravenously administered injected lipid vesicles (LV) in patients. Proc Am Acad Cancer Res 27;1986:158.
100. Gregoriadis G. Use of monoclonal antibodies and liposomes to improve drug delivery. Present status and future implications. Drugs 24;1982:261-266.
101. Senior J, Gregoriadis G, Mitropoulos K. Stability and clearance of small unilamellar liposomes: Studies with normal and lipoprotein deficient mice. Biochim Biophys Acta 760;1993:111-118.
102. Bonventre PF, Gregoriadis G. Killing of intraphagocytic *staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped within liposomes. Antimicrob Agents Chemother 13;1978:1049-1051.
103. Fierer J, Hatlen L, LinJP, Estrella D, Mihalko P, Yau-Young A. Successful treatment using Gentamicin liposomes on salmonella dublin infections in mice. Antimicrob Agents Chemother 34;1990:343-8.
104. Kim S, Martin GM. Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. Biochim Biophys Acta 646;1981:1-9.
105. De Gier J, Mandersloot JS, Van Deenen LLM. Lipid composition and permeability of liposomes. Biochim Biophys Acta 860;1986:666-675.
106. Van Bambeke F, Mingeot-Leclerc MP, Schanck A, Brasseur R, Tulkens PM. Alterations in membrane permeability induced by aminoglycoside antibiotics: Studies on liposomes and cultured cells. Eur J Pharmacol-Molecular Pharmacology Section 247;1993:155-168.
107. Forge A, Zajic G, Davies S, Weiner N, Schacht J. Gentamicin alters membrane structures as shown by freeze-fracture of liposomes. Hearing Res 37;1989:129-140.
108. Kikuchi H, Carlsson A, Yachi K, Hirota S. Possibility of heat sterilization of liposomes. Chem Pharm Bull 39;1991:1018-1022.

109. Kim S, Kim DJ, Geyer M, Howell SB. Multivesicular liposomes containing 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine for slow-release intrathecal therapy. *Canc Res* 47;1987:3935-3937.
110. Kim S, Howell B. Multivesicular liposomes containing cytarabine entrapped in the presence of hydrochloric acid for intracavitary chemotherapy. *Cancer treatment reports* 71;1987:705-711.
111. Lunte CE, Scott DO, Kissinger PT. Sampling living systems using microdialysis probes. *Analytical Chemistry* 63;1991:773-779.
112. Darling L, Talbot RB. Amiglyde-V (Amikacinsulfat), p. 611-612 in : *Veterinary Pharmaceuticals and Biologicals, Veterinary Medicine Publishing Company, Lenexa, KS; 1993.*
113. Cabana BE, Taggart JG. Comparative Pharmacokinetics of BB-K8 and Kanamycin in dogs and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 3;1973:478-483.
114. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 50;1966:219-244.
115. Sugarman B, Youg EJ. Infections associated with prosthetic devices: Magnitude of the problem. *Inf Dis Clin North Am* 3;1989:187-258.
116. James RC, MacLeod CJ. Induction of staphylococcal infections in mice with small inocula introduced on sutures. *Brit J Exper Path* 42;1961:266-277.
117. Edlich RF, Panek PH, Rodeheaver GT, Turnbull VG, Kurtz LD, Edgerton MT. Physical and Chemical configuration of sutures in the development of surgical infection. *Ann Surg* 177;1973:679-687.
118. Elek SD, Conen PE. The Virulence of *staphylococcus pyogenes* for man. Study of the problems of wound infection. *Br J Exp Pathol* 38;1957:573.
119. Zimmerli W, Zak O, Vosbeck K. Experimental hematogenous infection of subcutaneously implanted foreign bodies. *Scand J Inf Dis* 17;1985:303-310.
120. Zimmerli W, Waldvogel F, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: Description and Characteristics of an animal model. *J Inf Dis* 146;1982:487-497.
121. Bouchenaki N, Vaudaux PE, Huggler E, Waldvogel FA, Lew DP. Successful single-dose prophylaxis of staphylococcus aureus foreign body infections in Guinea pigs by Fleroxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 34;1990:21-24.
122. Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 34;1990:2312-2317.
123. Gallimore B, Gagnon RF, Subang R, Richards GK. Natural history of chronic *staphylococcus epidermidis* foreign body infection in a mouse model. *J Inf Dis* 164;1990:1220-1223.
124. Espersen F, Frimodt-Møller N, Corneliussen L, Thamdrup Rosdahl V, Skinhøj P. Experimental foreign body infection in mice. *J Antimicrob*

Chemother 31 (Suppl. D),1993:103-111.

125. Citak MS, Cue JI, Peyton JC, Malangony MA. The critical relationship of antibiotic dose and bacterial contamination in experimental infection. *J Surg Res* 52;1992:127-130.
126. Classen DC, Evans RS, Pestotnik SL, Horn SD, Menlove RL, Burke JP. The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical wound infection. *N Engl J Med* 326;1992:281-286.
127. Tulkens PM. Pharmacokinetic and toxicologic evaluation of a once daily regimen versus conventional schedules of netilmicin and amikacin. *J Antimicrob Chemother* 27 (Suppl.C);1991:49-61.
128. Bailey TC A meta analysis of extended-interval dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 24;1997:786-95.
129. Gerber AU, Greter U, Segessenmann C, Kozak S. The impact of the pre-treatment interval on antimicrobial efficacy in a biological model. *J Antimicrob Chemother* 31 (suppl.D);1993:29-40.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Mithilfe und Unterstützung zahlreicher Kollegen und Mentoren möglich gewesen.

Insbesondere danke ich Herrn **Prof. Dr. H.D. Röher**, der meine wissenschaftlichen Arbeiten in den USA großzügig förderte und mir nach dem Auslandsaufenthalt die Wiedereingliederung in die Klinik ermöglichte.

Prof. Dr. J. Hansbrough, der Direktor der Verbrennungsabteilung der Chirurgischen Klinik an der University of California, San Diego, stellte den Arbeitsplatz in seinen Laboratorien bereit und verschaffte mir den Zugang zur Tierversuchsanlage der Universität. Er unterstützte mich mit zahlreichen Ratschlägen, bei der Abfassung von Publikationen und vermittelte die finanzielle Sicherung des Projektes, wofür ich ihm in hohem Maße dankbar bin.

Dr. Sankaram Matripraganda und **Dr. Randall Willis** (DepoTech Corp., La Jolla, CA, USA) waren als Mitglieder der Arbeitsgruppe besonders hilfreich bei der Erörterung physikochemischer Probleme der multivesiculären Liposomen und stellten mir die Ergebnisse ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Verfügung.

Ms. Beth Gualdoni und **Ms. Kathy Albright** (DepoTech Corp., La Jolla, CA, USA) unterstützten mich bei der Durchführung der Tierversuche und den Laboruntersuchungen.

Prof. Dr. P.E. Goretzki danke ich für zahlreiche Ratschläge bei der Abfassung des Manuskripts.