Entwicklung einer antibakteriell beschichteten Harnleiterschiene

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elvira Belz

aus Frankfurt am Main

Marburg an der Lahn 2009

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 25.01.2010

angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. C. Culmsee

Tag der mündlichen Prüfung am 26.01.2010

Ich danke…

… Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit über ein Thema anzufertigen, bei dem man nicht lange nach dem möglichen praktischen Nutzen suchen muss, und auch für das Vertrauen, das er dabei in mich gesetzt hat.

… Herrn Prof. Dr. Carsten Culmsee dafür, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

… Frau Prof. Dr. Maike Petersen und Herrn Prof. Dr. Klaus Kuschinsky dafür, dass sie die Aufgaben der Nebenfachprüfer übernommen haben.

… den Projektpartnern Frau Dr. Lisa Kleinen, Frau Dr. Karin Schenk, Herrn Dr. Heinz Busch, Herrn Dr. Norbert Laube und Herrn Dr. Wolfhard Pinkowski für die gute Zusammenarbeit, die vielen Anregungen, sowie für das Bereitstellen von Probenmaterial.

… zunächst einmal der ganzen Arbeitsgruppe für das gute Betriebsklima, Anregungen, Hilfsbereitschaft und viele schöne Stunden.

… innerhalb der Arbeitsgruppe noch einmal ausdrücklich Fernanda für ihre administrative Unterstützung und ihre gute Laune.

… Benjamin, Catharina, Holger, Lothar und Saikat für ihre Freundschaft, ihre (nicht immer erbetenen) guten Ratschläge, und dafür, dass sie mein „zweites Studium“ in Marburg zu so einer schönen Zeit gemacht haben.

… meiner Familie für all die Unterstützung und Liebe in den vergangenen fast drei Jahrzehnten.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Harnleiterschienen ... 1
1.1.1 Anatomie und Physiologie der Harnleiter ... 1
1.1.2 Harnleiterschienen: Material und Indikationen ... 2
1.1.3 Probleme im Zusammenhang mit Harnleiterschienen ... 4
1.1.3.1 Mechanismus der Biofilmbildung ... 5
1.1.3.2 Bildung von Harnsteinen ... 7
1.1.4 Ansätze zum Lösen der Biofilm-Problematik ... 8
1.1.4.1 Beschichtung der Harnleiterschienen mit amorphem Kohlenstoff ... 12
1.1.4.2 Immobilisierung eines antibakteriellen Wirkstoffes auf oder in der Harnleiterschiene ... 14
1.1.4.2.1 In Frage kommende Wirkstoffe ... 14
1.1.4.2.1.1 Benzalkoniumchlorid ... 15
1.1.4.2.1.2 Cetylpyridiniumchlorid ... 16
1.1.4.2.1.3 Ethacridinlactat ... 17
1.1.4.2.2 Immobilisierung des Wirkstoffes auf der Oberfläche durch ein Spacer-Molekül ... 18
1.1.4.2.3 Inkorporieren des Wirkstoffes in die Polymermatrix ... 19
1.2 Theoretische Hintergründe der verwendeten Messmethoden ... 20
1.2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) ... 20
1.2.2 Spektralphaseninterferenz (SPI) ... 26
1.3 Zielsetzung der Arbeit ... 28
2 Material und Methoden ... 29
2.1 Material ... 29
2.1.1 Chemikalien ... 29
2.1.2 Lösungen und Puffer ... 31
2.1.3 Geräte und Materialien ... 34
2.2 Methoden ... 36
2.2.1 Wirkstoffimmobilisierung ... 36
2.2.1.1 Wirkstoffimmobilisierung auf Messchips über ein Spacer-Molekül ... 36
2.2.1.1.1 Erzeugung einer Carboxyloberfläche auf den Messchips für SPI und RIfS ... 36
2.2.1.1.1.1 Messung am Spektralphaseninterferometer ... 38
2.2.1.1.1.2 Messung am Reflektometrischen Interferenzspektrometer ... 39
2.2.1.1.2 Vorbereitung einer C_{18}-Oberfläche auf SPI-Messchips für Kontrollversuche ... 40
2.2.1.1.3 Wirkstoffeinbringung in eine Polyurethanschicht auf einem SPI-Messchip ... 41
2.2.1.1.4 Kontrolle des Erfolgs der Carboxylbeschichtung bei den RIfS-Chips ... 41
2.2.1.2 Wirkstoffeinbringung in die Polyurethanmatrix der Schläuche ... 44
2.2.1.2.1 Charakterisierung der gelieferten wirkstofffreien Schläuche ... 44
2.2.1.2.2 Behandlung der Schläuche zur Wirkstoffeinbringung ... 44
2.2.2 Freisetzungsversuche ... 47
2.2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie ... 47
2.2.2.2 Fluoreszenzspektroskopie ... 48
2.2.3 Agar-Diffusionstest ... 52
2.2.4 Versuch zur Bakterienadhäsion auf der Basis eines Spülversuchs ... 54

3 Ergebnisse 59
3.1 Messungen mit Spektralphaseninterferenz (SPI) 59
3.1.1 Messung der Bindung verschiedener Arzneistoffe an eine carboxylierte Oberfläche 59
3.1.2 Kontrollversuche 63
3.1.2.1 Kontrollversuch: Bindung der tensidischen Substanzen an eine hydrophobe Oberfläche 64
3.1.2.2 Kontrollversuch: Bindung einer anderen tensidischen Substanz an eine carboxylierte Oberfläche 66
3.1.2.3 Kontrollversuch: Bindung der Substanzen an Glas 67
3.1.3 Messung der Bindung verschiedener Arzneistoffe in unterschiedlicher Konzentration an eine Polyurethan-Oberfläche 68
3.1.3.1 Ermitteln einer geeigneten Polyurethan-Konzentration für die Beschichtung der Glasträger 68
3.1.3.2 Bindung von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an Polyurethan 70
3.1.3.3 Ermitteln eines geeigneten Volumens zum Spincoating 71
3.1.3.4 Bindung von Ethacridinlactat-Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Polyurethan 72
3.1.4 Bindung von Ethacridinlactat an eine aminofunktionalisierte amorphe Kohlenstoff-Beschichtung 74
3.2 Messungen mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) 76
3.2.1 Messung der Bindung von verschiedenen Wirkstoffen an eine carboxylierte Oberfläche 76
3.2.1.1 Messung der Bindung von Ethacridinlactat 77
3.2.1.2 Messung der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid 78
3.2.1.3 Vergleich der Bindungskurven von Ethacridinlactat und Cetylpyridiniumchlorid 80
3.2.1.4 Kontrollversuch: Erfolg der Carboxylbeschichtung auf RIfS-Chips 81
3.3 Untersuchung der Freisetzungskinetik 82
3.3.1 Ermitteln der geeigneten Quell- und Spültechnik 82
3.3.1.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen 87
3.3.1.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen 89
3.3.1.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen 93
3.3.1.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen 95
3.3.1.5 Freisetzung aus in Toluol gequollenen Schläuchen 96
3.3.1.6 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen 98
3.3.1.7 Vergleich der Lösungsmittel miteinander 100
3.3.2 Einfluss des Trocknens vor dem Spülen 104
3.3.2.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen 104
3.3.2.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen 107
3.3.2.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen 109
3.3.2.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen 111
3.3.2.5 Freisetzung aus in Toluol gequollenen Schläuchen 113
3.3.2.6 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen 115
3.3.2.7 Zusammenfassung 117
3.3.3 Vergleich der Plasmabeschichtungen 118
3.3.3.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen 118
3.3.3.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen 120
3.3.3.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen 122
3.3.3.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen 124

3.3.3.5 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen 126
3.3.3.6 Vergleich aller fünf Lösungsmittel 128
3.3.4 Vergleich der Plasmabeschichtungen in einer Freisetzung über 7 Tage 132
3.3.4.1 Freisetzung über 7 Tage aus in Aceton gequollenen Schläuchen 132
3.3.4.2 Freisetzung über 7 Tage aus in Dioxan gequollenen Schläuchen 135
3.3.4.3 Freisetzung über 7 Tage aus in Ethanol gequollenen Schläuchen 137
3.3.4.4 Freisetzung über 7 Tage aus in Methanol gequollenen Schläuchen 139
3.3.4.5 Freisetzung über 7 Tage aus in Wasser gequollenen Schläuchen 141
3.3.4.6 Vergleich der fünf Lösungsmittel 143
3.3.5 Wechsel auf Fluorimetrie 145
3.3.5.1 Versuchswiederholung zur Etablierung der Methode 145
3.3.5.1.1 Vergleich der Beschichtungen für in Aceton gequollene Schläuche ... 147
3.3.5.1.2 Vergleich der Beschichtungen für in Dioxan gequollene Schläuche ... 153
3.3.5.1.3 Vergleich der Beschichtungen für in Ethanol gequollene Schläuche .. 158
3.3.5.1.4 Vergleich der Beschichtungen für in Methanol gequollene Schläuche 162
3.3.5.1.5 Vergleich der Beschichtungen für in Wasser gequollene Schläuche ... 167
3.3.5.1.6 Vergleich der Lösungsmittel 171
3.3.5.2 Wiederholung der Freisetzung über 7 Tage 176
3.3.5.2.1 Freisetzung über 7 Tage aus in Aceton gequollenen Schläuchen 177
3.3.5.2.2 Freisetzung über 7 Tage aus in Dioxan gequollenen Schläuchen 179
3.3.5.2.3 Freisetzung über 7 Tage aus in Ethanol gequollenen Schläuchen 181
3.3.5.2.4 Freisetzung über 7 Tage aus in Methanol gequollenen Schläuchen 183
3.3.5.2.5 Freisetzung über 7 Tage aus in Wasser gequollenen Schläuchen 185
3.3.5.2.6 Vergleich der fünf Lösungsmittel 187
3.3.5.3 Langzeitfreisetzung über 6 Monate 190
3.3.5.4 Veränderung der Freisetzung bei gealterten Schläuchen 193
3.3.5.5 Einfluss von UV-Licht auf die Freisetzung 197
3.3.5.6 Einfluss des Sterilisierens auf die Freisetzung 199
3.3.5.7 Einfluss des Freisetzungsmediums auf die Freisetzung 200
3.4 Mikrobiologische Untersuchungen 202
3.4.1 Agardiffusionstest 202
3.4.1.1 Klassischer Agardiffusionstest mit Filterpapier 202
3.4.1.2 Modifizierter Agardiffusionstest mit Schläuchen 206
3.4.1.2.1 Agardiffusionstest mit in Aceton gequollenen Schläuchen 207
3.4.1.2.2 Agardiffusionstest mit in Dioxan gequollenen Schläuchen 208
3.4.1.2.3 Agardiffusionstest mit in Ethanol gequollenen Schläuchen 209
3.4.1.2.4 Agardiffusionstest mit in Methanol gequollenen Schläuchen 210
3.4.1.2.5 Agardiffusionstest mit in Wasser gequollenen Schläuchen 211
3.4.1.2.6 Zusammenfassung 211
3.4.2 Nachweis der Wirksamkeit der Wirkstoffeinbringung durch Quellen 213
3.4.3 Einfluss des Sterilisierens auf die antibakterielle Wirksamkeit 218
3.4.4 Vergleich der sterilisierten und unsterilisierten Schläuchen gleichen Alters am Beispiel der DLC-NH3-Beschichtung 224
3.4.5 Vergleich der Wirkstoff-Immobilisierungsmethoden 226
3.4.6 Vergleich der Beschichtungen hinsichtlich antibakterieller Wirkung 232
3.4.6.1 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstofffreien Schläuchen 232
3.4.6.2 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstoffhaltigen Schläuchen 234
3.4.6.3 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstoffhaltigen, sterilisierten Schläuchen 236
3.4.7 Vergleich der drei Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat 238

3.4.8 Antibakterielle Wirksamkeit der wirkstoffhaltigen Schläuche nach 6 Monaten Freisetzung 241
4 Diskussion 244
4.1 Modellversuche zur Simulation der Bindung von Wirkstoffen an verschiedene Oberflächen 244
4.2 Freisetzungsversuche: Erarbeiten einer geeigneten Technik 254
4.3 Vergleich von verschiedenen Beschichtungen (Freisetzungsversuche und mikrobiologische Untersuchungen) 265
4.4 Mikrobiologische Experimente zum Nachweis der Wirksamkeit der entwickelten Modifizierung der Proben 269
5 Schlussfolgerung und Ausblick 275
6 Zusammenfassung 278
7 Literaturverzeichnis 280

Abkürzungsverzeichnis

*	signifikanter Unterschied
***	hochsignifikanter Unterschied
°C	Grad Celsius
6N	6 Normal (6 mol OH^- oder H^+ freisetzend)
a:CH	amorpher Kohlenstoff
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AU	Arbitrary Units (willkürliche Einheiten)
bzw.	beziehungsweise
C_{18}	Kette aus 18 Kohlenstoff-Atomen
ca.	circa
CCD	Charge-Coupled Device
cm	Zentimeter
CMC	Critical Micelle Concentration (Kritische Mizellbildungskonzentration)
d.h.	das heißt
DLC	Diamond Like Carbon
DLC2	DLC unfunktionalisiert
DLC-F	DLC mit Fluor
DLC-K	DLC unfunktionalisiert
DLC-NH3	DLC mit Ammoniak
DLC-O	DLC mit Sauerstoff
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EL	Ethacridinlactat
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-LC)
IU	Interference Units (willkürliche Einheit bei RIfS)

L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
µbar	Mikrobar
µg/mL	Mikrogramm pro Milliliter
µL	Mikroliter
µL/min	Mikroliter pro Minute
µm	Mikrometer
µs	Mikrosekunde
M	molar = mol pro Liter
min	Minute
mg	Milligramm
mg/mL	Milligramm pro Milliliter
mL	Milliliter
mL/min	Milliliter pro Minute
mm	Millimeter
n	Anzahl der Messungen
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NTTF	New Technologies in Thin Films
π	Pi
p	(Irrtums-)Wahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi (für Analysezwecke)
PBS	Phosphor Buffered Saline (Phosphatpuffer mit Salz)
PEVCD	Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
PU	Polyurethan
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rps	rotations per second (Umdrehungen pro Sekunde)

RU	Refraction Units (willkürliche Einheit)
s	Sekunde
s.	siehe
SiO_2	Siliciumdioxid
s.o.	siehe oben
SPI	Spektralphaseninterferenz
s.u.	siehe unten
TPE	Thermoplastisches Elastomer
UV	Ultraviolett
u.a.	unter anderem
US-$	United States Dollar
UV/Vis	Ultraviolett/Visible (ein Wellenlängenbereich des Lichts)
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
w	Woche
WS	Wirkstoff
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Harnleiterschienen

1.1.1 Anatomie und Physiologie der Harnleiter

Die beiden Harnleiter verbinden jeweils eine Niere mit der Harnblase. Sie treten wie die *Arteria renalis* und die *Vena renalis* an der Vertiefung der Konkavität aus der Niere aus (Nierenbecken) und verlaufen retroperitoneal hinter dem Bauchfell zum kleinen Becken und treten von hinten in die Harnblase ein. Um einen Reflux zu vermeiden, sind an der Eintrittsstelle der Harnleiter in die Harnblase Schleimhautklappen vorhanden.

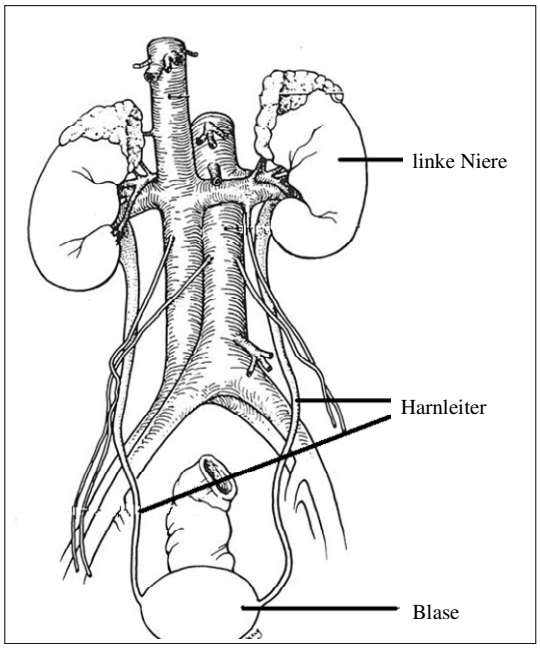


Abbildung 1: Anatomie der Niere und der ableitenden Harnwege [www.ic.sunysb.edu]

Das Innere der Harnleiter ist mit Übergangsepithel ausgekleidet, einem Gewebe, das nur in den ableitenden Harnwegen vorkommt. Es handelt sich um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel, das sich an unterschiedliche Dehnungsverhältnisse anpassen kann. Bei Füllung des Organs verringert sich die Zahl der Zellreihen, beim leeren Organ erhöht sie sich.

Außen ist der Harnleiter mit drei Muskelschichten umkleidet: die innere und äußere Schicht besteht aus longitudinalen Muskelfasern, dazwischen befindet sich eine Schicht zirkulärer Muskelfasern. Die Muskulatur sorgt für den peristaltischen Transport des Harns zur Harnblase. Die Frequenz schwankt je nach Füllungsgrad zwischen 0,5 und 5 Kontraktionen pro Minute [Thews et al., 1999].

1.1.2 Harnleiterschienen: Material und Indikationen

Über die erste erfolgreiche Implantation einer Harnleiterschiene aus Silikon wurde 1969 von Zimskind et al. berichtet [Denstedt et al., 2000].

In den 70er Jahren arbeitete man zunächst weiter mit Harnleiterschienen aus Silikon; später wurden dann auch Materialien wie Polyethylen, Polyurethan, Hydrogel, C-Flex-TPE (thermoplastisches Elastomer) und Percuflex auf ihre Biokompatibilität getestet [Roemer, 2000]. Mit der Zeit bilden sich jedoch auf allen Materialien Biofilme oder Salzinkrustationen, teilweise kommt es auch zu symptomatischen Infektionen.

Die heute gebräuchliche Form der Harnleiterschienen ist der so genannte Double-J- oder Pigtail-Stent, der 1978 entwickelt wurde [Denstedt et al., 2000]. Durch die eingerollten Enden, die an das Ringelschwänzchen eines Schweins erinnern, findet der Katheter in der Niere und der Blase Halt und verrutscht nicht bei Bewegungen des Patienten. Die versetzt angebrachten Löcher an den Seiten verbessern den Durchfluss von Urin. Wie auch bei den Blasenkathetern gibt es bei den Harnleiterschienen Modelle unterschiedlicher Länge und verschiedener Durchmesser, die je nach Anatomie des Patienten verwendet werden [Auge und Preminger, 2002].

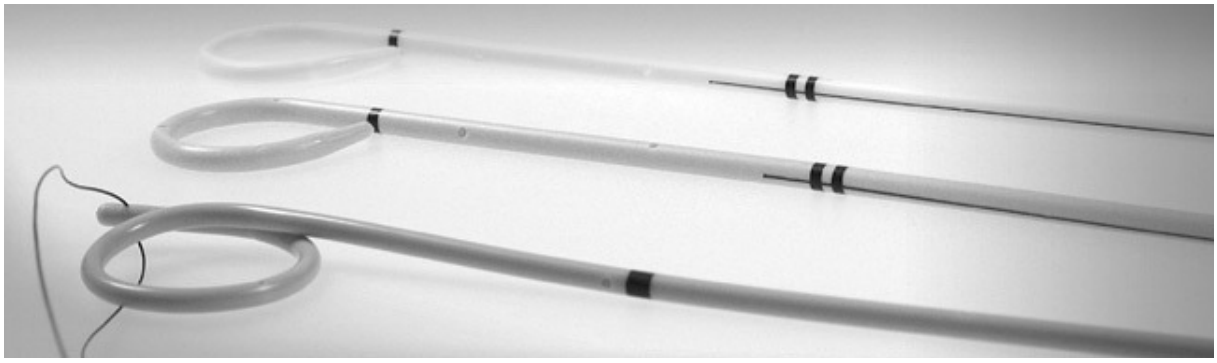


Abbildung 2: Double-J-Harnleiterschienen [www.urotech.info]: Beide Seiten des Stents werden eingerollt, damit der Katheter in der Niere und in der Blase Halt findet. Wegen der Form nennt man diesen Katheter auch Pigtail. Die Löcher an den Seiten verbessern die Fließeigenschaften des Urins durch den Stent. Die Markierungen erleichtern die korrekte Positionierung; der Faden im vorne liegenden Stent ist blasenseitig angebracht und dient zur Entfernung der Harnleiterschiene.

Harnleiterschienen finden sowohl prophylaktische als auch therapeutische Verwendung.

Bei Obstruktionen der ableitenden Harnwege z.B. durch Harnsteine muss der Urin abgeleitet werden, insbesondere, wenn zusätzlich eine Infektion vorliegt, sonst kann es zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie einer Pyelonephritis oder einer Sepsis kommen. Außer durch das Legen einer Harnleiterschiene kann dieses Ziel auch durch perkutane Nephrostomie (s.u.) erreicht werden [Pearle et al., 1998].

Harnleiterschienen begünstigen durch sanftes Ausdehnen des Harnleiters auch die spontane Ausscheidung von Harnsteinen, wenn der Durchmesser der Steine nicht größer als 10 mm ist [Leventhal et al., 1995].

Auch in Kombination mit der Schockwellenlithotripsie (Zertrümmern von Steinen durch Schockwellen) werden häufig Harnleiterstents implantiert, allerdings nicht in allen Fällen. Je größer die Steine sind, desto eher wird die Harnleiterschiene schon vor der Lithotripsie gelegt, weil bei größeren Steinen das Risiko für Komplikationen wie Entzündungsreaktionen, Ödeme oder die so genannte „Steinstraße“ höher ist. Bei kleinen Steinen (unter 20 mm) treten häufig auch ohne die Schiene keine Probleme auf, so dass hier meist auf einen prophylaktischen Eingriff verzichtet wird. Nach der Lithotripsie werden bei solchen Patienten Harnleiterschienen gelegt, bei denen Ödeme aufgetreten sind, die Anzeichen eines Traumas oder einer ballonartigen Aufweitung des Harnleiters mit der Gefahr des Reißens desselben zeigen, sowie bei Patienten mit einer hohen Steinlast. Insgesamt erhalten etwa 65% der ureteroskopisch behandelten Patienten die Implantate [Auge und Preminger, 2002].

Die Endopyelotomie wird bei Obstruktionen am Nierenbecken angewendet. Das Nierenbecken ist die Stelle, an der der Harnleiter aus der Niere austritt. Der Harnleiter besitzt dort eine Trichterform, ist also besonders breit. Steine, die dort aufgehalten werden, können keinesfalls den wesentlich schmaleren Harnleiter passieren. Der Harnleiter muss in einem solchen Fall aufgeschnitten werden. Das hierfür verwendete Verfahren ist die Endopyelotomie, die erstmals 1983 beschrieben wurde [Wickham und Kellett, 1983]. Die Harnleiterschiene wird von außen durch die Niere in den Harnleiter eingeführt und dient als Drainage nach der Operation. Außerdem fördert er die Heilung des aufgeschnittenen Harnleiters, da er das Risiko für Harnleiterrupturen durch seine Stützfunktion vermindert. Savage und Streem beschreiben eine modifizierte Methode, bei der die Harnleiterschiene bereits vor der Operation gelegt und so auch als Schneidehilfe genutzt wird. Außerdem muss man dann die Harnleiterschiene nicht durch gereiztes und angeschnittenes Gewebe führen und vermindert so das Risiko des Auseinanderreißens des Harnleiters bei dieser Prozedur [Savage und Streem, 2000]. Bei den bisher beschriebenen Methoden erfolgt die Operation durch perkutane Nephrostomie, eine antegrade Methode, bei der man sich von der Nierenseite an die Obstruktion herantastet. Giddens und Grasso beschreiben eine retrograde Methode, bei der man sich der Obstruktion von der Blasenseite durch den Harnleiter nähert [Giddens und Grasso, 2000].

Sämtliche Tumore im Beckenbereich können ebenfalls Obstruktionen des Harnleiters hervorrufen, also Tumore der Prostata, der Blase, des Gebärmutterhalses und der Gebärmutter, sowie solche an den Eierstöcken und kolorektale Karzinome. Die Obstruktion kann durch Einwachsen des Tumors in den Harnleiter zustande kommen, aber auch durch Metastasenbildung oder einfach durch den Druck, den das wuchernde Gewebe aufgrund seiner Größe auf das umliegende Gewebe ausübt [Auge und Preminger, 2002]. Man begegnet den Kompressionen mit dem Legen von Harnleiterschienen entweder durch die Blase oder von außen (perkutane Nephrostomie). Die perkutane Nephrostomie kann, muss aber nicht mit der Implantierung einer Harnleiterschiene kombiniert werden [Donat und Russo, 1996]. Bei Stents, die für Krebspatienten vorgesehen sind, fehlen übrigens die seitlichen Löcher im Schaft des Harnleiters, damit der Tumor nicht durch diese in den Stent einwachsen kann [www.urotech.info].

1.1.3 Probleme im Zusammenhang mit Harnleiterschienen

Zunächst einmal sind an dieser Stelle die Probleme zu nennen, die dem Fremdkörpergefühl und dem operativen Eingriff zusammenhängen. Hierzu zählen v.a. die Symptome, die mit der Miktion zu tun haben, aber auch Blasenschmerzen, postoperative Seitenschmerzen, sowie allgemeine Schmerzen. Der Mechanismus der Entstehung der Seitenschmerzen, die innerhalb von 72 Stunden nach der Operation auftreten, ist noch nicht geklärt. Vermutlich werden sie jedoch von mehreren, kombiniert auftretenden Faktoren hervorgerufen. Faktoren, die als Verursacher in Frage kommen, sind die Extravasation von Flüssigkeit, sowie Veränderungen des Urinsammelsystems und distale ureterale Ödeme mit der Folge von temporären Obstruktionen. Diese Gründe sind ausreichend, um von einer Anwendung von Harnleiterschienen in unkomplizierten Fällen abzuraten [Borboroglu et al., 2001].

Ein ebenfalls häufig auftretendes Problem (bei 1 bis 4,2% der Stentträger) ist die Stentmigration. Der Stent soll im Normalfall durch die Pigtails in Niere und Blase so verankert werden, dass er nicht verrutscht. Wird jedoch ein zu kurzer Stent ausgewählt, so kann sich der Pigtail nicht komplett einrollen, wodurch die Fixierung instabil ist. Es wird empfohlen, die Länge des Harnleiters vor der Implantation durch eine Röntgenuntersuchung zu bestimmen. Ansonsten gibt es gewisse Zusammenhänge zwischen der Körpergröße und der Ureterlänge, die als Faustformel herangezogen werden können. Außerdem ist der linke Harnleiter im Allgemeinen etwas länger als der rechte (vgl. Abbildung 1). Die Korrelationen sind aber leider nicht evident. Die Möglichkeit, sicherheitshalber einfach immer längere

Ureterschienen zu verwenden, scheidet ebenfalls aus, da zu lange Implantate Blasenirritationen hervorrufen können [Breau und Norman, 2001].

Eine sehr häufige und problematische Komplikation ist das Verkrusten von Kathetern und Harnleiterschienen mit Salzen und Bakterien, die so genannte Biofilmbildung. Aufgrund der zentralen Bedeutung für die Thematik dieser Doktorarbeit wird ihr ein eigenes Kapitel gewidmet.

1.1.3.1 Mechanismus der Biofilmbildung

Unter Biofilmbildung versteht man die Ausbildung einer aus Bakterien, Salzkristallen und bakteriellen Polysacchariden bestehenden Schicht auf Biomaterialien, also z.B. auf Harnleiterschienen. Die Entstehung des Biofilms kann man sich in acht Schritte gegliedert vorstellen:

Zuerst werden Proteine an die Oberfläche des Biomaterials adsorbiert.

Anschließend bildet sich auf der Oberfläche ein organischer Konditionierungsfilm aus.

Im Anschluss erfolgt eine initiale bakterielle Annäherung und Anlagerung. Diese kann noch reversibel sein.

Ist die Bakterienanlagerung jedoch nicht reversibel, so kommt es zum Bakterienwachstum und Kolonisierung in Kombination mit der eigentlichen Biofilmbildung, nämlich dem Ausscheiden von Polysacchariden durch die Bakterien. Dieser Prozess ist irreversibel. Der Polysaccharidfilm schützt die Bakterien vor praktisch allen Angriffen des Immunsystems sowie vor Antibiotika, so dass der einmal entstandene Biofilm praktisch nicht mehr zu entfernen ist.

Der pH-Wert des Urins und des Biofilms wird erhöht. Bei *Proteus mirabilis* erfolgt dies durch das Enzym Urease. Allerdings ist *Proteus mirabilis* eher bei der Verkrustung von Blasenkathetern ein Problemkeim, bei der Besiedelung von Harnleiterschienen spielt *Escherichia coli* eine größere Rolle.

Durch die pH-Wert-Verschiebung werden verstärkt Calcium- und Magnesium-Ionen in den Biofilm eingelagert.

Calcium wird in Form von Hydroxyapatit-Kristallen, Magnesium als Ammonium-Magnesiumphosphat (Struvit) in der Biofilm-Matrix stabilisiert.

Es erfolgt weitere Kristallisation und bakterielle Besiedelung [Sofer und Denstedt, 2000].

Wie bereits erwähnt, sind in Biofilmen auf Harnleiterschienen eher *Escherichia coli*-Bakterien zu finden, während in Biofilmen auf Blasenkathetern vorwiegend *Proteus mirabilis* auftritt. Das bedeutet auch, dass sich die Risikofaktoren für Inkrustationen von Harnleiterschienen und Blasenkathetern unterscheiden.

Es gibt sehr viele Studien über Versuche, Biofilme wieder von Oberflächen zu entfernen. So zeigten beispielsweise Nickel et al., dass ein Biofilm aus *Pseudomonas aeruginosa* auch mit Tobramycin-Gaben weit oberhalb der üblichen Dosis nicht entfernt werden konnte. Aus dem Biofilm isolierte und auf einem Nährboden angezüchtete Bakterien konnten dagegen schon mit einer sehr geringen Dosis Tobramycin abgetötet werden. Das belegt, dass die Bakterien keine spezifische Antibiotikaresistenz gegen Tobramycin entwickelt haben, sondern dass die Resistenz aus dem Vorhandensein des Biofilms resultiert [Nickel et al., 1985].

Weiterhin wurde von *Serratia marcescens*-Bakterien berichtet, die zwei Jahre lang unter einem Biofilm in einer zweiprozentigen Chlorhexidinlösung überleben konnten [Marrie und Costerton, 1981]. (Chlorhexidinlösung der Konzentration 0,1% wird als antibakterielle Mundspüllösung in der Selbstmedikation eingesetzt.)

Eine Studie aus Wien berichtet, dass 100% aller Dauerkatheter und 69,3% der kurzfristigen Katheter bakteriell besiedelt waren, obwohl prophylaktisch Antibiotika verabreicht wurden. Die am häufigsten auftretenden Keime in dieser Studie waren Enterokokken, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*-Arten und *Staphylococcus epidermidis*. Die Autoren stellen auch klar, dass eine korrekte Keimidentifizierung nur durch eine Stententfernung sichergestellt werden kann, da gerade die Problemkeime durch den Urin nicht ausgeschwemmt werden, die Ergebnisse also unpräzise sind, wenn nur die Urinproben untersucht werden [Riedl et al., 1999].

Fletcher untersuchte die metabolische Aktivität von Plankton-Bakterien und Biofilm-Bakterien durch die Messung der Aufnahme von Tritium-markierten Aminosäuren. Dabei wurde einerseits festgestellt, dass auf bestimmten Oberflächen wie Glas und PET mehr Bakterien metabolisch aktiv sind als dies bei freischwimmenden Plankton-Bakterien der Fall ist. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Zugabe von Festkörpern das Bakterienwachstum begünstigen kann [Fletcher, 1979].

Liegt überhaupt keine bakterielle Infektion vor, so wird das Risiko für eine Inkrustation durch dieselben Faktoren bestimmt wie die Harnsteinbildung [Shaw et al., 2005]. Aus diesem Grund wird im Folgenden auch der Mechanismus der Bildung solcher Steine beschrieben.

1.1.3.2 Bildung von Harnsteinen

Die Epidemiologie der Urolithiasis (Harnsteinkrankheit) schwankt je nach geographischen oder sozioökonomischen Gesichtspunkten, wie auch hinsichtlich der Rasse oder der Ernährungsgewohnheiten. In der westlichen Welt ist die Erkrankung etwas häufiger als in der östlichen. In den Industrienationen treten vornehmlich Nieren- und Harnleitersteine auf, die meist aus Calciumoxalat oder Calciumphosphat bestehen. In Asien sind Blasensteine aus Ammoniumurat und Calciumoxalat häufiger. Die heutige Situation in Asien gleicht übrigens der Situation in Europa vor hundert Jahren [López und Hoppe, 2008].

Über die ganze Welt betrachtet, sind Calciumoxalat-Steine mit 60 bis 90% bei weitem die häufigsten. Ihnen folgen Calciumphosphat (10 bis 20%), Struvit (Ammonium-Magnesium-phosphat, 1 bis 14%), Harnsäure (5 bis 10%) und Cystin (1 bis 5%), sowie Mischformen (4%) [López und Hoppe, 2008].

Als wichtigste Risikofaktoren der Urolithiasis gelten die Hypercalciurie, die Hyperoxalurie und die Hypocitraturie [Shaw et al., 2005].

Allerdings häufen sich die Hinweise darauf, dass die Bedeutung des Faktors Hypercalciurie bisher weit überschätzt wurde. Es wurde sogar beobachtet, dass bei erhöhter Calcium-Aufnahme das Risiko einer Steinbildung abnahm. Die erhöhten Calcium-Konzentrationen korrelierten dann mit verminderten Oxalat-Konzentrationen [Masai et al., 1995]. Das lässt vermuten, dass Calcium die renale Exkretion von Oxalat vermindert [Curhan et al., 1993]. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Aufnahme von tierischem Fett [Naya et al., 2000], besonders von Arachidonsäure [Naya et al., 2002] und Kohlenhydraten [Masai et al., 1995] die intestinale Resorption von Oxalat steigert. Vermutlich entfaltet die Arachidonsäure ihre Wirkung an der Plasmamembran am entsprechenden Transporter [Baggio et al., 1999].

Die Rolle von Citrat dürfte einerseits darin liegen, Calcium zu komplexieren und damit der Steinbildung zu entziehen. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass Citrat die Urease-induzierte Kristallisation hemmt [Shaw et al., 2005]. Damit sind ausreichend hohe Citrat-Spiegel v.a. dann bedeutend, wenn Infektionen mit Urease-produzierenden Keimen wie *Proteus mirabilis* vorliegen, welche – wie bereits erwähnt – eher im unteren Harntrakt vorkommen.

Als weitere Risikofaktoren konnten die Aufnahme von Alkohol und tierischem Protein identifiziert werden. Die Einnahme von Kalium und Thiaziden senkt das Risiko [Curhan et al., 1993].

Tritt die Steinbildung nun auf Biomaterialien wie Blasenkathetern auf, so kommt es in etwa 48% der Fälle zu einer Katheterblockade, bei 37% läuft der Harn außen am Katheter vorbei [Kohler-Ockmore und Feneley, 1996]. Bei Harnleiterschienen dürfte der Sachverhalt ähnlich sein.

Bei Obstruktion durch Inkrustation kann eine Hydronephrose die Folge sein, die – genauso wie eine aufsteigende Sepsis – bei längerem Bestehen irreversible Nierenschäden verursachen kann [Shaw et al., 2005].

Um einen Eindruck der aus diesen Komplikationen erwachsenden Kosten zu vermitteln, sei an dieser Stelle eine Einschätzung aus dem Jahr 2000 in den USA zitiert: Für eine symptomatische Harnwegsinfektion ergeben sich demnach zusätzliche Kosten von etwa 676 US-$, bei einer katheterassoziierten Bakteriämie sogar von 2836 US-$ pro Patient [Saint, 2000].

Diese hohen Kosten in Verbindung mit dem Leidensdruck der Patienten bieten ausreichend Anreiz, die gegebene Problematik zu verbessern. Im Folgenden werden einige Ansätze skizziert, die sich die Verminderung der Biofilmbildung zum Ziel gesetzt haben. Es gibt hierbei Ansätze, die die infektionsunabhängige Inkrustation ins Auge gefasst haben, und solche, die die eigentlichen Biofilme bekämpfen. Hierbei kann man wiederum unterscheiden in Maßnahmen, die die Biofilme auflösen, und in solche, die deren Entstehung verhindern.

1.1.4 Ansätze zum Lösen der Biofilm-Problematik

Zuerst denkt man bei der Bekämpfung von bakteriellen Biofilmen sicherlich an die Anwendung von Antibiotika. Die Sache ist aber leider nicht so einfach, da die von den Bakterien ausgeschiedenen Polysaccharide die Keime abschirmen und die Antibiotika in der Regel nicht zur Wirkung kommen können.

In Ausnahmefällen können Antibiotika wie Ciprofloxacin jedoch junge Biofilme noch auflösen [Reid et al., 1993]. Durch die Kombination mit anderen Methoden konnte ebenfalls die Wirkung von Antibiotika so verstärkt werden, dass diese in der Lage waren einen Biofilm aufzulösen. Mott entfernte durch axialen Ultraschall einen Biofilm aus *Proteus mirabilis* von Glasröhren [Mott et al., 1998]. Kombiniert man den Ultraschall nun mit der systemischen Gabe von Aminoglykosid-Antibiotika wie Gentamicin, so lässt sich die Auflösung des Biofilms auch in vivo im Tiermodell nachweisen [Rediske et al., 1999]. Die Verstärkung der Wirkung anderer Biozide wie Isothiazolon, Dimethylammoniumchlorid und Glutaraldehyd durch elektrischen Strom konnte ebenfalls gezeigt werden [Blenkinsopp et al., 1992].

Die Möglichkeiten, einen bestehenden Biofilm aufzulösen sind also wie man sieht sehr beschränkt und größtenteils am Menschen nicht erprobt. Daher gehen die im Folgenden vorgestellten Entwicklungen auch in die Richtung, die Ausbildung des Biofilms zu verhindern.

Die Beschichtung von Kathetern mit Antibiotika wie Ceftriaxon, Ciprofloxacin [Cormio et al., 2001] oder Gentamicin [Cho et al., 2001] führt zu einer verminderten Biofilm-Bildung. Allerdings eignen sich die vorgestellten Modelle nur für die Kurzzeitanwendung, die Gentamicin-Freisetzung wurde beispielsweise nur über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht. Gleiches gilt für das Coating mit einem liposomalen Hydrogel, dessen Liposomen Ciprofloxacin enthalten. Eine gleichmäßige Freisetzung ist lediglich über eine Woche zu beobachten [DiTizio et al., 1998].

Aufgrund seiner antibakteriellen Wirksamkeit wird auch Silber zur Beschichtung von Kathetern verwendet. Die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich; in einer Metastudie konnte der Nutzen von Silberlegierungen in der Langzeitanwendung jedoch nachgewiesen werden. Vor allem Frauen profitieren von der Silberbeschichtung. Der Grund ist, dass die Ursache für Harnwegsinfekte bei Frauen meist Schmierinfektionen sind, bei denen gramnegative Stäbchen beteiligt sind, gegen die Silber gut wirkt. Bei Männern dagegen kommt es häufiger zu Infektionen durch grampositive Kokken aus kontaminierten Urinbeuteln, gegen die Silber im Allgemeinen unwirksam ist. Weiterhin ist anzumerken, dass die Wirksamkeit nur für Silberlegierungen nachgewiesen wurde, nicht für das kostengünstigere Silberoxid [Saint et al., 1998].

Auch durch die prophylaktische orale Gabe von Ciprofloxacin kann das Wachstum gramnegativer Keime auf Katheteroberflächen verhindert werden. Vermutlich lagert sich der oral eingenommene Wirkstoff in das Kathetermaterial ein [van der Wall et al., 1992].

Es scheint auch Hinweise darauf zu geben, dass Ciprofloxacin in niedrigen Konzentrationen die Hydrophobizität der Oberfläche so erhöht, dass dadurch eine Anlagerung der Bakterien erschwert wird [Reid et al., 1995]. Allerdings steht das im Widerspruch zu der Aussage von Choong et al., die postulieren, dass die Hydrophobizität der Oberfläche keinen Einfluss auf die Inkrustation hat, da derartige Eigenschaften ohnehin innerhalb kürzester Zeit durch den sich ausbildenden Konditionierungsfilm verändert würden. Die Gruppe misst dem pH-Wert eine größere Bedeutung bei [Denstedt et al., 2000]. Was den Einfluss der Oberflächenenergie betrifft, so wurde ein Zusammenhang zwischen niedriger Oberflächenenergie und dünneren Inkrustationen gefunden [Tieszer et al., 1998].

Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Selbstmedikation. Abgesehen davon, dass eine hohe Flüssigkeitsaufnahme selbstverständlich hilfreich bei Steinleiden mit und ohne Katheter ist, und dass lithogene Substanzen wie Oxalat gemieden werden sollten, zeigt Preiselbeersaft ebenfalls eine positive Wirkung. Er reduziert die Anhaftung von Bakterien sowohl an Biomaterialien als auch an das Epithel der Harnwege [Reid et al., 2001], weshalb er auch in der Selbstmedikation bei unkomplizierten Harnwegsinfekten Anwendung findet. Allerdings verringert der Saft nicht die Verkrustung von Kathetern [Morris und Stickler, 2001].

Interessante Ergebnisse, die aber bislang nur in vitro erzielt wurden, sind die folgenden:

Der Biofilm-reduzierende Effekt von Ciprofloxacin kann durch Zugabe des polykationischen Proteins Protaminsulfat noch verstärkt werden [Soboh et al., 1995]. Allerdings bleibt die Frage offen, wie das Protaminsulfat appliziert werden soll.

Acetohydroxamsäure und Fluorofamid inhibieren die Urease irreversibel, könnten also auch zur Verringerung der durch *Proteus mirabilis* vermittelten Kristallisationen eingesetzt werden. Allerdings zeigt Acetohydroxamsäure bei systemischer Anwendung schwere Nebenwirkungen wie hämolytische Anämie, tiefe Venenthrombosen, sowie gastrointestinale und neurologische Symptome. Zur Toxizität von Fluorofamid gibt es kaum Daten [Morris und Stickler, 1998].

Einige der im Folgenden beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten beschränken sich leider auf Blasenkatheter. Dazu zählt z.B. das Ausspülen des Katheters mit einer Salzlösung [Brocklehurst und Brocklehurst, 1978] oder mit Lösungen wie Suby G, welches u.a. Citrat und Natriumedetat enthält. Letztere Substanz bildet lösliche Komplexe mit zweiwertigen Kationen wie Calcium und Magnesium und entzieht diese damit der Steinbildung [Getliffe et al., 2000]. Problematisch bei Spülungen ist, dass das Risiko bakterieller Kontaminationen erhöht wird.

Eine andere interessante Möglichkeit ist das Befüllen des Ballons eines Ballonkatheters mit Triclosan. Dadurch wird der Katheter allmählich mit dem Desinfektionsmittel imprägniert [Stickler et al., 2003]. Allerdings wurden durch die Anwendung von niedrig dosiertem Triclosan in Haushaltsreinigern, Zahnpasta und Deodorants bereits zahlreiche resistente Keime selektiert. Weiterhin scheint es eine Kreuzresistenz zu einigen Antibiotika zu geben, die teilweise gerade in der Therapie der Harnwegsinfekte eine wichtige Rolle spielen, nämlich zu Chinolonen und Fluorchinolonen, sowie zu Tetracyclinen [www.bfr.bund.de]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass aus Triclosan bei Sonneneinstrahlung polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane entstehen. Diese sind umweltschädlich [Kanetoshi et al.,

1988]. Zwar ist Triclosan im Ballonkatheter nicht dem Sonnenlicht ausgesetzt, aber sobald es ausgewaschen und ausgeschieden wird, gelangt es ins Abwasser. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist natürlich, dass auch sie so nur bei Blasenkathetern anwendbar ist.

Als geeignete Spüllösung für eine katheterisierte Blase erwiesen sich eine einprozentige Mandelsäure-Lösung, bzw. eine Mischung aus Mandelsäure und Milchsäure. Diese waren sogar in der Lage, bestehende Biofilme aufzulösen. Die Autoren untersuchten auch die Wirksamkeit von Chlorhexidin und Povidon-Iod, konnten hier aber keine Effekte nachweisen [Stickler und Hewitt, 1991]. Leider ist auch bei dieser Technik keine Übertragung auf Harnleiterschienen möglich.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Oberflächeneigenschaften war die Beschichtung mit Hydrogelen oder Teflon mit dem Ziel, die Gleiteigenschaften zu verbessern [Graiver et al., 1993]. Allerdings zeigte sich, dass die Hydrogel-Beschichtung auch die Kolonisierungs-bedingungen für einige Keime verbessert werden, wie z.B. für *Proteus*-Arten [Sabbuba et al., 2002].

Es fanden jedoch noch weitere Entwicklungen in Richtung der Verbesserung der Gleiteigenschaften statt, die gleichzeitig eine verringerte Neigung zur Inkrustation zeigen. Erreicht wurde das durch hydrophile Beschichtungen mit Phosphorylcholin [Stickler et al., 2002] bzw. mit Polyvinylpyrrolidon [Tunney und Gorman, 2002].

Weiterhin wurde herausgefunden, dass die Einarbeitung fluorhaltiger Komponenten die Inkrustationsneigung vermindert [Holmes et al., 1992].

Auch die Beschichtung der Stents mit Heparin scheint eine Verminderung der Inkrustation zur Folge zu haben. Die Beschichtung bleibt über einen langen Zeitraum erhalten, insofern eignen sich solchermaßen modifizierte Stents auch für die Langzeitanwendung [Cauda et al., 2008].

Ähnliche Erfolge zeigen Beschichtungen aus Glykosaminoglykanen oder aus sulfatidierten Polysacchariden in vitro. Hier sind eine verminderte Calciumoxalat-Kristallisation und eine verringerte Zelladsorption zu verzeichnen [Cao et al., 1997].

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Beschichtung der Ureterschienen mit Enzymen, die Oxalat verdauen, welches somit nicht mehr zur Steinbildung zur Verfügung steht. Diese Enzyme werden aus *Oxalobacter formingens* isoliert, einem Bakterium, das ein natürlicher Bestandteil der Darmflora ist. In Tierversuchen konnte hier ebenfalls eine Reduzierung der Inkrustation festgestellt werden [Watterson et al., 2003].

Ein Beschichtungsreagenz, welches die initiale Anlagerung von *Enterococcus faecalis* hemmt, ist das von *Lactobacillus acidophilus* und einigen anderen *Lactobacillus*-Arten ausgeschiedene Biosurfactant Surlactin. Inwieweit das Ergebnis auf andere Keime zu übertragen ist, bleibt noch zu untersuchen [Velraeds et al., 2000].

Auch die bereits weiter oben erwähnte, hemmende Wirkung von Citrat auf die Urease-vermittelte Kristallisation kann man sich zunutze machen. Die Beschichtung mit Citrat erfolgt in Form eines Wachses. Man könnte das Citrat zwar auch oral verabreichen; das wäre für den Patienten in den erforderlichen Mengen dann aber nicht sehr angenehm [Shaw et al., 2005].

In eine etwas andere Richtung gehen Entwicklungen von biodegradierbaren Stents, die sich nach kurzer Zeit von alleine auflösen, also nicht mehr operativ entfernt werden müssen [Auge et al., 2002], [Kemppainen et al., 1993]. Derartige Stents eignen sich dann natürlich nur für Kurzzeitanwendungen.

Durch die Einarbeitung von Metallstreifen in das Kathetermaterial kann eine mikroelektrische Umgebung geschaffen werden, was ebenfalls die Biofilmbildung verringert [Shaw et al., 2005].

Nach dieser Vorstellung der Auswahl an bestehenden Ansätzen zur Bekämpfung der Biofilmproblematik, sollen die folgenden Abschnitte den Ansätzen gewidmet werden, die im Rahmen unseres Projektes „BioMinMed“ verfolgt wurden. Es geht hier einerseits um die Beschichtung der Stentoberfläche mit amorphem Kohlenstoff, was die Gleiteigenschaften der Stents verbessern und die Anlagerung von Salzkristallen und ggf. von Bakterien verringern soll. Zusätzlich soll die Immobilisierung eines antibakteriell wirksamen Stoffes auf den Harnleiterschienen die Bakterien abweisende Wirkung verstärken.

1.1.4.1 Beschichtung der Harnleiterschienen mit amorphem Kohlenstoff

Unter amorphem Kohlenstoff versteht man sp^2-hybrdisierten Kohlenstoff. Enthält dieser auch eine signifikante Menge an sp^3-hybrdisierten Kohlenstoffatomen, so spricht man von Diamond-like carbon (diamantähnlicher Kohlenstoff, abgekürzt DLC) [Robertson, 2002].

Diese DLC-Schichten zeichnen sich durch geringe Reibungskoeffizienten und chemische Inertheit aus. Sie werden als sehr glatte Schicht abgelagert [Grill, 2003].

Weiterhin weisen sie eine exzellente Biokompatibilität auf: Es kommt seltener zu Thrombenbildungen, da sich die Zusammensetzung der anhaftenden Proteine auf eine günstige Weise verschiebt: Das Verhältnis von Albumin zu Fibrin vergrößert sich. Außerdem verringert sich die Plättchenaktivierung [Hauert, 2003].

Die Beschichtung von Materialien mit amorphem Kohlenstoff lässt sich mit verschiedenen Methoden realisieren. Dazu zählen Ionenablagerungsverfahren (ion deposition), Sputtertechniken, gepulste Laserablagerungen (pulsed laser deposition) und die plasmaverstärkte chemische Gasphasenabscheidung (PECVD, plasma enhanced chemical vapour deposition). Letzteres Verfahren wird von unserem Projektpartner NTTF zur Beschichtung verwendet.

Bei diesem Verfahren wird zunächst ein aktiviertes Hydrocarbon-Plasma aus Ethylen erzeugt. Die chemische Zusammensetzung kann durch Einleitung von Gasen mit anderen Partialdrücken wie Tetrafluormethan, Stickstoff oder Ammoniak, sowie durch die Verdampfung von Legierungen aus Vanadium, Titanium oder Silicon verändert werden. Auf diese Weise ist auch eine Funktionalisierung der Oberfläche möglich, was einen Ansatzpunkt für Spacer-Chemie bietet.

Normalerweise sind die entstehenden Schichten mechanisch hart und chemisch inert, die Eigenschaften können aber anhand der Ablagerungsbedingungen gesteuert werden, so dass es auch möglich ist, elastische Beschichtungen herzustellen.

Geeignete Bedingungen für die Beschichtung der Harnleiterschienen sind eine niedrige Temperatur (ca. 25°C) und ein niedriger Druck (1-5 µbar). Die niedrige Temperatur ist wichtig, da Polyurethan bei hohen Temperaturen schmilzt. Die beschriebenen Bedingungen führen zu einer kompakten Struktur der Beschichtung, die härter ist als Stahl, aber elastisch genug, dass sie sich beim Biegen des Stents nicht ablöst. Die Oberfläche des Materials ist nach der Beschichtung leicht hydrophil, die Schicht etwa 25 bis 100 nm dick [Laube et al., 2007].

Da bei dieser Beschichtung die diamantähnlichen Eigenschaften eher im Hintergrund stehen, wird die Beschichtung korrekterweise als a:CH-Beschichtung bezeichnet, was für amorphen Kohlenwasserstoff steht. Dabei ist der Anteil der sp^2-hydridisierten C-Atome höher als bei der DLC-Beschichtung. Der Begriff der DLC-Beschichtung wurde innerhalb des Projekts aus Gewohnheit trotzdem häufig weiterverwendet, daher ist auch in dieser Arbeit häufig die Rede von DLC-Beschichtungen, obwohl diese Bezeichnung nicht ganz korrekt ist.

Diese beschichteten Harnleiterschienen wurden bereits in vivo an 10 Patienten getestet. Bei diesen Patienten mussten die Stents zuvor häufig wegen Inkrustationen gewechselt werden. Bei den 10 Patienten wurden mit der Zeit 26 a:CH-beschichtete Harnleiterschienen eingesetzt, die insgesamt über einen Zeitraum von 2467 Tagen im Körper blieben, also durchschnittlich knapp 100 Tage pro Stent. Bei keinem dieser Eingriffe traten stentassoziierte Komplikationen

auf und auf keinem Stent wurde eine Biofilmbildung beobachtet. Außerdem wurde eine deutlich geringere Frequenz und Schwere von symptomatischen Harnwegsinfektionen beobachtet. Weiterhin berichteten Patienten und medizinisches Personal, dass die Stents leichter zu wechseln und angenehmer zu tragen sind als die zuvor verwendeten Stents. Das ist vermutlich auf die günstigen Gleiteigenschaften zurückzuführen.

1.1.4.2 Immobilisierung eines antibakteriellen Wirkstoffes auf oder in der Harnleiterschiene

Zusätzlich zu der Beschichtung mit amorphem Kohlenstoff soll ein antibakterieller Wirkstoff in die Stents integriert werden. Dazu sind zwei Ansätze geplant: Der Wirkstoff soll entweder über einen Spacer an der Oberfläche immobilisiert werden oder direkt in die Polyurethanmatrix eingebracht werden – entweder durch Quellen der Schläuche oder durch direktes Einarbeiten in die noch nicht verarbeitete Polymermasse vor dem Extrudieren.

1.1.4.2.1 In Frage kommende Wirkstoffe

Es wurde bewusst darauf verzichtet, Antibiotika in diese Auswahl einzubeziehen. Einer der Gründe hierfür ist, dass sich insbesondere bei der Anwendung von Breitspektrum-Antibiotika leicht Resistenzen ausbilden. Besonders ausgeprägt wäre die Resistenzbildung bei einer lang andauernden Exposition mit niedrigen Dosierungen, wie dies bei einer Freisetzung aus Harnleiterschienen der Fall wäre [Ghiselli et al., 2002].

Weiterhin wird in allgemeinen nationalen Therapie-Leitlinien von der lokalen Anwendung von Antibiotika abgeraten. Ausgenommen sind Anwendungen in der Augenheilkunde und in der Orthopädie. Statt der Antibiotika sollen Antiseptika verwendet werden [www.antibiotika-strategien.at].

Das Auftreten von Antibiotika-Allergien könnte ebenfalls zu Komplikationen führen. In einem solchen Fall müsste das Implantat schleunigst aus dem Körper entfernt werden.

Aus den genannten Gründen wurde eine Auswahl von Arzneistoffen aus dem Bereich der Antiseptika getroffen. Sie umfasst die drei Desinfizientien Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat. Die Strukturformeln dieser Stoffe finden sich in Abbildung 3:

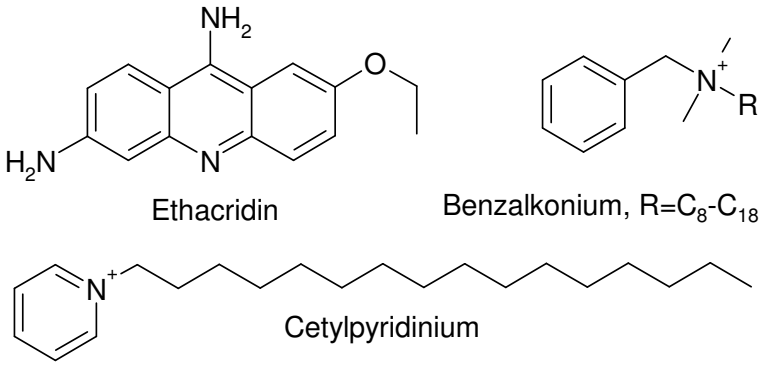


Abbildung 3: Strukturformeln von Benzalkonium, Cetylpyridinium und Ethacridin

1.1.4.2.1.1 Benzalkoniumchlorid

Der Wirkmechanismus von Benzalkoniumchlorid besteht darin, dass sich das Molekül mit seinem langen Alkylrest in die Zytoplasmamembran der Bakterien einlagert. Die Folgen der Einlagerung dieses Fremdmoleküls sind Wachstumshemmung und Lyse der Bakterien.

Benzalkoniumchlorid besitzt ein breites antimikrobielles Wirkspektrum sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Keime.

Weiterhin ist es gut verträglich, wird kaum resorbiert aber schnell eliminiert, und es sind keine Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotika oder Desinfizientien bekannt. Für eine lokale Anwendung ist es demnach gut geeignet.

Benzalkoniumchlorid ist beispielsweise in den Fertigarzneimitteln Dorithricin® Halstabletten und Gingicain® D (einem Mundspray) als Wirkstoff enthalten. In Dorithricin® Halstabletten wird es mit dem Antibiotikum Tyrothricin und dem Lokalanästhikum Benzocain kombiniert. Die Indikationen dieser Zubereitung sind Halsentzündungen und –schmerzen mit Schluckbeschwerden, sowie Rachen- und Kehlkopfentzündungen, Entzündungen der Mundschleimhaut und des Zahnfleisches [Fachinformation Dorithricin, 2008]. Gingicain® D ist ein Lokalanästhetikum zur Oberflächenanästhesie der Mundschleimhaut. Diese Wirkung ist auf den ebenfalls enthaltenen Wirkstoff Tetracain zurückzuführen. Benzalkoniumchlorid kann hier nur zusätzlich eine desinfizierende Wirkung entfalten [Fachinformation Gingicain,

2007]. Außerdem findet man Benzalkoniumchlorid häufig als Konservierungsmittel, vor allem in Augentropfen [Fachinformation Allergodil, 2006].

Benzalkoniumchlorid kann in hohen Dosierungen Hautreizungen und Bronchospasmen hervorrufen. Allerdings ist mit hoher Dosierung eine Menge von 25 mg gemeint, das ist die Gesamtmenge Benzalkoniumchlorid, die in einer Dose (65 g) Gingicain®D enthalten ist [Fachinformation Gingicain, 2007].

1.1.4.2.1.2 Cetylpyridiniumchlorid

Der mutmaßliche Wirkmechanismus von Cetylpyridiniumchlorid besteht in einer Adsorption des Wirkstoffes an die Bakterienzellwand mit anschließender Zerstörung derselben durch die Inaktivierung von Proteinen.

Das Wirkspektrum umfasst hauptsächlich grampositive Keime. Einige gramnegative Keime wie Pseudomonaden und *Mycobacterium tuberculosis* sind resistent, *Staphylococcos aureus* ist nur mäßig empfindlich.

Eine Wirkungssteigerung kann durch einen hohen pH-Wert oder durch den Zusatz nichtionischer oberflächenaktiver Substanzen wie Tween oder durch aromatische Alkohole, in erster Linie Phenylpropanol, erreicht werden.

Cetylpyridiniumchlorid kann durch Eiweiß, Serum, Eiter, Phospholipide und andere lipidhaltige Substanzen inaktiviert werden.

Bei Kontakt mit Cetylpyridiniumchlorid besteht bei Patienten mit Kontaktallergien Sensibilisierungsgefahr. Wegen möglicher Wundheilungsstörungen sollte es bei vorliegenden Schleimhautschäden nicht angewendet werden. Für eine lang andauernde lokale Anwendung gerade bei möglicherweise vorgeschädigtem Gewebe ist Cetylpyridiniumchlorid also nur bedingt geeignet.

Cetylpyridiniumchlorid ist der wirksame Bestandteil der Fertigarzneimittel Dobendan® 5 mg/10 mL Lösung [Fachinformation Dobendan, 2008], sowie von Dobendan® Lutschpastillen [Fachinformation Dobendan, 2007] und Dobendan Strepsils® Lutschtabletten [Fachinformation Dobendan Strepsils, 2008]. Die Indikationen für alle drei Produkte sind Entzündungen von Rachen und Mundschleimhaut, für die Lösung besteht die zusätzliche Indikation Mundgeruch.

Bislang gibt es keine Untersuchungen über die Resorption von Cetylpyridiniumchlorid über die Haut und Schleimhaut. Eine 0,3%ige Lösung rief Bindehautreizungen hervor. Bei

Überdosierung können Magen-Darm-Beschwerden, Atemnot, Kreislaufkollaps, Koma oder Krämpfe auftreten. Weiterhin ist eine Kreuzallergie zu Perubalsam bekannt [Fachinformation Dobendan, 2008].

1.1.4.2.1.3 Ethacridinlactat

Der wahrscheinliche Wirkmechanismus von Ethacridinlactat beruht auf einer Bindung des Wirkstoffes an die bakterielle DNA bzw. RNA, wodurch die Proteinbiosynthese der Bakterien blockiert wird.

Die antibakterielle Wirkung der Acridine ist bereits seit 1913 bekannt; es handelt sich also um eine Stoffgruppe, zu der schon viele Erfahrungen vorliegen.

Besonders wirksam ist Ethacridinlactat gegen Staphylokokken, Streptokokken und Kolibakterien, aber auch gegen Pilze, Protozoen wie Amöben, gegen Trichomonaden, Kokzidien und Anaplasmen. Besonders wichtig ist die Wirksamkeit gegen die meist bei Harnwegsinfekten und Katheterbesiedelungen vorkommenden Keime *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis*.

Außerdem besitzt Ethacridinlactat antientzündliche Eigenschaften und unterstützt das Immunsystem durch die Aktivierung von Th1-dominierten Reaktionen des antigenspezifischen Teils von Leukozyten [Fachinformation Rivanol, 2007].

Enthalten ist Ethacridinlactat in den Produkten Rivanol®, Metifex® und Tannacomp®.

Bei Rivanol® handelt es sich um Tabletten zur Herstellung einer antiseptischen Spüllösung für Wunden und Körperhöhlen. Als wässrige Lösung ist Rivanol® nur eine Woche haltbar. An Nebenwirkungen treten selten Kontaktdermatiden auf, sowie in Einzelfällen Gesichtsödeme, Urtikaria, Kopfschmerzen und Konvulsionen. Beim wiederholten Begießen von Verbänden mit der Lösung kann es bei Verdunstung des Wassers zu erheblichen Konzentrationszunahmen des Wirkstoffes und in Folge dessen zu lokalen Reizungen oder sogar zur Sensibilisierung kommen.

Sowohl Metifex® als auch Tannacomp® werden zur Therapie und Prophylaxe von Durchfallerkrankungen eingesetzt. Metifex® enthält 200 mg Ethacridinlactat, Tannacomp® 50 mg. Allerdings wird bei letzterem das Ethacridinlactat mit Tanninalbuminat kombiniert, welches Risse in der entzündeten Darmschleimhaut abdichtet, was die Resorption toxischer Stoffe erschwert und die Schleimhaut vor weiteren Reizen schützt [Fachinformation Tannacomp, 2008]. Ethacridinlactat selbst wird so gut wie nicht resorbiert und entfaltet seine

antibakterielle Wirkung daher ausschließlich lokal im Darm, ohne die physiologische Flora nennenswert zu beeinflussen. Da Ethacridinlactat auch krampflösend wirkt, kommt es zu einer Normalisierung der gesteigerten Darmmotilität. Die adstringierende Wirkung setzt die erhöhte Permeabilität herab und hemmt die exsudativ-entzündlichen Vorgänge. Dadurch werden auch die Sekretionseigenschaften verbessert [Fachinformation Metifex, 2008]. Außerdem erwies sich Ethacridinlactat als Antagonist des Acetylcholins. Für seine Wirkung bedeutet das, dass es die Darmpassage verlangsamt, und damit eine vermehrte Rückresorption von Wasser ermöglicht, was die Durchfall-Symptomatik weiter verbessert [Fachinformation Tannacomp, 2008].

Da die Resorption von Ethacridinlactat aus dem Darm sehr gering ist, sind keine systemischen Wirkungen bei der Einnahme zu erwarten. Aus der Harnblase wird der Wirkstoff noch schlechter resorbiert; bei Verwendung von Ethacridinlactat für die Beschichtung der Harnleiterschienen ist also ebenfalls nicht mit systemischen Wirkungen zu rechnen.

Bisher sind keine Resistenzentwicklungen gegenüber Ethacridinlactat bekannt geworden.

Allerdings gibt es Hinweise auf ein mutagenes Potential bei in-vitro-Untersuchungen an Prokaryonten [Fachinformation Rivanol, 2007].

Es gibt also schon vieles, was für eine Verwendung von Ethacridinlactat für die Immobilisierung spricht. Allerdings muss noch untersucht werden, ob sich der Wirkstoff auch gut auf den Harnleiterschienen immobilisieren lässt.

1.1.4.2.2 Immobilisierung des Wirkstoffes auf der Oberfläche durch ein Spacer-Molekül

Augrund der Struktur der drei Wirkstoffe liegt es nahe, die Immobilisierung über eine ionische Wechselwirkung herbeizuführen. Alle drei Stoffe liegen im Neutralen positiv geladen vor, können also durch einen negativ geladenen Spacer gebunden werden.

Gegenüber einer kovalenten Bindung bietet die ionische Bindung einen weiteren Vorteil: Es entsteht kein neuer Stoff, es entfallen also aufwändige Untersuchungen zur Toxizität, die bei der Anwendung eines neu entwickelten Arzneistoffs erforderlich wären.

Die Freisetzung aus der ionischen Bindung wird weiterhin leichter stattfinden als aus einer kovalenten Bindung.

Die Suche nach einem negativ geladenen Spacer führte zu einer Carbonsäure. Die Carboxylgruppe ist zu deprotonieren, der positiv geladene Wirkstoff kann sich an die negativ geladene Carboxylatgruppe anlagern. Protokollen aus der Arbeitsgruppe folgend [Hartmann,

2004], fiel die Wahl auf Bernsteinsäure, die in ihrer aktivierten Form als Anhydrid mit einer aminofunktionalisierten Oberfläche umgesetzt werden kann. Die Aminooberfläche wurde durch eine Polymerisierungsreaktion von 3-Aminotriethoxysilan auf der Oberfläche der Messchips hergestellt. Auf den Harnleiterschienen ist diese Aminofunktionalisierung durch die Einleitung von Ammoniak in das Ethylengas, mit dem die Harnleiterschienen vom Projektpartner NTTF beschichtet werden, möglich.

1.1.4.2.3 Inkorporieren des Wirkstoffes in die Polymermatrix

Der Wirkstoff soll in die Matrix aus Polyurethan eingebettet und kontrolliert daraus freigesetzt werden.

Das Einbringen kann entweder durch das Quellen des Materials in organischen Lösungsmitteln erfolgen, die den Wirkstoff enthalten, andererseits kann der Wirkstoff auch direkt in das Polymer eingearbeitet werden, noch bevor die Schläuche für die Stents überhaupt hergestellt werden. Für die letztere Variante fehlte am Institut jedoch die technische Ausrüstung, und auch der für die Lieferung der Schläuche zuständige Projektpartner Urotech besitzt keinen eigenen Extruder.

Die Kontrolle der Freisetzung soll durch die amorphe Kohlenstoffschicht erfolgen, in der durch das Quellen kleine Risse entstehen sollen, so genannte Nanolöcher. Allerdings ist es auch denkbar, dass schon durch den Einschluss des Wirkstoffes in die Matrix eine Verzögerung der Freisetzung erfolgt.

1.2 Theoretische Hintergründe der verwendeten Messmethoden

1.2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) misst man das Interferenzmuster, das durch die Überlagerung zweier teilreflektierter Lichtstrahlen gebildet wird. Die Reflexion der Teilstrahlen erfolgt an parallelen Grenzflächen, die einen Abstand zwischen 0,5 und einigen 10 µm zueinander haben, was mit der Wellenlänge des eingestrahlten Weißlichts zusammenhängt. Bei den interferierenden Teilstrahlen handelt es sich einerseits um den Teilstrahl, der an der Grenzfläche Glaschip/Beschichtung reflektiert wird, andererseits um den an der Grenzfläche Analyt-Lösung/Luft reflektierten Teilstrahl [Gauglitz et al., 1993].

Der Verlauf des Lichtstrahls ist in Abbildung 4 dargestellt:

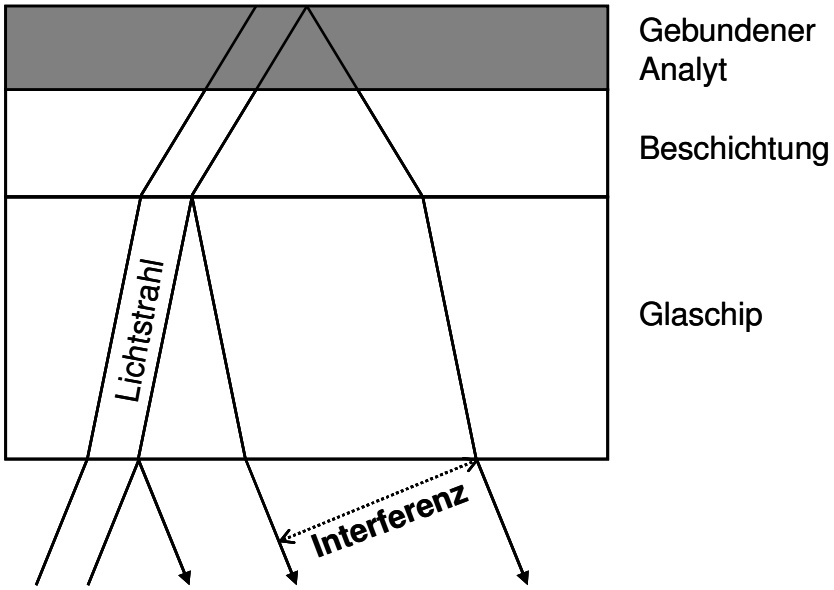


Abbildung 4: Verlauf des Messstrahls durch die Probe. Von besonderem Interesse sind die Teilstrahlen, die an der Grenzfläche Glaschip/Beschichtung bzw. Analyt/Luft reflektiert werden. Das durch deren Überlagerung entstehende Interferenzmuster wird gemessen.

Da die Beschichtung zusammen mit dem gebundenen Analyten in den seltensten Fällen eine Dicke von 0,5 µm erreichen würde, sind auf den Glaschips zwei zusätzliche Schichten aufgebracht, die in Abbildung 4 nicht berücksichtigt wurden. Auf den Glaschip wurden eine Tantalpentoxidschicht und darauf eine weitere Siliciumdioxidschicht aufgebracht. In Abbildung 4 müssten sie als der untere Teil der Beschichtung dargestellt werden. Diese zusätzliche Schicht ist optisch durchlässig und besitzt eine ausreichende und definierte Schichtdicke.

Beim verwendeten Messgerät wird das Interferenzmuster als UV/Vis-Spektrum durch einen Diodenarray aufgezeichnet. Auch das von der Lichtquelle ausgehende Licht wird durch den Diodenarray vermessen, damit es möglich ist, zu bestimmen, welcher Anteil des Lichts reflektiert wurde [Manual BIAffinity, 2006].

Die folgende Abbildung stellt dar, wie sich das Messsignal verändert, wenn ein Analyt an die Oberfläche bindet oder die Beschichtung aufquillt:

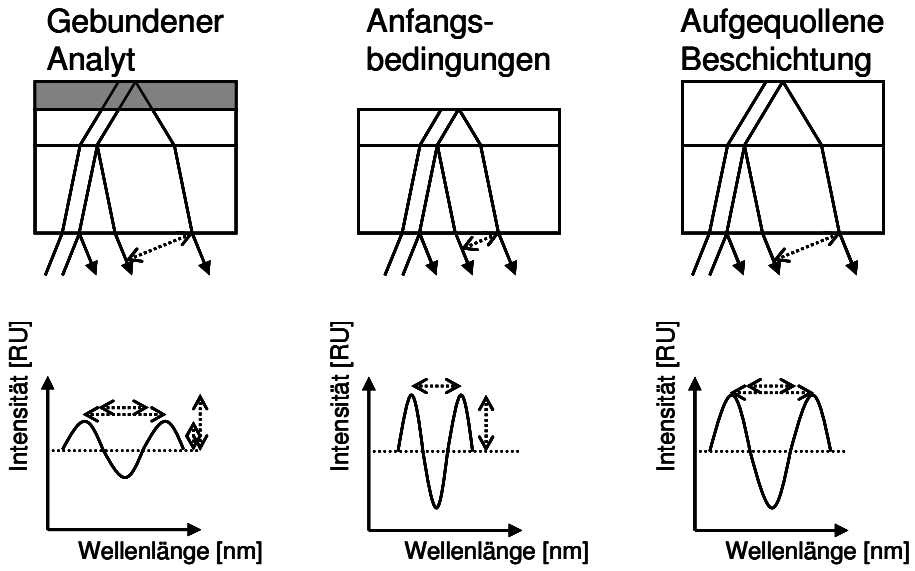


Abbildung 5: Veränderungen des Interferenzmusters bei Änderungen der Schichtdicke [nach Gauglitz et al., 1993]. Bei Zunahme der Schichtdicke kommt es zu einer seitlichen Verschiebung der Extrema, hat die Analyt-Lösung einen anderen Brechungsindex, wird zusätzlich die Amplitude des Spektrums verändert.

Durch die Überlagerung der beiden relevanten reflektierten Teilstrahlen ergibt sich ein Interferenzmuster, das beispielsweise so aussehen könnte wie in Abbildung 5 (untere Reihe in der Mitte). Bei einer Vergrößerung der Schichtdicke verlängert sich die Wegstrecke für den zweiten Teilstrahl, wodurch sich auch das Interferenzspektrum verändert: die Extrema erfahren eine Seitwärtsverschiebung (Abbildung 5, untere Reihe rechts und links).

Die Schichtdickenänderung kann durch das Aufquellen der aufgebrachten Beschichtung zustande kommen (Abbildung 5, rechte Seite) oder aber durch Adsorption von Analyt-Molekülen an die Oberfläche. Hat die Analyt-Lösung einen anderen Brechungsindex als die Beschichtung, so werden im Spektrum die Amplituden verändert (Abbildung 5, linke Seite) [Gauglitz et al., 1993].

Aus den Veränderungen des Interferenzmusters können also Rückschlüsse auf die Veränderungen der Schichtdicke gezogen werden. Das geschieht bei dem verwendeten Gerät

BIAffinity von Analytik Jena durch die Aufzeichnung der Lage des Minimums, das bei 550 ± 75 nm liegt [Manual BIAffinity, 2006].

Auf der Oberfläche des Messprogramms kann man im rechten Teil die Lage des Minimums sehen:

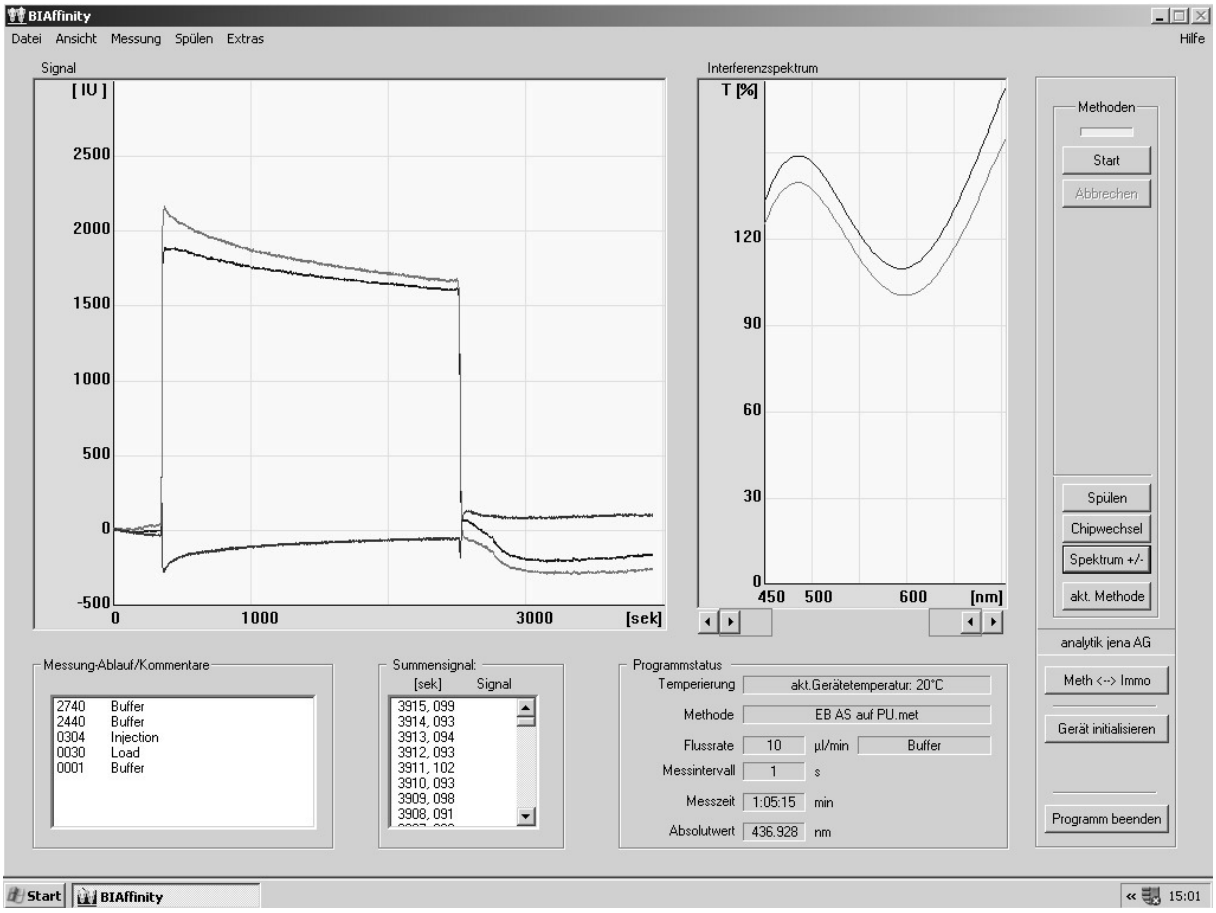


Abbildung 6: Oberfläche der RIfS-Software. Rechts das Interferenzspektrum: das Minimum liegt bei etwa 600 nm, also im Bereich von 550 ± 75 nm. Links ist die Verschiebung des Signals in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Das Messgerät BIAffinity ist folgendermaßen aufgebaut:

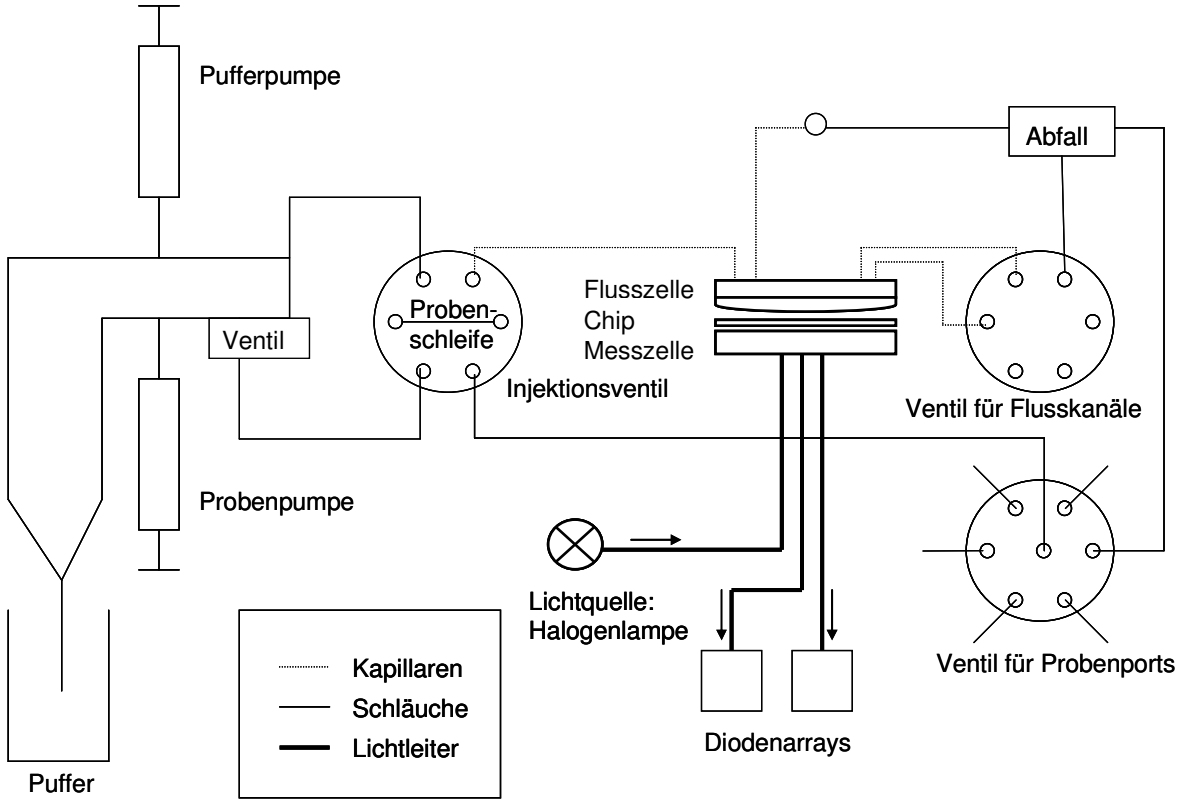


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der BIAffinity [Manual BIAffinity, 2006]

Aus dem Puffergefäß wird mittels zweier Kolbenpumpen mit einer Flussrate von 5-200 µL/min pulsationsfrei Puffer oder Wasser gezogen. Proben (50-200 µL) können über einen von fünf Probenports in die Probenschleife geladen werden. Die Injektion der Probe erfolgt dann durch Spülen der Probenschleife mit dem Puffer.

Danach wird die Flusszelle durchspült. Es gibt zwei Flusskanäle, von denen man wahlweise nur einen oder beide benutzen kann. Die Messung erfolgt nur auf einem Flusskanal, dort befinden sich dann aber zwei Messkanäle (s. Abbildung 8):

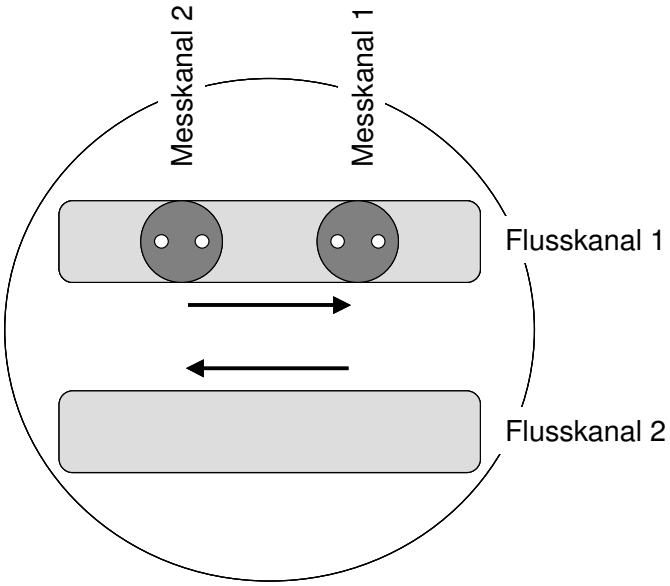


Abbildung 8: Aufbau der Flusszelle. Es gibt zwei Flusskanäle. Wahlweise können beide benutzt werden oder nur Flusskanal 1. Auf letzterem Flusskanal befinden sich auch die beiden Messkanäle, von denen zuerst Messkanal 2 überspült wird. Jeder der Messkanäle beinhaltet zwei Lichtleiter: durch den einen fällt das Licht ein, der andere dient der Messung des reflektierten Lichts.

Messkanal 2 liefert das Referenzsignal und wird zuerst überspült, erst danach wird der Messkanal 1, der Kanal für die eigentliche Messung überspült. Im Messkanal 1 wurden nämlich ggf. zuvor spezifisch bindende Moleküle auf der Oberfläche immobilisiert. Sollten sich diese ablösen, könnten sie an einer anderen Stelle wieder gebunden werden. Wäre diese Stelle der Messkanal für die Messung der unspezifischen Bindung, wäre das gemessene Signal nicht mehr alleine einer unspezifischen, sondern auch einer spezifischen Bindung zuzuordnen.

In jedem Messkanal befinden sich die Enden zweier Lichtleiter: der eine strahlt Weißlicht ein, der andere sammelt das reflektierte Licht und leitet es zum Detektor (vgl. Abbildung 9):

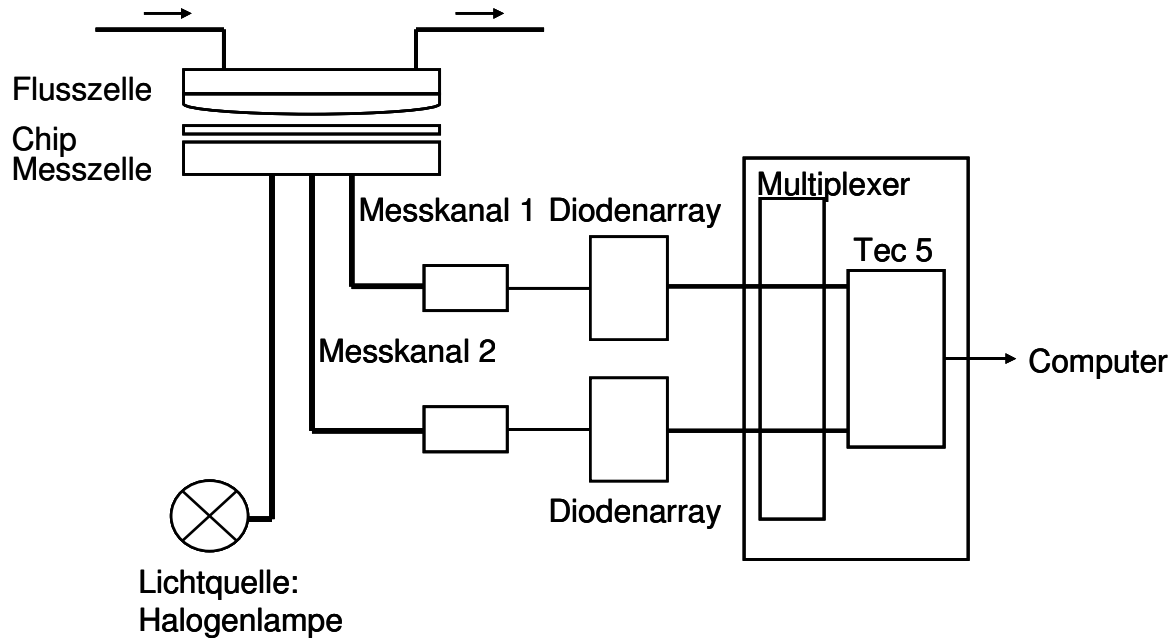


Abbildung 9: Der optische Teil des Messgeräts BIAffinity.

Ausgehend von der Lichtquelle ist in Abbildung 9 nur ein Lichtleiter dargestellt. Er endet aber in beiden Messkanälen. Von jedem der beiden Messkanäle ausgehend wird das gesammelte reflektierte Licht zu einem Diodenarray geleitet. Das empfangene Signal wird von einem Multiplexer und dem Computerprogramm BIAM verarbeitet, so dass man beispielsweise das in Abbildung 6 dargestellte Bild erhält, auf dem links im großen Fenster die Schichtdickenänderungen gegen die Zeit aufgetragen werden.

Für die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Versuche spielt der zweite Messkanal im Übrigen keine Rolle. Er ist nur dann interessant, wenn die Beschichtung der Oberfläche – z.B. mit Antikörpern – im Gerät selbst durchgeführt werden kann. Diese Beschichtung würde man dann nur auf Flusskanal 1 aufbringen, den Messchip anschließend um 90° drehen und den entsprechenden Bindungspartner zugeben. Bei der Drehung des Chips liegt Messkanal 1 auf der zuvor im Flusskanal 1 aufgebrachten Beschichtung, Messkanal 2 auf einer unbeschichteten Stelle. Auf diese Weise können dann im Messkanal 2 unspezifische Bindungen gemessen und vom Signal in Messkanal 1 durch die Software subtrahiert werden [Manual BIAffinity, 2006].

In der folgenden Abbildung wird das entsprechende Vorgehen schematisch dargestellt:

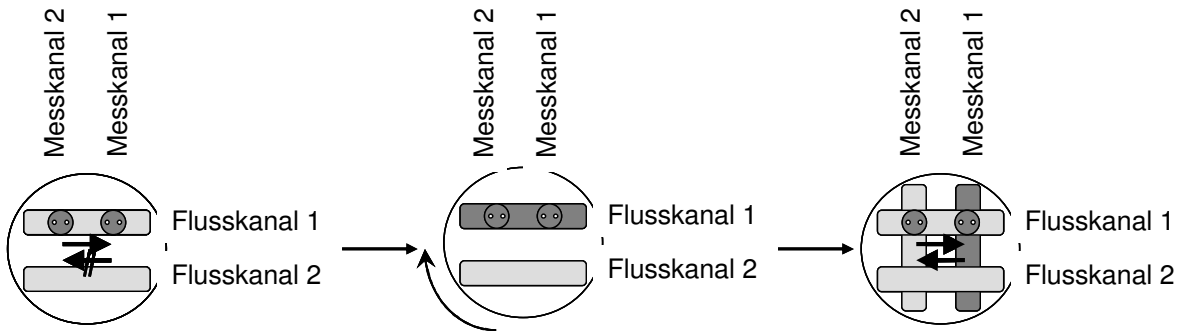


Abbildung 10: Messung spezifischer und unspezifischer Bindungen. Zuerst wird Flusskanal 1 mit dem Beschichtungsreagenz behandelt, Flusskanal 2 wird nicht benutzt (linkes Bild). Es ergeben sich ein beschichteter und ein unbeschichteter Kanal (mittleres Bild). Der Messchip wird um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, so dass der beschichtete Teil auf Messkanal 1 zu liegen kommt und der unbeschichtete Teil auf Messkanal 2 (Referenzkanal) (rechtes Bild).

Da eine Beschichtung im Gerät wegen der zu aggressiven Beschichtungsreagenzien nicht möglich war, wurde diese Option nicht genutzt. Messkanal 1 und 2 müssten also dieselben Signale liefern. Da es trotzdem zu Unterschieden kam, wurde grundsätzlich das Signal von Messkanal 1 für die Auswertung verwendet.

1.2.2 Spektralphaseninterferenz (SPI)

Das Messprinzip der Spektralphaseninterferenz unterscheidet sich nur unwesentlich vom Messprinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Auch hier wird ein durch Interferenzen moduliertes Reflektionsspektrum aufgenommen, bei dem es je nach Schichtdickenänderung zu Veränderungen des Musters kommt.

Zwei entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden sind jedoch anzusprechen: Einerseits gibt es Unterschiede zwischen den Glasträgern, auf denen eine dem Versuchsaufbau entsprechende Oberflächenfunktionalisierung vorgenommen wird. Der andere Unterschied betrifft die Strahlungsquelle.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, wird bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie als Lichtquelle eine Halogenlampe verwendet; es handelt sich also um einen Strahler, der Weißlicht in einer großen Bandbreite aussendet. Bei der Spektralphaseninterferenz verwendet man Strahlungsquellen mit einem schmalen Emissionsspektrum wie z.B. Laserdioden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die sensitive Schicht, an deren Grenzflächen die Interferenz entsteht, dicker ist als die Kohärenzlänge des eingestrahlten Lichts. Der Glasträger wird so ausgewählt, dass sich ihr Brechungsindex so gut wie nicht von der aufzubringenden biomolekularen Schicht

unterscheidet. Auf diese Weise wird die sensitive Schicht dick genug, um messbare Interferenzen bilden zu können.

Damit ist der zweite Unterschied zur Reflektometrischen Interferenzspektroskopie auch schon angesprochen. Dort war auf dem Glas eine Schicht aus Tantalpentoxid aufgelagert, darüber eine weitere Siliciumoxid-Schicht, um eine ausreichende Schichtdicke für die Interferenzentstehung zu gewährleisten. Bei den SPI-Messchips erübrigt sich eine solche zusätzliche metallische Beschichtung aus den genannten Gründen.

In der folgenden Abbildung 11 ist der Aufbau des Spektralphaseninterferometers schematisch dargestellt:

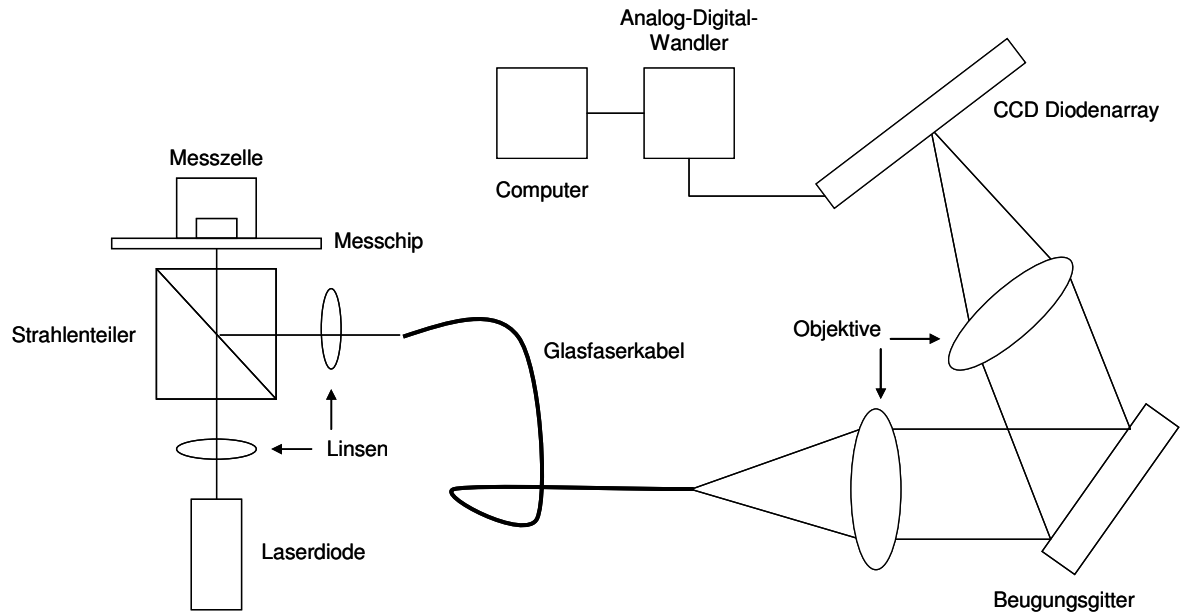


Abbildung 11: Aufbau des Spektralphaseninterferometers

Die Lichtquelle beim Spektralphaseninterferometer ist eine superlumineszierende Laserdiode, die Licht einer Wellenlänge von 850 nm ausstrahlt. Durch die Linse wird der Strahl parallel gerichtet bevor er auf den Strahlenteiler trifft. Ein Teil des Strahls trifft dann auf den planparallelen Messchip, auf dem die sensitive Schicht immobilisiert wurde. Die reflektierte Strahlung wird erneut im Strahlenteiler geteilt, ein Teil dieser Strahlung wird dann nach Bündelung durch die nächste Linse durch ein Glasfaserkabel zum Spektrometer geleitet. Dieses besteht aus zwei gleichartigen Objektiven, einem dazwischen liegenden Beugungsgitter und einem CCD Diodenarray. Das eingehende analoge Signal wird digitalisiert und in einem Computer weiterverarbeitet. Nach einer Fourier-Transformation, Sinus- und Cosinus-Transformationen, einer Phasenbestimmung und der Berechnung der Schichtdickenänderung wird das Signal gegen die Zeit aufgetragen und als Sensogramm

dargestellt. Wegen der Art der durchgeführten Berechnungen können Schichtdickenänderungen „nur“ bis 200 nm gemessen werden.

Anders als bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie wird bei der Spektralphaseninterferenz nicht nur die seitliche Verschiebung eines einzelnen Minimums im Interferenzspektrum beobachtet, sondern das Verhalten mehrerer Extrema in einem bestimmten Bereich des Spektrums untersucht. Dabei kann sowohl von der seitlichen Verschiebung der Extrema als auch von der Veränderung der Abstände zwischen den Extrema auf die Schichtdickenänderung geschlossen werden. Dadurch, dass mehrere Extrema zur Berechnung herangezogen werden, ist die Messung genauer [Nikitin et al., 2000].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Es sollte eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe sich ein antibakterieller Arzneistoff so in oder auf einer Harnleiterschiene immobilisieren lässt, dass eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung über einen möglichst langen Zeitraum erfolgt.

Für die Auswahl eines geeigneten Wirkstoffes und einer geeigneten Immobilisierungsmethode sollten zunächst Modellversuche auf Basis der Spektralphaseninterferenz oder der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie durchgeführt werden.

Die Freisetzungseigenschaften der entwickelten Abwandlung der Harnleiterschiene sollten bestimmt werden; dies eignet sich auch gut als Instrument zur Weiterentwicklung einer geeigneten Immobilisierungsmethode.

Weiterhin sollte eine Beurteilung der vom Projektpartner NTTF gelieferten, mit amorphem Kohlenstoff beschichteten Proben hinsichtlich der die Freisetzung beeinflussenden Eigenschaften stattfinden.

Schließlich war es noch notwendig, nachzuweisen, dass die entwickelte Methode zur Immobilisierung eines antibakteriell wirksamen Stoffes auch insoweit erfolgreich ist, als dass ein messbarer Vorteil hinsichtlich der Keimbesiedelung gegenüber einer unbehandelten Probe besteht. Dazu sollten mikrobiologische Arbeitstechniken angewandt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
Agar	Acros, New Jersey, USA
3-Aminopropyltriethoxysilan purum	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniak 25% p.a.	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natrium	AppliChem, Darmstadt
Benzalkoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bernsteinsäureanhydrid puriss.	Fluka, Buchs, Schweiz
Biotinylierter Antikörper	Jackson Immuno Research, New Market, UK
t-Butanol HPLC grade	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cetylpyridiniumchlorid (= Hexadecylpyridinium-chlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform p.a.	Acros, New Jersey, USA
Dichlormethan für GC	Merck, Darmstadt
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid puriss.	Fluka, Buchs, Schweiz
Dioxan purum	Fluka, Buchs, Schweiz
Escherichia coli BL 21 K 40	Qiagen über Merck, Darmstadt
Essigsäure 25% p.a.	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethacridinlactat 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol für LC	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt für die Mikrobiologie	AppliChem, Darmstadt
Hexadecylamin 90% technisch	Fluka, Buchs, Schweiz

Chemikalie	Bezugsquelle
N-Hydroxysuccinimid zur Synthese	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid p.a.	Acros, New Jersey, USA
Kaliumdihydrogenphosphat reinst	Merck, Darmstadt
Methanol für GC (Coating), für HPLC sonst	beides Merck, Darmstadt
Natriumacetat p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat suprapure	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid p.a.	KMF, Lohmar
Octadecyltriethoxysilan technisch	Fluka, Buchs, Schweiz
Polyurethan-Pellets mit 20% Bariumsulfat	Urotech, Achenmühle
Schwefelsäure 96% p.a.	Merck, Darmstadt
Streptavidin 15,6 U/mg	Prozyme, Hayward, USA
Synthetischer Urin (Salzmischung)	Experimentelle Urologie, Uniklinik Bonn
Toluol für GC	Merck, Darmstadt
Trypton BioChemica	AppliChem, Darmstadt
Wasser, dest.	Pharm. Chemie, Marburg
Millipore®-Wasser	Pharm. Chemie, Marburg
Wasserstoffperoxid 30% suprapure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Acetat-Puffer pH 4,5 0,14 M	1,33 g Essigsäure 40% 0,41 g Natriumacetat auf 100 mL Wasser	Substanzen einwiegen, zu 100 mL in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
Acetat-Puffer pH 4,7 0,2 M	16,86 g Essigsäure 40% 8,2 g Natriumacetat auf 1 L Wasser	Substanzen einwiegen, zu 1 L in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
3-Aminopropyltriethoxy-silan-Lösung in Toluol 1%	100 µL 3-Aminopropyltriethoxy-silan auf 10 mL Toluol	
Ammoniumchlorid-Puffer pH 8,7 0,1 M	0,2 g Ammoniak 25% 5,35 g Ammoniumchlorid auf 1 L Wasser	Substanzen einwiegen, zu 1 L in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
Ammoniumchlorid-Puffer pH 9,0 0,08 M	0,36 g Ammoniak 25% 0,153 g Ammoniumchlorid auf 100 mL Wasser	Substanzen einwiegen, zu 100 mL in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
Benzalkoniumchlorid-Lösung in Ethanol 1%	100 mg Benzalkoniumchlorid auf 10 mL Ethanol	
Benzalkoniumchlorid-Lösung in Wasser 1% (Stammlösung)	1 g Benzalkoniumchlorid auf 100 mL Wasser	
Bernsteinsäureanhydrid-Lösung in Phosphatpuffer pH 6,0	1 g Bernsteinsäureanhydrid auf 25 mL Phosphatpuffer pH 6,0 Natronlauge 6N	Substanz lösen. Dabei muss der pH mit Natronlauge auf pH 6,0 gehalten werden.
Cetylpyridiniumchlorid-Lösung in Ethanol 1%	1 g Cetylpyridiniumchlorid auf 100 mL Ethanol	
Cetylpyridiniumchlorid-Lösung in Wasser 1% (Stammlösung)	1 g Cetylpyridiniumchlorid auf 100 mL Wasser	

Ethacridinlactat-Lösung in Aceton 0,5%	500 mg Ethacridinlactat auf 50 mL Wasser und 50 mL Aceton	Zunächst Ethacridinlactat in Wasser lösen, anschließend die Lösung mit Aceton mischen.
Ethacridinlactat-Lösung in Dioxan 0,1%	100 mg Ethacridinlactat auf 10 mL Wasser und 90 mL Dioxan	Zunächst Ethacridinlactat in Wasser lösen, anschließend die Lösung mit Dioxan mischen.
Ethacridinlactat-Lösung in Ethanol 1%	1 g Ethacridinlactat auf 100 mL Ethanol	
Ethacridinlactat-Lösung in Methanol 1%	1 g Ethacridinlactat auf 100 mL Methanol	
Ethacridinlactat-Lösung in Wasser 1% (Stammlösung)	1 g Ethacridinlactat auf 100 mL Wasser	
Ethacridin-Lösung in Toluol	5 mL Ethacridinlactat-Lösung in Wasser 1% 5 mL Natronlauge 6N 45 mL Toluol	Ethacridinlactat-Lösung und Natriumhydroxidlösung in einem Scheidetrichter zusammengeben und viermal mit Toluol ausschütteln (einmal mit 15 mL, dann dreimal mit 10 mL). Gesammelte Toluolphasen am Rotationsverdampfer einengen und Konzentration bestimmen.
Luria-Bertani-Agar	5 g Trypton 2,5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 7,5 g Agar auf 500 mL Wasser	Substanzen in eine 1 L Flasche einwiegen, zu 500 mL mit Wasser auffüllen, autoklavieren. Der Agar löst sich erst in der Hitze.
Luria-Bertani-Medium	5 g Trypton 2,5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt auf 500 mL Wasser	Substanzen einwiegen, zu 500 mL mit Wasser auffüllen. Nach dem Lösen auf Reagenzgläser mit Cap-o-test-Deckeln verteilen.

Luria-Bertani-Weichagar	5 g Trypton 2,5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 2,5 g Agar auf 500 mL Wasser	Substanzen in eine 1 L Flasche einwiegen, zu 500 mL mit Wasser auffüllen, autoklavieren. Der Agar löst sich erst in der Hitze.
Natronlauge 6 N	240 g Natriumhydroxid auf 1 L Wasser	
Natronlauge pH 8		Frisch herstellen, da extrem instabil: Wasser vorlegen, 1 Tropfen einer beliebigen Natriumhydroxidlösung zugeben und solange mit Wasser verdünnen, bis der pH wieder auf 8 gesunken ist.
Octadecyltriethoxysilan-Lösung in Toluol 1%	100 µL Octadecyltriethoxysilan auf 10 mL Toluol	
PBS pH 7,3 0,012 M	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat auf 1 L Wasser	Substanzen einwiegen, zu 1 L in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
Phosphatpuffer 0,05 M pH 6,0	7,8 g Natriumdihydrogenphosphat auf 1 L Wasser	Substanz einwiegen, zu 1 L in Wasser lösen, pH einstellen und sterilfiltrieren
Piranhalösung	60 mL Schwefelsäure 96% 40 mL Wasserstoffperoxid 30%	

2.1.3 Geräte und Materialien

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller/Bezugsquelle
Analysenwaage CP225D-0CE	Sartorius, Göttingen
BIAffinity	Analytik Jena AG, Jena
CO_2-Inkubator Hepa Class 100	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Einmalpipetten 25 mL, Stripette®	Vitaris, Baar
Fluoreszenzplattenreader Safire II	Tecan, Crailsheim
Geldokumentationsanlage Bio-Vision-3026	Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Frankreich
Heizblock für Eppendorf-Caps:	
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
HTM 130	Haep Labor Consult, Bovenden
Heizplatte mit Rührer:	
IKAmag Ret-G	IKA® Works Inc., Wilmington
IKA-Combimag Ret	IKA® Works Inc., Wilmington
Laminar Airflow Hera safe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Mikroskopische Deckgläschen für die SPI	Senova GmbH, Jena
Mikrotiterplattenreader Multiskan EX	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Multipette® plus und Aufsätze (10 mL, 25 mL, 50 mL)	Eppendorf, Hamburg
Oberschalenwaage	Mettler, Zürich
Petrischalen	greiner bio-one, Solingen
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Pipetten:	
5 mL, 1 mL, 200 µL, 20 µL	Eppendorf, Hamburg
1 mL, 200 µL Finnpipetten	Thermo Scientific, Langenselbold
Pipettenspitzen	
200 µL, 1 mL	Brand, Wertheim
200 µL, 1 mL, 5 mL	Eppendorf, Hamburg
200 µL	Sarstedt, Nürnbrecht

Gerät/Material	Hersteller/Bezugsquelle
Probenröhrchen 15 mL, 50 mL	Greiner
Reagenzgläser mit Deckel für Bakterienaufzucht (Cap-o-test)	Novoglas, Bern
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Rotationsverdampfer:	
Glasteile	Büchi, Essen
Pumpe und Steuerung	Vacuubrand, Wertheim
Schlauchpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schüttler IKA-Vibrax VXR	IKA® Works Inc., Wilington
Schüttler Titramax 101	Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Spektralphaseninterferometer	General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moskow (Russland)
Spektralphotometer Nicolet evolution 100	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Spincoater SCI-50	Novocontrol, Hundsangen
Tischautoklav Tuttnauer 3850 EL	Systec GmbH, Wettenberg
UV-Lampe	Lamag
Vortexer:	
Bioblock Scientific	IKA® Works Inc., Wilmington
TTS2 yellowline	IKA® Works Inc., Wilmington

2.2 Methoden

2.2.1 Wirkstoffimmobilisierung

2.2.1.1 Wirkstoffimmobilisierung auf Messchips über ein Spacer-Molekül

2.2.1.1.1 Erzeugung einer Carboxyloberfläche auf den Messchips für SPI und RIfS

Für die Spektralphaseninterferenz-(SPI)-Messungen werden als Messchips mikroskopische Deckgläschen mit einer Dicke von 100 µm verwendet(Senova GmbH, Jena). Die Glasträger für die Messungen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) dagegen sind etwa 1 mm dick und bestehen aus drei Teilen: Auf den Glasträger ist eine dünne Schicht Tantalpentoxid Ta_2O_5 aufgebracht, darauf befindet sich wiederum eine dünne Schicht Siliciumdioxid SiO_2.

Für die Messungen werden beide Arten von Glasträgern auf die gleiche Weise vorbereitet.

Zunächst werden sie aufgereinigt und hydrophilisiert. Dazu werden die Träger in je 10 mL 6N Natronlauge für 2 Minuten unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend werden sie in viermal 20 mL Millipore®-Wasser für je 45 Sekunden unter Schütteln gespült. Danach erfolgt eine 30-minütige Behandlung mit je 10 mL Piranhalösung, wiederum unter Schütteln (300 rpm). Die Piranhalösung setzt sich aus 6 mL Schwefelsäure 96% und 4 mL Wasserstoffperoxid 30% zusammen. Danach werden die Glasträger wiederum mit viermal 20 mL Millipore®-Wasser gespült. Bei dem Spülvorgang kann kontrolliert werden, ob die Behandlung erfolgreich war. Hat nämlich eine Hydrophilisierung der Oberfläche stattgefunden, so ist diese nun mit Wasser benetzbar.

Nach der Hydrophilisierung sollte die Oberfläche wie folgt aussehen:

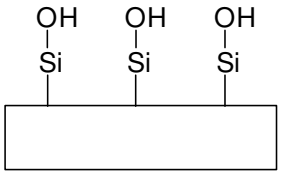


Abbildung 12: Oberfläche des Glasträgers nach Aufreinigung und Hydrophilisierung

Zur Weiterverarbeitung werden die Deckgläschen ohne vorheriges Trocknen dreimal mit je 20 mL Methanol gespült, danach mit dreimal 20 mL Toluol. Das Spülen mit Methanol ist erforderlich, weil die Glasträger sonst nicht mit Toluol benetzbar wären. Das Spülen mit Toluol ist erforderlich, weil das im Anschluss zuzugebende 3-Aminopropyltriethoxysilan als 1%-ige Lösung in Toluol vorliegt. Bei Kontakt mit Sauerstoff polymerisiert das Silan und

bildet eine gleichmäßige, aminofunktionalisierte Oberfläche. Die Reaktionsdauer hierfür beträgt 6 Stunden.

Die Reaktion ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

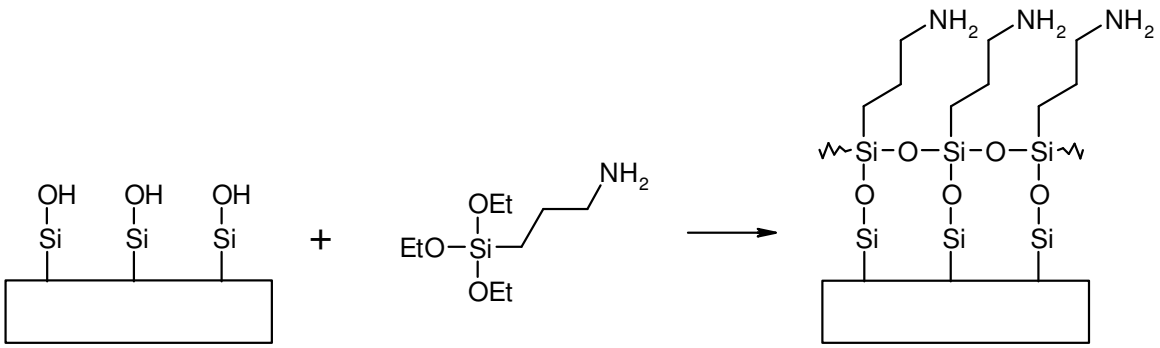


Abbildung 13: Reaktion der hydrophilen Glasoberfläche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan

Alternativ kann die Aminooberfläche auch erzeugt werden, indem bei der Plasmabeschichtung mit amorphem Kohlenstoff Ammoniak zugesetzt wird. Dieser Schritt wird vom Projektpartner NTTF Coatings GmbH durchgeführt. Da bei einer Beschichtung der Harnleiterschienen in der Praxis dieses Verfahren Anwendung finden würde, wird auch die Kopplung an diese Oberfläche untersucht.

Die folgenden Schritte werden für beide Aminooberflächen analog durchgeführt.

Um die Aminooberfläche zu einer Carboxyloberfläche umzusetzen, erfolgt eine Behandlung mit Bernsteinsäureanhydrid. Dazu werden die Glasträger zunächst dreimal mit je 20 mL Toluol gespült, dreimal mit je 20 mL Methanol und schließlich viermal mit je 20 mL Millipore®-Wasser. Zwischenzeitlich wird pro Deckgläschen 1 g Bernsteinsäureanhydrid in 25 mL Phosphatpuffer pH 6,0 gelöst. Während des Lösungsvorganges muss der pH-Wert mit Natronlauge auf etwa 6 gehalten werden, da sich die Substanz sonst nicht löst. In dieser Lösung von Bernsteinsäureanhydrid in Phosphatpuffer pH 6 werden die Deckgläschen nach dem Spülen für 16 Stunden unter Schütteln (300 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert.

Es läuft die folgende Reaktion ab:

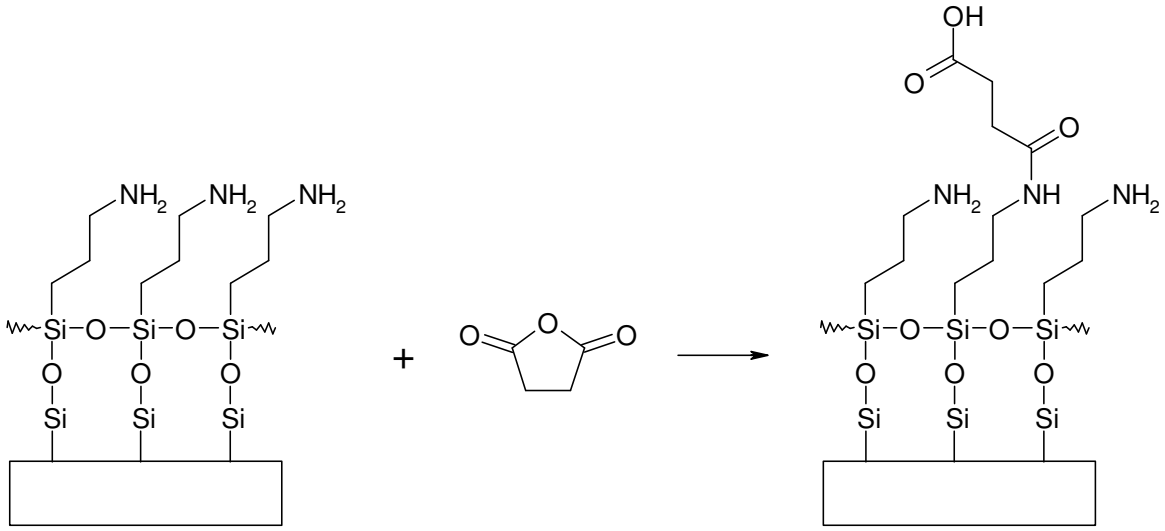


Abbildung 14: Umsetzung der Aminogruppen mit Bernsteinsäureanhydrid

Am nächsten Tag werden die Glasträger erneut viermal mit je 20 mL Wasser gespült und anschließend im Exsiccator mit Unterdruck getrocknet.

Die weitere Behandlung erfolgt online, d.h. im Messgerät.

2.2.1.1.1.1 Messung am Spektralphaseninterferometer

Am Messgerät werden über die Steuerungssoftware folgende Parameter eingestellt: Exposure 440, Intensität der Laserdiode zunächst 3300. Die Intensität wird gegebenenfalls so verstellt, dass das Interferenzspektrum komplett, aber möglichst groß abgebildet wird. Die Pumpe wird auf 20 rpm eingestellt und die Flussrate über die Stellschraube an der Pumpe so variiert, dass 20 Tropfen Wasser pro Minute durch das System gepumpt werden.

Der Glasträger wird zunächst mit Wasser gespült, wobei schon eine Aufzeichnung des Sensogramms erfolgt. Sobald eine stabile Basislinie erreicht ist, erfolgt über 2 Minuten eine Zugabe von Natronlauge pH 8. Dadurch werden die Carboxylgruppen deprotoniert. Die Natronlauge ist unmittelbar vor der Messung frisch anzusetzen, da sie durch das Kohlendioxid aus der Luft innerhalb von Minuten neutralisiert wird. Im Anschluss wird 2 Minuten mit Wasser gespült, erst danach erfolgt die Zugabe der Wirkstofflösung. Diese wird so lange über den Glasträger gepumpt, bis keine Schichtdickenzunahme mehr stattfindet. Anschließend wird noch einmal mit Wasser gespült, um zu testen, ob die Bindung des Wirkstoffes stabil ist.

Die Bindung der Wirkstoffe an die Carboxyloberfläche ist mit Ethacridinlactat als Stellvertreter für alle drei Stoffe dargestellt:

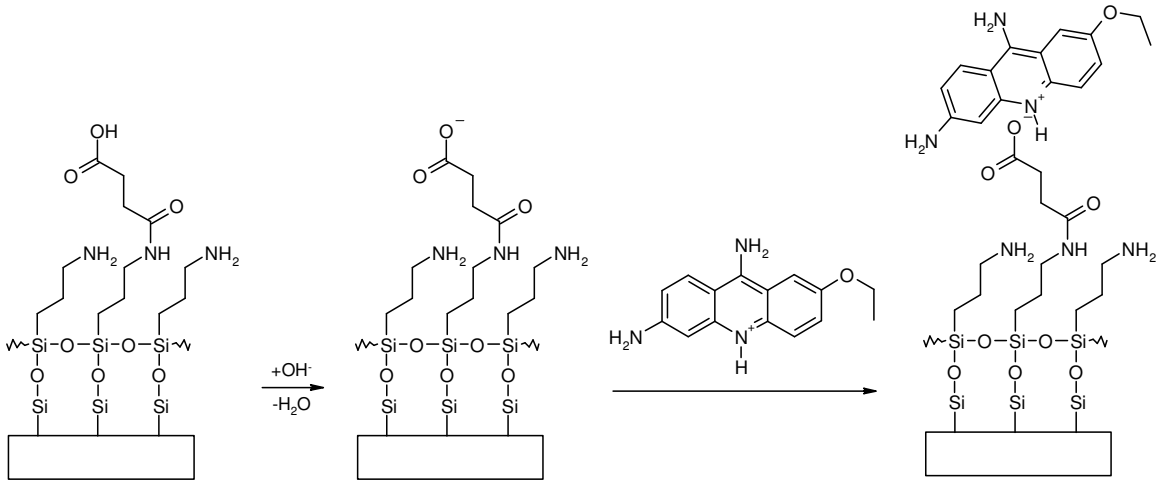


Abbildung 15: Deprotonierung der Carboxylgruppe und ionische Bindung des Wirkstoffes am Beispiel des Ethacridinium-Kations

2.2.1.1.1.2 Messung am Reflektometrischen Interferenzspektrometer

Beim Einlegen des Chips in das Messgerät ist darauf zu achten, dass die dünne SiO_2-Schicht nach oben gerichtet ist. Mit bloßem Auge ist ggf. schwer zu erkennen, welche Seite die richtige ist. Zum Überprüfen eignet sich hier das Interferenzspektrum, das von der Software ausgegeben wird und sich im oberen rechten Bereich des Bildschirms befindet (vgl. Abbildung 6). Stehen an der y-Achse Werte in der Größenordnung von 150, so liegt der Chip richtig, bei Werten um die 25 falsch herum, also mit der Unterseite nach oben.

Am RIfS-Gerät kann – im Gegensatz zum SPI-Gerät – an der Optik nichts eingestellt werden, es ist jedoch möglich, ein Protokoll für die Fluidik zu programmieren.

Bei den ersten Messungen wurde Natronlauge pH 8 zugegeben; als sich jedoch kein Effekt zeigte, wurden stattdessen verschiedene Puffer oder reines Wasser verwendet. Die Messungen, bei denen die Natronlauge zugegeben wurde, sind in dieser Arbeit nicht protokolliert, da diese sich im Nachhinein als fehlerhaft erwiesen: Der Messchip war falsch herum in das Gerät eingelegt worden.

Die Methode, die für die vorliegenden Ergebnisse verwendet wurde, beinhaltet zunächst ein Spülen des Messchips mit Wasser, Acetatpuffer pH 4,7 0,2 M, PBS pH 7,3 0,012 M oder Ammoniumchlorid-Puffer pH 8,7 0,1 M für fünf Minuten bei einer Flussrate von 10 µL/min. Danach werden aus dem ersten von fünf Probenports 200 µL der jeweiligen Wirkstofflösung

in die Probeschleife geladen, die im Anschluss mit einer Flussrate von 5 µL/min entleert wird. Nach der Entleerung der Probeschleife wird der Messchip für 25 Minuten mit Wasser oder dem jeweiligen Puffer gespült, wobei die Flussrate in den ersten 5 Minuten auf 5 µL/min eingestellt und für die restliche Zeit auf 10 µL/min erhöht wird.

2.2.1.1.2 Vorbereitung einer C_{18}-Oberfläche auf SPI-Messchips für Kontrollversuche

Die ersten vorbereitenden Schritte zum Erzeugen einer C_{18}-Oberfläche auf dem Glasträger sind identisch mit denen zur Erzeugung einer Carboxyloberfläche.

Der Chip wird zunächst mit 6N Natronlauge und Piranha-Lösung gereinigt. Dazu wird der Glasträger für 2 Minuten in der Natronlauge bei 300 rpm inkubiert und im Anschluss mit viermal 20 mL Millipore®-Wasser unter Schütteln für 45 Sekunden gespült, bevor er in 10 mL Piranha-Lösung (6 mL Schwefelsäure 96% und 4 mL Wasserstoffperoxid 30%) überführt wird, worin er 30 Minuten unter Schütteln inkubiert wird. Anschließend wird der Chip wieder viermal mit je 20 mL Millipore®-Wasser, dann dreimal mit je 20 mL Methanol und schließlich dreimal mit je 20 mL Toluol gespült.

Der Glasträger wird dann in einer einprozentigen Lösung von Octadecyltriethoxysilan in Toluol für sechs Stunden unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Dabei läuft die folgende Reaktion ab:

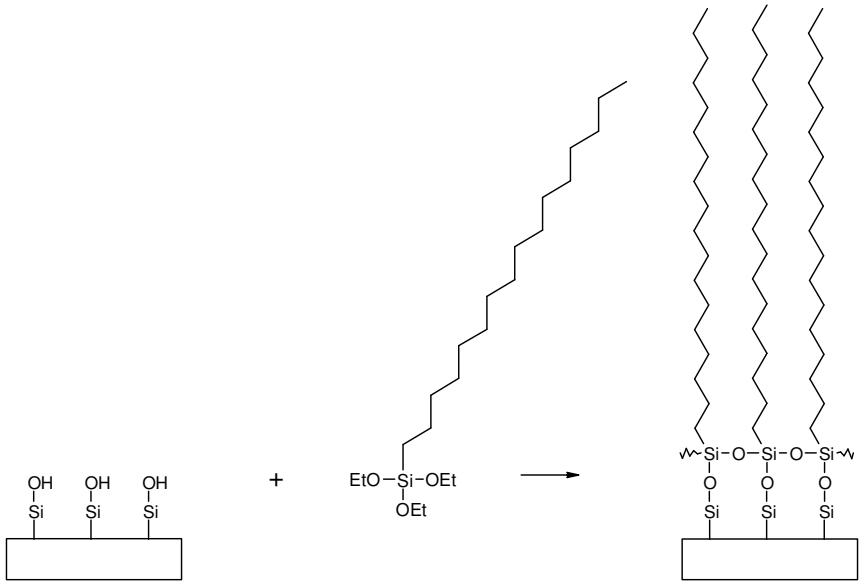


Abbildung 16: Einführung einer C_{18}-Beschichtung durch Umsetzen mit Octadecyltriethoxysilan

Schließlich wird der Glasträger noch dreimal mit je 20 mL Toluol gespült und im Exsiccator getrocknet.

2.2.1.1.3 Wirkstoffeinbringung in eine Polyurethanschicht auf einem SPI-Messchip

Die Polymerschicht wird durch Spincoating auf die Glasträger aufgebracht. Die entsprechende Polyurethanlösung wird hergestellt, indem die Polyurethan-Pellets in Chloroform gelöst werden. Das als Kontrastmittel enthaltene Bariumsulfat löst sich in Chloroform nicht und muss abzentrifugiert werden. Die verbliebene Lösung wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, die Auswaage bestimmt und mit Chloroform zu einer Konzentration von 5% gelöst.

Es erfolgt im Anschluss eine Verdünnung auf Konzentrationen von 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% und 0,2%. Von diesen Verdünnungen werden jeweils 200 µl oder 400 µl auf den Glasträger pipettiert. Das Spincoating erfolgt bei 100 rps für 1 Minute.

Die Wirkstoffeinbringung erfolgt online am SPI-Messgerät.

Am Messgerät werden über die Steuerungssoftware folgende Parameter eingestellt: Exposure 440, Intensität der Laserdiode zunächst 3300. Die Intensität wird gegebenenfalls so verstellt, dass das Interferenzspektrum komplett, aber möglichst groß abgebildet wird. Die Pumpe wird auf 20 rpm eingestellt und die Flussrate über die Stellschraube an der Pumpe so variiert, dass 20 Tropfen Wasser pro Minute durch das System gepumpt werden.

Es wird solange Wasser über die Polyurethan-Schicht geleitet, bis sich eine stabile Basislinie ergibt. Das kann einige Zeit in Anspruch nehmen, da die Polyurethan-Matrix aufquillt. Danach werden Wirkstofflösungen verschiedener Konzentrationen über den Glasträger geleitet und das Bindungsverhalten in einem Sensogramm aufgezeichnet. Wenn keine weitere Schichtdickenänderung mehr stattfindet, wird der Messchip wieder mit Wasser gespült, um festzustellen, ob sich der Wirkstoff wieder aus dem Polyurethan auswaschen lässt.

2.2.1.1.4 Kontrolle des Erfolgs der Carboxylbeschichtung bei den RIfS-Chips

Ausgangspunkt sind die RIfS-Chips mit der Carboxyloberfläche.

Diese Chips wurden je zweimal mit 20 mL Wasser, Ethanol und schließlich mit *t*-Butanol gespült. Anschließend wurden die Chips unter Schütteln (300 rpm) 4 Stunden in einer Lösung von 0,2 g N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,4 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 mL *t*-Butanol inkubiert. Anschließend wurden die Proben wieder je zweimal mit 20 mL *t*-Butanol, Ethanol und Wasser gespült.

Die Proben wurden dann unter Schütteln (300 rpm) in einer Streptavidin-Lösung in PBS pH 7,3 0,012 M (Konzentration 20 µg/mL) über Nacht inkubiert. Gespült wurde mit fünfmal

20 mL PBS pH 7,3 0,012 M, die Chips wurden bis zur Messung in eben diesem Puffer gelagert.

Die an der Oberfläche stattfindende Reaktion ist in der folgenden Abbildung dargestellt [Vornicescu, 2007]:

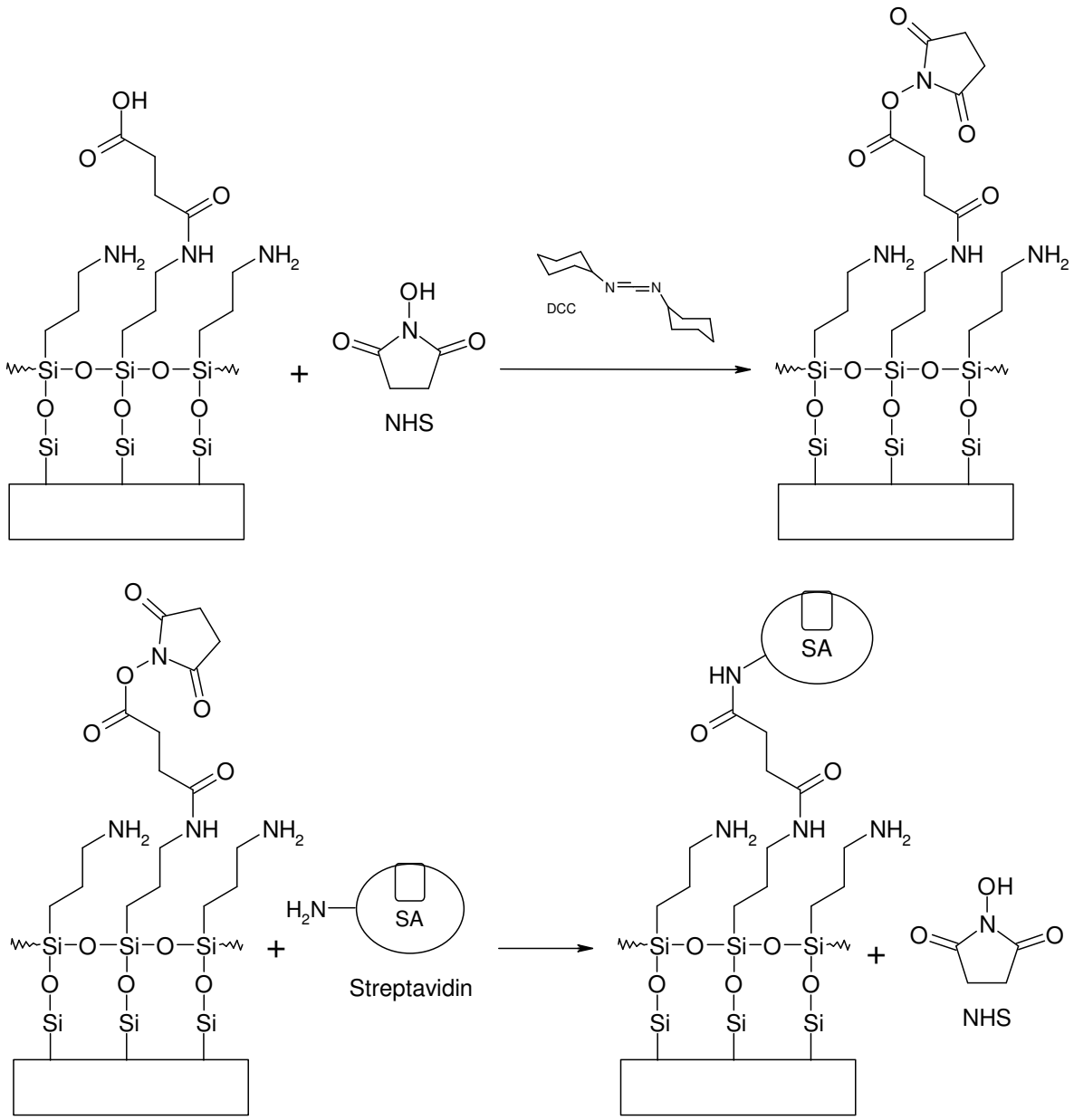


Abbildung 17: Immobilisierung von Streptavidin auf einer carboxylierten Oberfläche

Die Messung wurde analog der in Abschnitt 2.2.1.1.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Als Fließmittel wurde Wasser verwendet, als Probe 200 µL biotinylierter Kaninchen-Antikörper aus der Ziege in einer Konzentration von 0,24 mg/mL.

Die Bindung ist in Abbildung 18 dargestellt:

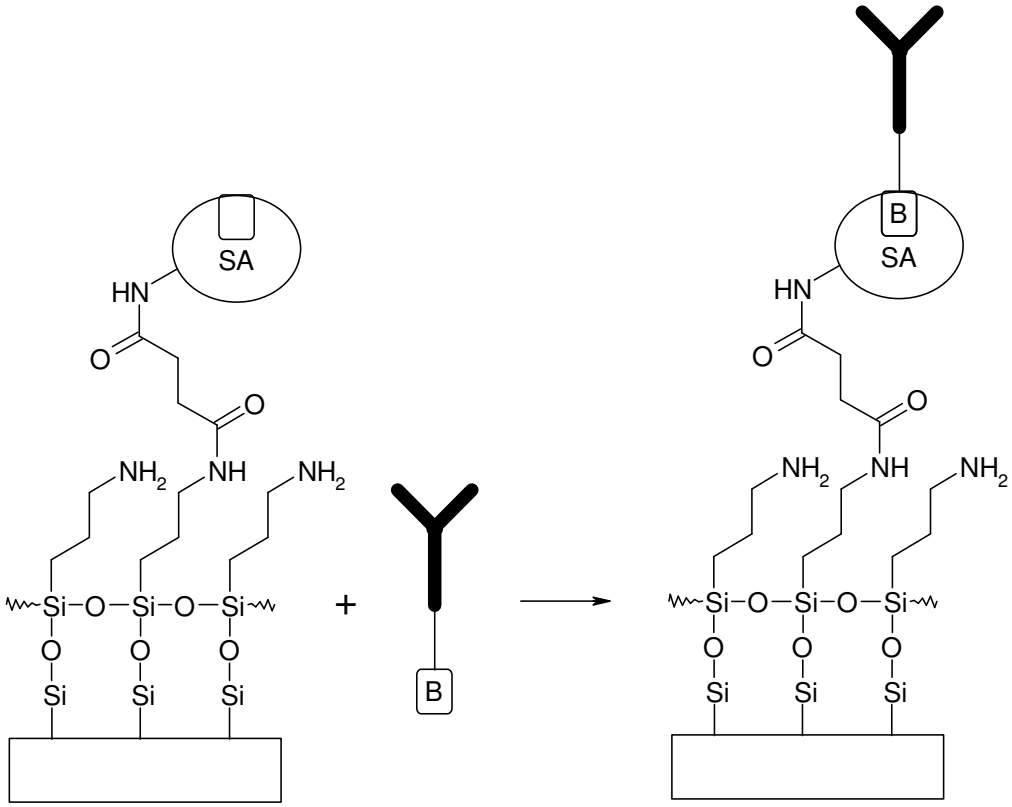


Abbildung 18: Bindung eines biotinylierten Antikörpers an eine Streptavidin-Oberfläche

Aufgrund der spezifischen Affinität von Streptavidin und Biotin müsste sich eine stabile Schichtdickenzunahme ergeben. Ist dies nicht der Fall, so wurde Streptavidin zuvor nicht stabil an die Oberfläche gebunden, was ein Zeichen dafür wäre, dass die Carboxylbeschichtung oder einer der darauf folgenden Schritte nicht erfolgreich war.

2.2.1.2 Wirkstoffeinbringung in die Polyurethanmatrix der Schläuche

2.2.1.2.1 Charakterisierung der gelieferten wirkstofffreien Schläuche

Zur Untersuchung der Freisetzungseigenschaften der Harnleiterschienen wurden vom Projektpartner Urotech Polyurethan-Schläuche geliefert, die bei NTTF mit amorphem Kohlenstoff beschichtet wurden. Die Beschichtungen können funktionalisiert werden, indem in das Ethylengas, das auf dem Material abgeschieden wird, verschiedene Gase eingeleitet werden.

So lässt sich beispielsweise durch das Einleiten von Ammoniak eine Aminofunktionalisierung der Beschichtung herbeiführen. Die Abkürzung für diese Schläuche lautet DLC-NH3.

Durch die Einleitung von Sauerstoff entstehen vermutlich Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen an der Oberfläche. Die Beschichtung wird DLC-O genannt.

Weitere gelieferte Schläuche tragen die Bezeichnungen DLC-F für Fluor, DLC-K und DLC2. Letztere Beschichtungen sind nicht funktionalisiert.

Auch unbeschichtete Schläuche wurden für Vergleichszwecke geliefert.

2.2.1.2.2 Behandlung der Schläuche zur Wirkstoffeinbringung

Die unterschiedlich plasmabeschichteten und die unbeschichteten Schläuche (s. Abschnitt 2.2.1.2.1) werden in 10 mm lange Stücke für den Agardiffusionstest (Abschnitt 2.2.3) und die ersten Freisetzungsversuche und in 5 mm lange Stücke für die späteren Freisetzungsversuche (Abschnitt 2.2.2) und die weiteren mikrobiologischen Tests (Abschnitt 2.2.4) geschnitten. Als Kontrolle werden unbeschichtete Schläuche ebenso behandelt.

Die Inkubation erfolgt in organischen Lösungsmitteln, die Ethacridinlactat enthalten oder in wässriger Ethacridinlactat-Lösung. Die Lösungsmittel sollen die Polyurethan-Matrix aufquellen lassen, so dass sich der Wirkstoff einlagern kann. Zur Kontrolle werden auch Schläuche in den wirkstofffreien Lösungsmitteln gequollen.

Die zu untersuchenden Lösungsmittel sind Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Dioxan, Ethanol, Methanol, Toluol und Wasser.

Da sich Polyurethan in chlorhaltigen Lösungsmitteln auflöst, entfallen Chloroform und Dichlormethan als Quellmittel.

Die Herstellung der Ethacridinlactat-Lösungen in Ethanol, Methanol und Wasser gestaltet sich einfach, da der Wirkstoff sich in diesen Lösungsmitteln löst. Es werden einprozentige Lösungen hergestellt, in denen die Schlauchstücke 3,5 Stunden quellen.

Etwas schwieriger ist die Herstellung der Ethacridinlactat-Lösungen in Aceton, Dioxan und Toluol, da sich der Wirkstoff in diesen Lösungsmitteln nicht löst. Aceton und Dioxan sind mit Wasser mischbar. Daher wird zunächst eine einprozentige wässrige Ethacridinlactat-Lösung hergestellt, die dann mit Aceton im Verhältnis 1:1 und mit Dioxan im Verhältnis 1:10 vermischt wird. Daraus resultiert für die Ethacridinlactat-Lösung in Aceton eine Konzentration von 0,5% und für die Lösung in Dioxan eine Konzentration von 0,1%. Die Quelldauer in Aceton beträgt ebenfalls 3,5 Stunden. Da Dioxan das Polyurethan-Material sehr stark angreift, werden die Schlauchstücke hierin nur 1 Stunde gequollen.

Die Herstellung der Ethacridinlactat-Lösung in Toluol ist besonders aufwändig. Als Lactat löst sich der Stoff nicht, als Base ist er nicht erhältlich, und Toluol ist nicht mit Wasser mischbar. In Mischungen von Toluol mit Methanol lösen sich die Schläuche auf. Da sich Ethacridin-Base in Toluol löst, wird das Lactat in diese überführt, indem 5 mL einer wässrigen einprozentigen Ethacridinlactat-Lösung mit 5 mL einer 6N Natronlauge versetzt werden. Die Base löst sich nicht in Wasser und wird im Scheidetrichter in Toluol ausgeschüttelt. Dazu werden zunächst 15 mL Toluol verwendet, danach wird noch dreimal mit je 10 mL Toluol ausgeschüttelt. Die Konzentration der Ethacridin-Base in Toluol ist zunächst noch unbekannt. Sie wird dadurch bestimmt, dass ein definiertes Volumen im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und anschließend ausgewogen wird. Zuvor erfolgt jedoch noch eine photometrische Vermessung bei 420 nm. Daraus wird eine Kalibriergerade erstellt, damit in der Zukunft die Konzentration schneller bestimmt werden kann. Die erzielbaren Ausbeuten sind sehr gering: sie liegen bei etwa 0,01%. Die Quelldauer in Toluol beträgt 3,5 Stunden.

Neben der Auswahl eines geeigneten Quellmittels muss auch untersucht werden, welchen Einfluss das Spülen der Schläuche nach dem Quellen hat. Dazu wird ein Teil der Schläuche gar nicht gespült, ein Teil mit dem wirkstofffreien Lösungsmittel, in dem die Schläuche gequollen wurden und ein Teil mit Wasser. Wenn gespült wird, dann dreimal mit je 20 mL Wasser oder Lösungsmittel.

Außerdem wird in Freisetzungsexperimenten untersucht, ob sich ein Unterschied in den Kinetiken ergibt, wenn die Schläuche vor dem Spülen erst getrocknet werden. Es ist denkbar, dass der Wirkstoff durch das Trocknen besser in die Matrix eingeschlossen werden kann.

Bei späteren Versuchen wird die Probenvorbereitung teilweise modifiziert.

Einige Schläuche mussten zum Sterilisieren am Stück verschickt werden. Die Schläuche werden dann in einem 100 mL Becherglas zusammengerollt und an eine Schlauchpumpe angeschlossen. In das Becherglas werden 40 mL der jeweiligen Quelllösung gegeben. Damit auch bei den 30 cm langen Schläuchen gewährleistet ist, dass die Wirkstofflösung mit dem gesamten Schlauchlumen in Berührung kommt, wird die Lösung mit einer Flussrate von 100 µL/min durch den Schlauch gepumpt. Auch hier beträgt die Einwirkdauer des Quellmittels in der Regel 3,5 Stunden, nur bei Dioxan 1 Stunde.

Der Aufbau der Apparatur ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

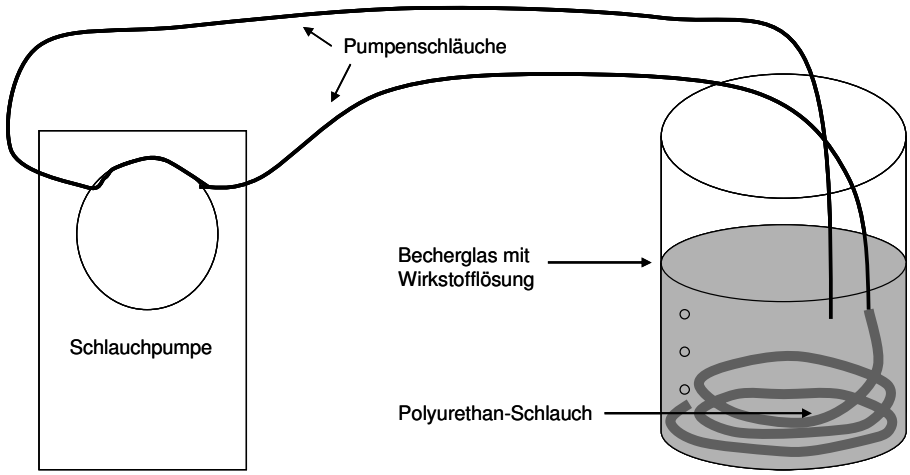


Abbildung 19: Aufbau zum Quellen ganzer Schläuche

Um die Schläuche zu spülen wird – ggf. nach dem Trocknen – Wasser oder das jeweilige reine Quellmittel in das Becherglas gegeben und mit einer Flussrate von 1 mL/min für 5 Minuten durch den Schlauch gepumpt. Von außen wird der Schlauch durch dreimaliges Spülen in je 40 mL Wasser oder reinem Quellmittel gereinigt.

Um Flüssigkeitsrückstände aus dem Schlauch zu entfernen, wird am Ende noch Luft durch den Schlauch gepumpt.

Da sich herausstellte, dass es bei den zuvor beschriebenen Spülverfahren teilweise zu großen Schwankungen der Messwerte kam, da sich anscheinend gelegentlich noch Wirkstoffpartikel im Schlauchinnern befanden, wurde bei den letzten Freisetzungsversuchen (Wiederholungen der Versuche in Abschnitt 3.3.5.1, sowie Abschnitt 3.3.5.2) die Spülmethode noch einmal verändert: Statt dreimal mit einem großen Volumen (20 mL) bei 300 rpm wurden die Schlauchstücke sechsmal mit einem kleinen Volumen (1 mL) Wasser bei 2500 rpm gespült.

Weiterhin werden für die mikrobiologischen Tests (Abschnitte 2.2.4 und 3.4.7) auch Proben mit Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid präpariert. Hierzu werden einprozentige Lösungen der beiden Stoffe in Ethanol hergestellt, in denen 5 mm lange Schlauchstücke mit DLC-K-Beschichtung ebenfalls 3,5 Stunden quellen. Für die Freisetzungsversuche werden solche Proben nicht vorbereitet, da man für die beiden Stoffe eine ganz andere Analytik entwickeln müsste als für Ethacridinlactat. Dieser Aufwand erscheint nicht gerechtfertigt, wenn man berücksichtigt, dass zu dem Zeitpunkt, zu dem die Freisetzungsversuche begonnen wurden, die Wahl schon zu Gunsten von Ethacridinlactat getroffen worden war.

2.2.2 Freisetzungsversuche

Für die Freisetzungsversuche gibt es zweierlei Aufbauten, je nachdem, ob die anschließende Gehaltsbestimmung mit UV/Vis- oder mit Fluoreszenzspektroskopie erfolgt.

Im Falle der Gehaltsbestimmung mit UV/Vis-Spektroskopie wird pro Probe ein Reaktionsgefäß („Eppi-Cap“) mit 1,5 mL PBS pH 7,3 0,012 M, 37°C vorbereitet. Das Schlauchstück wird in das Reaktionsgefäß überführt, wobei sicherzustellen ist, dass das Schlauchstück untergeht. Es folgt eine Inkubation bei 37°C in einem entsprechenden Heizblock. Zu den gewünschten Zeitpunkten werden jeweils 150 µL Puffer entnommen, ohne dass dieser ersetzt wird. Das verhindert Verdünnungseffekte, die freigesetzten Wirkstoffmengen sind ohnehin schon so gering, dass sie teilweise kaum noch messbar sind.

Wird der Gehalt an Ethacridinlactat im Anschluss an die Freisetzung mit der wesentlich empfindlicheren Messmethode der Fluoreszenzspektroskopie bestimmt, so ist eine kumulative Messung wie bei der UV/Vis-Spektroskopie nicht nötig. Es wird hier pro Probe und Messzeitpunkt ein Reaktionsgefäß mit 1 mL 37°C warmem PBS pH 7,3 0,012 M vorbereitet. Zu den gewünschten Zeitpunkten wird dann kein Puffer entnommen, sondern das Schlauchstück wird in das nächste Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Es wird sowohl das Spektralphotometer als auch der UV/Vis-Platereader für die Messungen verwendet.

Das Spektralphotometer wird einerseits für das Aufzeichnen von Spektren verwendet. Da der Platereader nur Filter für bestimmte Wellenlängen besitzt (Spektrallinienphotometer), ist das mit diesem Gerät nicht möglich. Außerdem wird das Spektralphotometer für die Vermessung der Ethacridin-Lösungen in Toluol verwendet, da das Polystyrol der Mikrotiterplatten durch

Toluol angegriffen wird, was eine Verwendung von Quarz- bzw. Glasküvetten obligatorisch macht.

Bei der Aufnahme des Absorptionsspektrums sind als Absorptionsmaxima von Ethacridinlactat die Wellenlängen 288 nm, 356 nm und 420 nm ermittelt worden. Da der Platereader einen Filter für 420 nm besitzt, wird diese Wellenlänge für die Messungen an beiden Geräten verwendet.

2.2.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Folgende Einstellungen sind am Tecan Fluoreszenz-Plattenleser vorzunehmen: Der Name des Messmodus lautet „Fluorescence Top“. Für den Belichtungsmodus („FlashMode“) wird die Einstellung „hochsensitiv“ gewählt, die Z-Position wird auf 8800 µm und der Verstärkungsgrad („Gain“) auf 62 festgesetzt.

Durch das Aufzeichnen eines Absorptionsspektrums (Abbildung 20) wurde ermittelt, dass eine Wellenlänge von 271 nm zur Anregung des Elektronensystems von Ethacridinlactat geeignet ist:

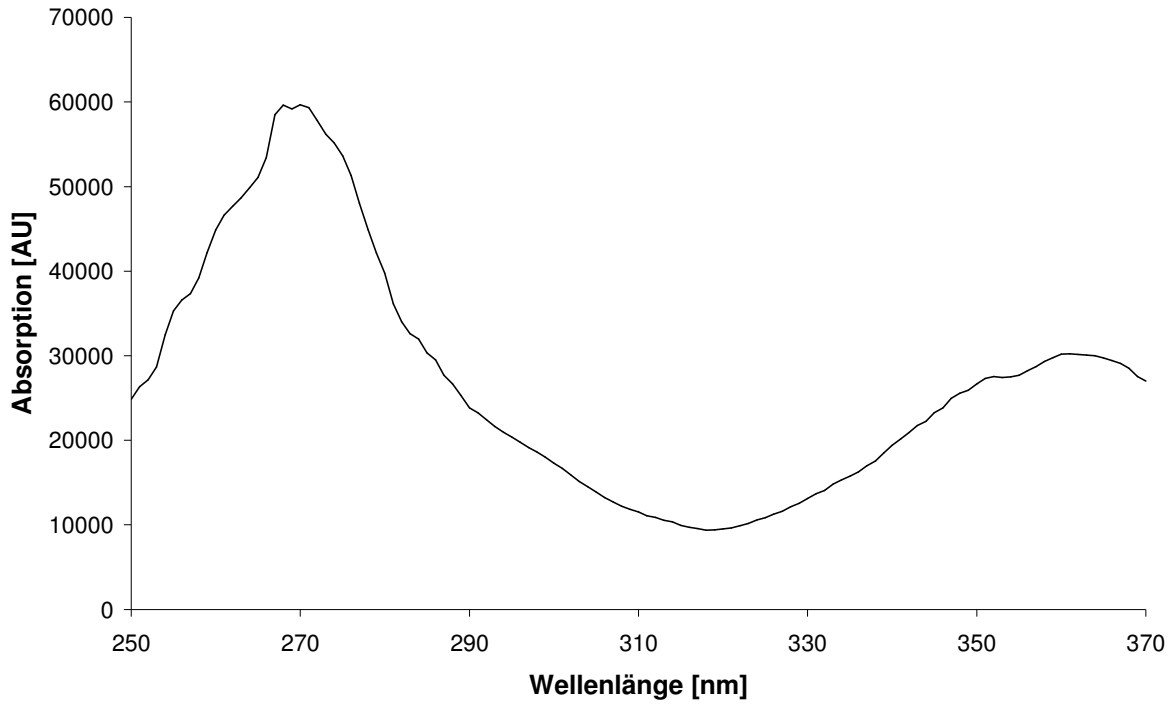


Abbildung 20: Absorptionsspektrum von Ethacridinlactat in PBS pH 7,3 0,012 M. Das Absorptionsmaximum liegt bei 271 nm.

Bei dieser Anregungswellenlänge wurde ein Emissionsspektrum aufgezeichnet (Abbildung 21), dessen Maximum bei 517 nm liegt:

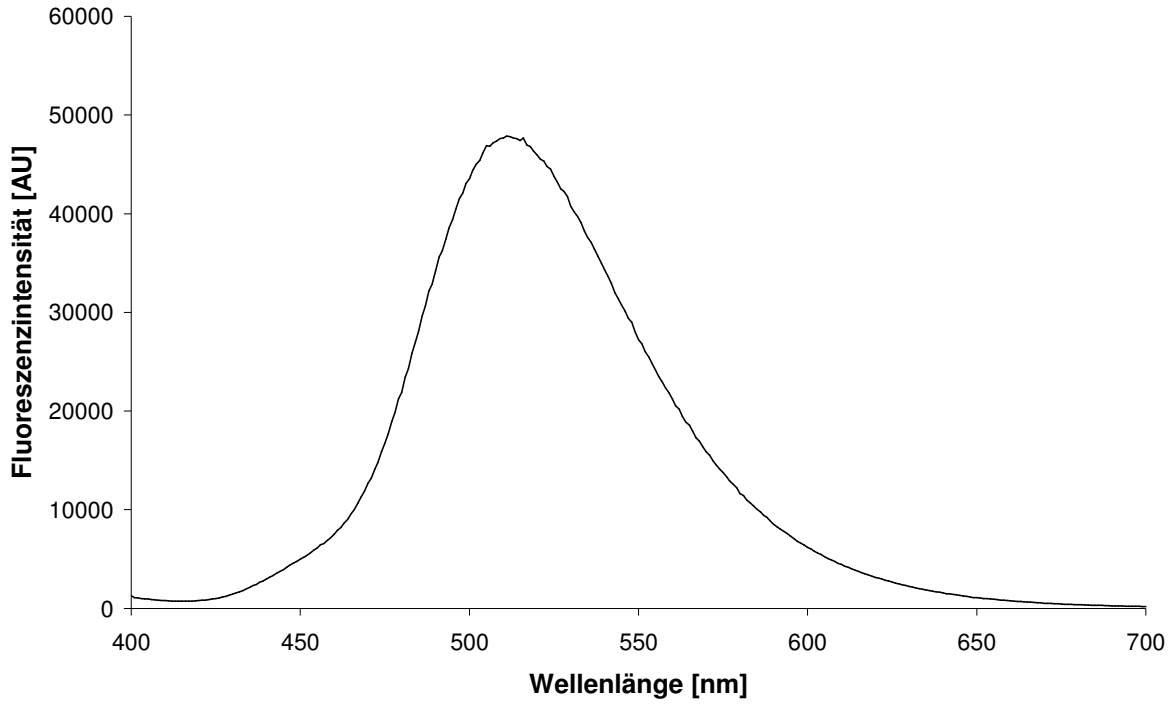


Abbildung 21: Fluoreszenzspektrum von Ethacridinlactat in PBS pH 7,3 0,012 M bei einer Anregungswellenlänge von 271 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 517 nm.

Dementsprechend wird als Anregungswellenlänge 271 nm (mit 5 nm Bandbreite) eingestellt und bei 517 nm (mit 10 nm Bandbreite) die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Integrationsdauer beträgt 40 µs und es werden pro Well 10 Messungen durchgeführt.

Um den linearen Bereich des quantitativen Zusammenhangs von Ethacridinlactat-Konzentration und Fluoreszenzintensität zu ermitteln, werden zunächst Ethacridinlactat-Lösungen in vielen verschiedenen Konzentrationen hergestellt und deren Fluoreszenzintensität unter den zuvor beschriebenen Bedingungen vermessen.

Trägt man alle Fluoreszenzintensitäten gegen die zugehörige Konzentration auf, ergibt sich das folgende Bild:

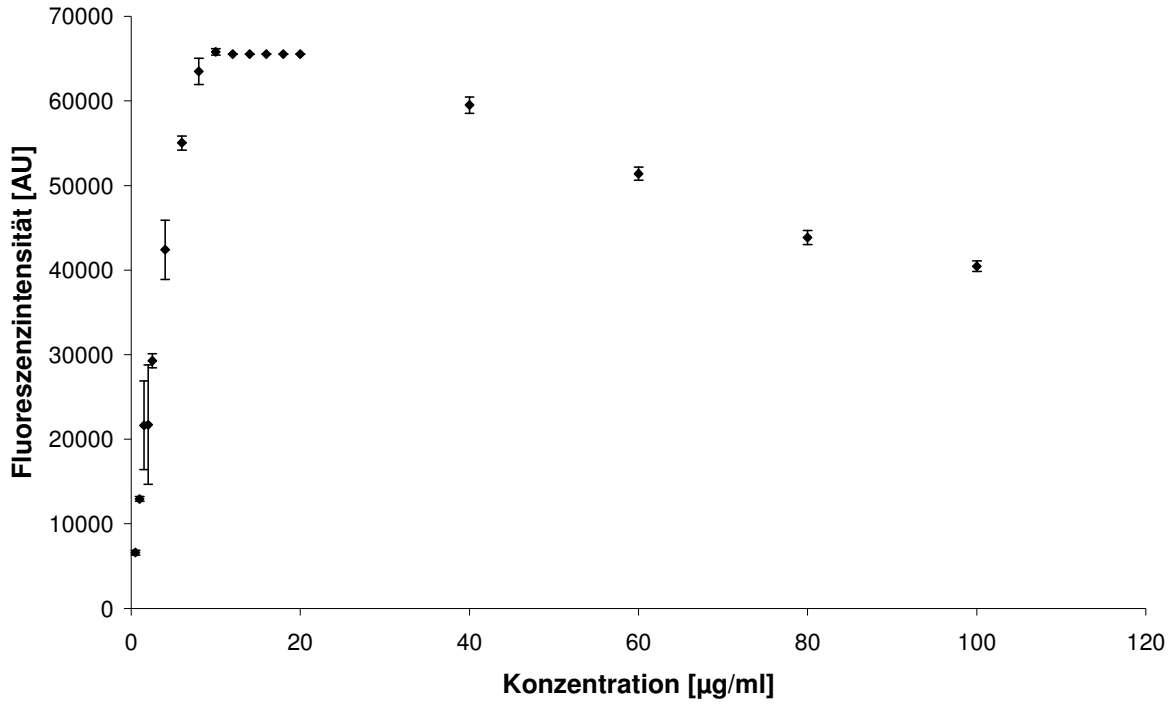


Abbildung 22: Messung der Fluoreszenzintensitäten bei Ethacridinlactat-Lösungen verschiedener Konzentrationen. Der lineare Bereich muss auf jeden Fall unterhalb von 10 µg/mL liegen.

Aus dem Diagramm ist sofort ablesbar, dass der lineare Bereich unterhalb einer Ethacridinlactat-Konzentration von 10 µg/mL liegen muss.

Vergrößert man die verschiedenen Konzentrationsbereiche, so findet man einen linearen Zusammenhang im Konzentrationsbereich bis 2 µg/mL:

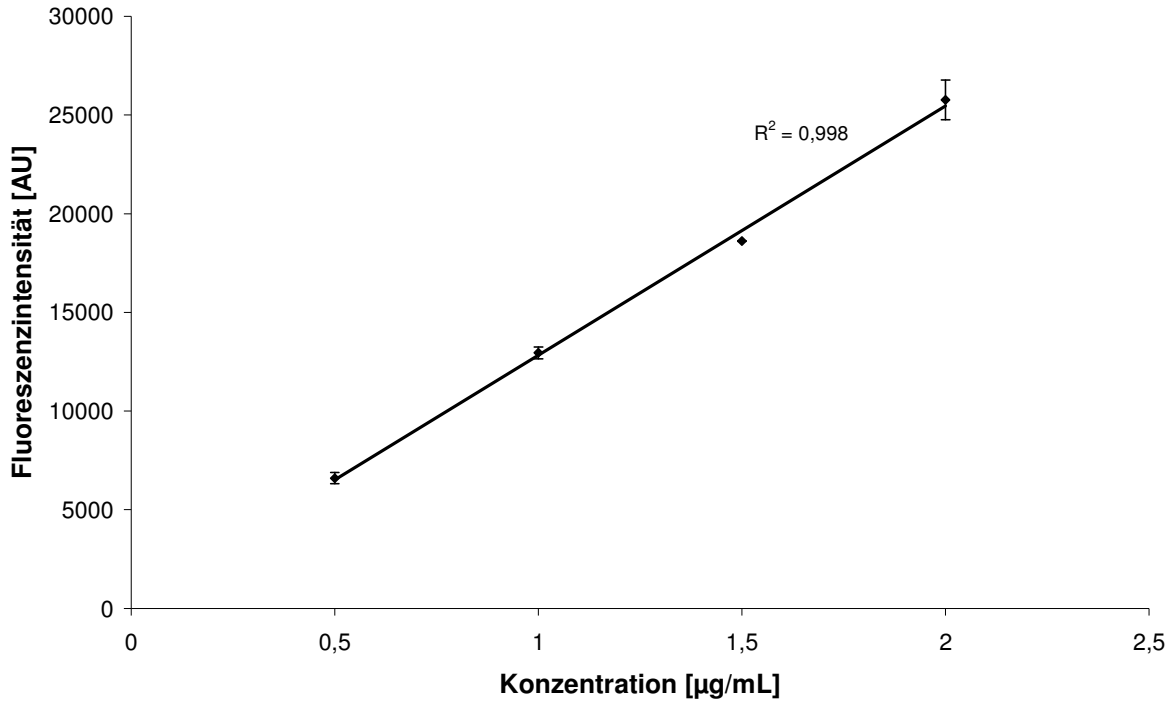


Abbildung 23: Vergrößerung von Abbildung 22 auf den Konzentrationsbereich bis 2 µg/mL. Bis hierhin ist ein linearer Zusammenhang zu erkennen.

Als linearer Bereich des quantitativen Zusammenhangs zwischen der Ethacridinlactat-Konzentration und der Fluoreszenzintensität wurde der Konzentrationsbereich bis 2 µg/mL ermittelt. Da die Fluoreszenzspektroskopie sehr störanfällig gegenüber äußeren Einflüssen wie z.B. Temperaturschwankungen ist, wurden für jeden Tag, an dem gemessen wurde, eigene Kalibriergeraden erstellt. Dazu wurde jeweils eine 4-Punkt-Kalibration mit Ethacridinlactat-Lösungen der Konzentrationen 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL und 0,8 µg/mL durchgeführt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten liegen in diesem Konzentrationsbereich meist unterhalb von 10.000 AU.

2.2.3 Agar-Diffusionstest

Vorbereitende Schritte sind die Herstellung von Agarplatten und Luria-Bertani-Medium, sowie das Animpfen und Bebrüten des Mediums mit *Escherichia coli*-Bakterien.

Zur Herstellung des Agars werden pro Liter Wasser 5 g Natriumchlorid, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, sowie 15 g Agar eingewogen. Dabei ist darauf zu achten, die Substanzen in eine ausreichend große Flasche zu füllen, denn diese darf am Ende höchstens zu zwei Dritteln gefüllt sein. Auf das entsprechende Volumen wird mit Leitungswasser aufgefüllt, die darin enthaltenen Mineralien fördern das Bakterienwachstum. Der Agar löst sich erst beim Autoklavieren. Hierbei ist zu beachten, dass der Deckel der Flasche für den Autoklaviervorgang nur auf die Öffnung gelegt, nicht aber zugeschraubt wird. Nach dem Autoklavieren wird der noch heiße Agar in Petrischalen ausgegossen. Dabei braucht man für eine Petrischale etwa 20 mL Agar. Den Agar lässt man abkühlen, wobei er aushärtet. Das Abkühlen darf allerdings nicht zu schnell erfolgen, deshalb sollte man die Platten erst dann in den Kühlschrank bzw. in den Kühlraum legen, wenn die Aushärtung abgeschlossen ist.

Luria-Bertani-Medium besitzt im Prinzip die gleiche Zusammensetzung, enthält jedoch keinen Agar. Man wiegt also pro Liter Leitungswasser 5 g Natriumchlorid, 5 g Hefeextrakt und 10 g Trypton ein. Es bietet sich in diesem Fall an, jeweils 100 mL des Mediums in einen 500 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu geben. Zum Autoklavieren wird das Gefäß mit einem Stopfen aus Watte verschlossen und mit Alufolie vor Nässe geschützt.

Der Agardiffusionstest sollte mit einer wachsenden Bakterienkultur durchgeführt werden, also mit Bakterien in der log-Phase. Deshalb erfolgt zunächst eine Beimpfung einer Agarplatte mit *Escherichia coli* BL 21 K 40 aus einer lag-Kultur (Kühlschrank oder -80°C-Tiefkühltruhe). Dazu wird eine Impföse zuerst ausgeglüht, dann abkühlen gelassen. Mit der nun sterilen, abgekühlten Öse werden Bakterien aus der alten Kultur aufgenommen und auf der frischen Agarplatte ausgestrichen. Diese neue Platte wird mehrere Stunden bei 37°C bebrütet, bis sich ein dichter Bakterienrasen bildet.

Aus dieser frischen Kultur erfolgt eine Beimpfung des Luria-Bertani-Mediums. Dazu wird wiederum die Impföse zunächst ausgeglüht. Nach dem Abkühlen werden damit dann wieder Bakterien aus der Agar-Kultur aufgenommen und in das Medium übertragen, indem man die Öse durch die Flüssigkeit zieht. Die Inkubation des Mediums erfolgt ebenfalls bei 37°C im Schüttler bei 200 rpm. Die Schikanen im Erlenmeyerkolben sorgen beim Schütteln für eine verbesserte Belüftung des Mediums; die Bakterien können dann besser wachsen. Das Wachstum erkennt man an einer zunehmenden Trübung der Lösung.

Am folgenden Tag wird der eigentliche Agardiffusionstest durchgeführt. Dazu werden je 100 µl des beimpften und inkubierten auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Weiterhin werden kreisförmige Filterpapierstücke von etwa 5 mm Durchmesser gut verteilt auf die Agarplatte gelegt. Auf die Filterpapierstücke werden 5 µl verschieden konzentrierter Ethacridinlactat-Lösungen (1%, 0,5%, 0,1% und 0,05%) pipettiert. Als Positivvergleich werden 3 µl einer 0,01%igen Ampicillin-Lösung verwendet, als Negativvergleich 5 µl Wasser. Die so behandelten Agarplatten werden wiederum für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Bei ausreichenden Konzentrationen antibakterieller Stoffe bildet sich um die Filterpapiere herum ein Hemmhof im ansonsten dichten Bakterienrasen, der umso größer ist, je wirksamer der Stoff ist. Da der Hemmhof durch Diffusion des Wirkstoffes ausgehend vom Filterpapier zustande kommt, spricht man vom Agardiffusionstest.

In der folgenden Abbildung ist der Agardiffusionstest schematisch dargestellt:

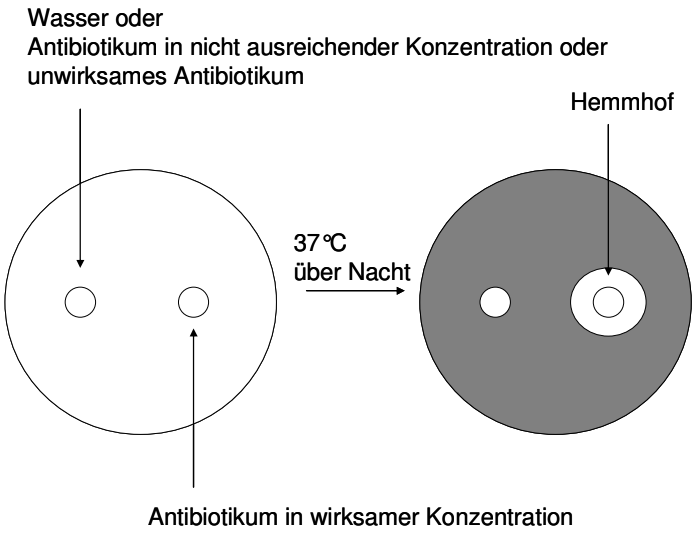


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Agardiffusionstests. Befindet sich auf dem Filterpapier genügend wirksames Antibiotikum, so bildet sich ein Hemmhof im Bakterienrasen aus.

In einer Modifizierung des klassischen Agardiffusionstests werden statt Filterpapierstücken Schlauchstücke von 1 cm Länge verwendet, die unterschiedlich vorbehandelt und senkrecht in den Nährboden gesteckt werden. Es werden völlig unbehandelte Schläuche mit solchen verglichen, die in wirkstofffreiem oder in Ethacridinlactat-haltigem Lösungsmittel gequollen wurden. Außerdem werden die verschiedenen Spülalternativen einander gegenübergestellt, also die ungespülten Schläuche, die mit dem reinen Quellmittel gespülten und die mit Wasser gespülten, wobei auch eine Unterscheidung danach erfolgt, ob die Schläuche sofort nach dem Quellen gespült wurden oder erst nach dem Trocknen.

2.2.4 Versuch zur Bakterienadhäsion auf der Basis eines Spülversuchs

Dieser Versuchsaufbau wurde speziell dazu entwickelt, den Erfolg der Beschichtungen zu zeigen, insbesondere derjenigen der Wirkstoffeinbringung durch Quellen in Ethacridinlactat-haltigem Ethanol. Man kann jedoch mit diesem Assay auch untersuchen, inwieweit eine Sterilisation mit Ethylenoxid die Wirkung des Ethacridinlactats aus den Stents beeinträchtigt. Da die Sterilisation in jedem Fall durchgeführt werden muss, ist diese Untersuchung sehr wichtig. Weiterhin können die beiden Immobilisierungsvarianten einander gegenübergestellt und die Effekte der drei antibakteriellen Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat miteinander verglichen werden.

Der Versuch beruht darauf, dass die zu untersuchenden Schlauchstücke in einer Bakteriensuspension inkubiert werden und anschließend untersucht wird, wie gut sich die Bakterien im Anschluss von dem Material abspülen lassen. Die absoluten Keimzahlen haben ohne einen Vergleich keine Bedeutung; daher werden bei der Untersuchung wirkstoffhaltiger Schläuche auch immer wirkstofffreie Schläuche ebenso behandelt wie die wirkstoffhaltigen.

Im folgenden Schaubild (Abbildung 25) wird das Vorgehen schematisch dargestellt:

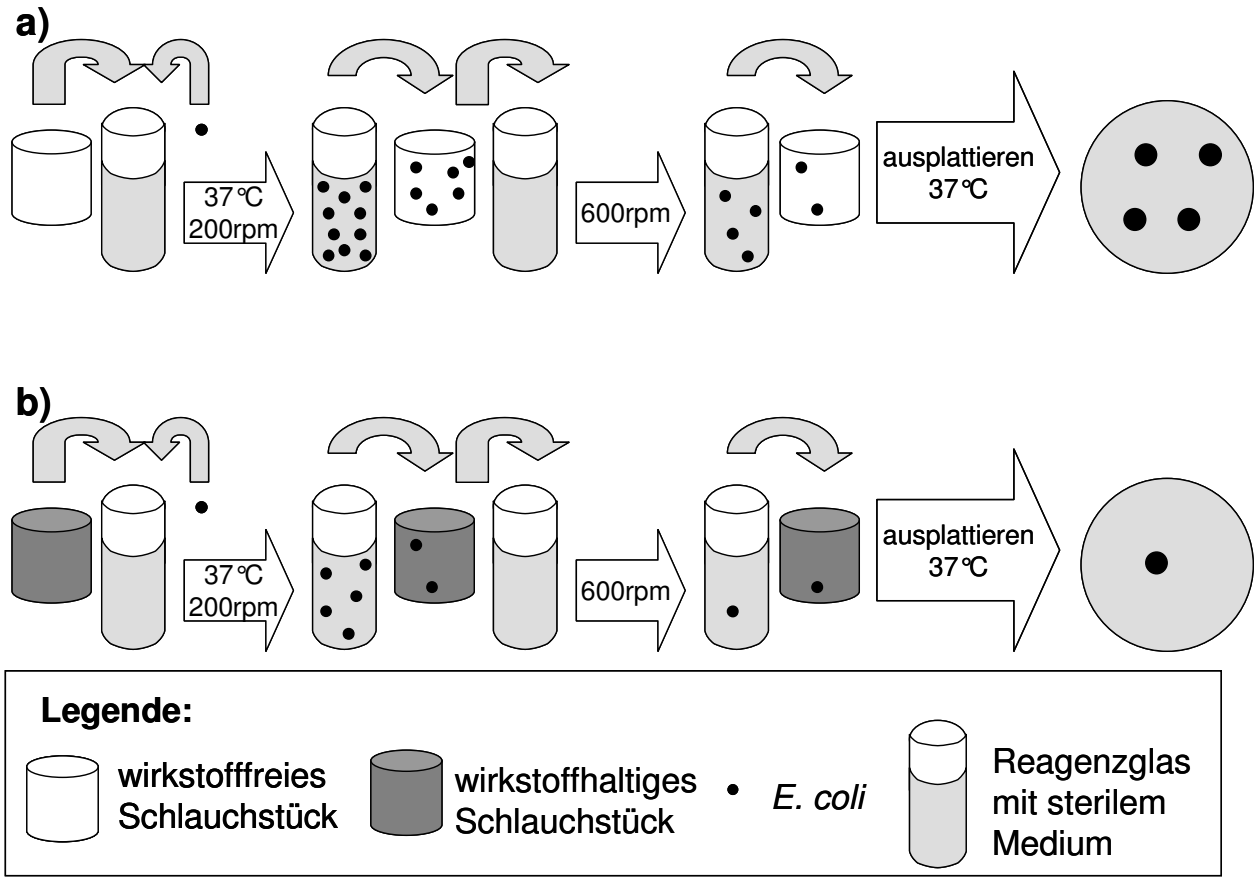


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Versuches zur Untersuchung der Bakterienadhäsion an die verschiedenen Schlauchoberflächen. Unter a) ist ein wirkstofffreies Schlauchstück dargestellt, unter b) ein wirkstoffhaltiges. Unter b) sollten sich in allen Lösungen geringere Keimzahlen ergeben als unter a).

Unter Punkt a) ist die theoretische Reaktion des Versuches auf ein wirkstofffreies Schlauchstück dargestellt, unter b) die Reaktion auf eine wirkstoffhaltige Probe.

In beiden Fällen wird die Probe in ein Reagenzglas mit 4 mL autoklaviertem Luria-Bertani-Medium gegeben, welches im Anschluss mit 50 µL einer frisch bebrüteten Bakteriensuspension aus *Escherichia coli* beimpft wird. Diese beimpften Medien mit Probe werden nun über Nacht unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Dabei sollte das Bakterienwachstum unter a) ausgeprägter sein als unter b).

Am folgenden Tag wird jede Probe in ein Reagenzglas mit frischem, sterilem Luria-Bertani-Medium überführt. Der Theorie nach müssten die Bakterien eine höhere Affinität zu der wirkstofffreien Oberfläche haben, mit der Probe unter b) würden also weniger Bakterien in das neue Reagenzglas transferiert werden als unter a), weil die Bakterien nicht so stark an der Oberfläche anhaften. Die Reagenzgläser mit den Proben werden für eine Minute mit 600 rpm geschüttelt, so dass sich weitere Bakterien von der Oberfläche ablösen. Da an der

wirkstofffreien Probe unter a) mehr Bakterien anhaften als an der wirkstoffhaltigen Probe unter b), werden durch das starke Schütteln bei a) auch mehr Bakterien abgelöst als bei b).

Der Spülvorgang wird noch ein zweites Mal durchgeführt, bevor beide Spüllösungen und die Inkubationslösung verdünnt werden. Das ist erforderlich, da die Bakterienkonzentrationen so hoch sind, dass sich andernfalls beim Ausplattieren ein dichter Bakterienrasen auf der Agarplatte bilden würde, woraus man keine Kolonien auszählen könnte. Es wird immer im Verhältnis 1:100 verdünnt, wobei für die Inkubationslösung drei Verdünnungsschritte (auf $1:10^6$), für die erste Spüllösung zwei Schritte ($1:10^4$) und für die zweite Spüllösung ein Verdünnungsschritt ($1:10^2$) erforderlich sind.

Von jeder der verdünnten Probenlösungen werden nun dreimal 50 µL ausplattiert, indem mit einem zuvor am Rand abgeflämmten 50 mL-Erlenmeyerkolben (mit weitem Hals) drei Kreise pro Agarplatte (je 10 mL Agar, am Vortag ausgegossen) in den Agar gestanzt werden. In diese Kreise wird dann die Probenlösung pipettiert.

Eine fertig bebrütete Agarplatte ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

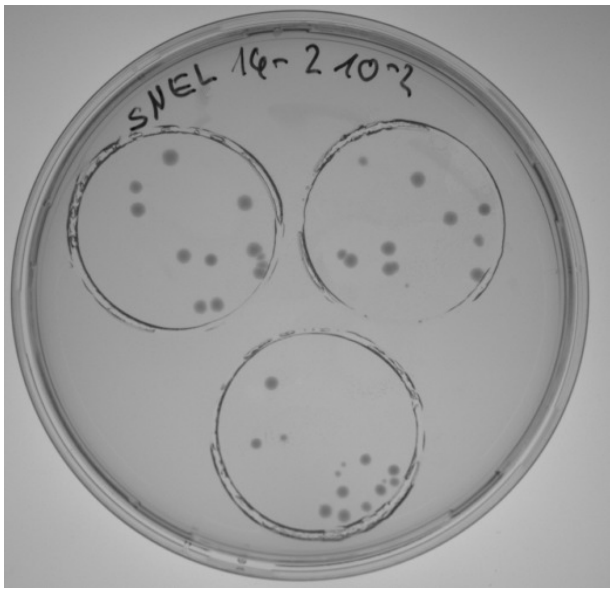


Abbildung 26: Bebrütete Agarplatte mit drei ausgestanzten Kreisen, in die vor der Inkubation die verdünnte Bakteriensuspension pipettiert wurde. In diesem Fall handelt es sich um die 1:100-Verdünnung der zweiten Spüllösung von Probe 14 der sterilisierten Schläuche mit DLC-NH3-Beschichtung.

Aus jedem Bakterium, das in dem Medium enthalten ist, entsteht eine Kolonie, die man nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C gut auszählen kann. Die Dokumentation erfolgt durch Photographieren der fertig bebrüteten Agarplatten mit der Geldokumentationsanlage Bio-Vision, die Kolonien werden mit der Software Vision-Capt manuell ausgezählt.

Das Speichern der ausgezählten Bilder muss als Bitmap eines Screenshots erfolgen, da die Vision-Capt kein geeignetes Speicherformat anbietet. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 27:

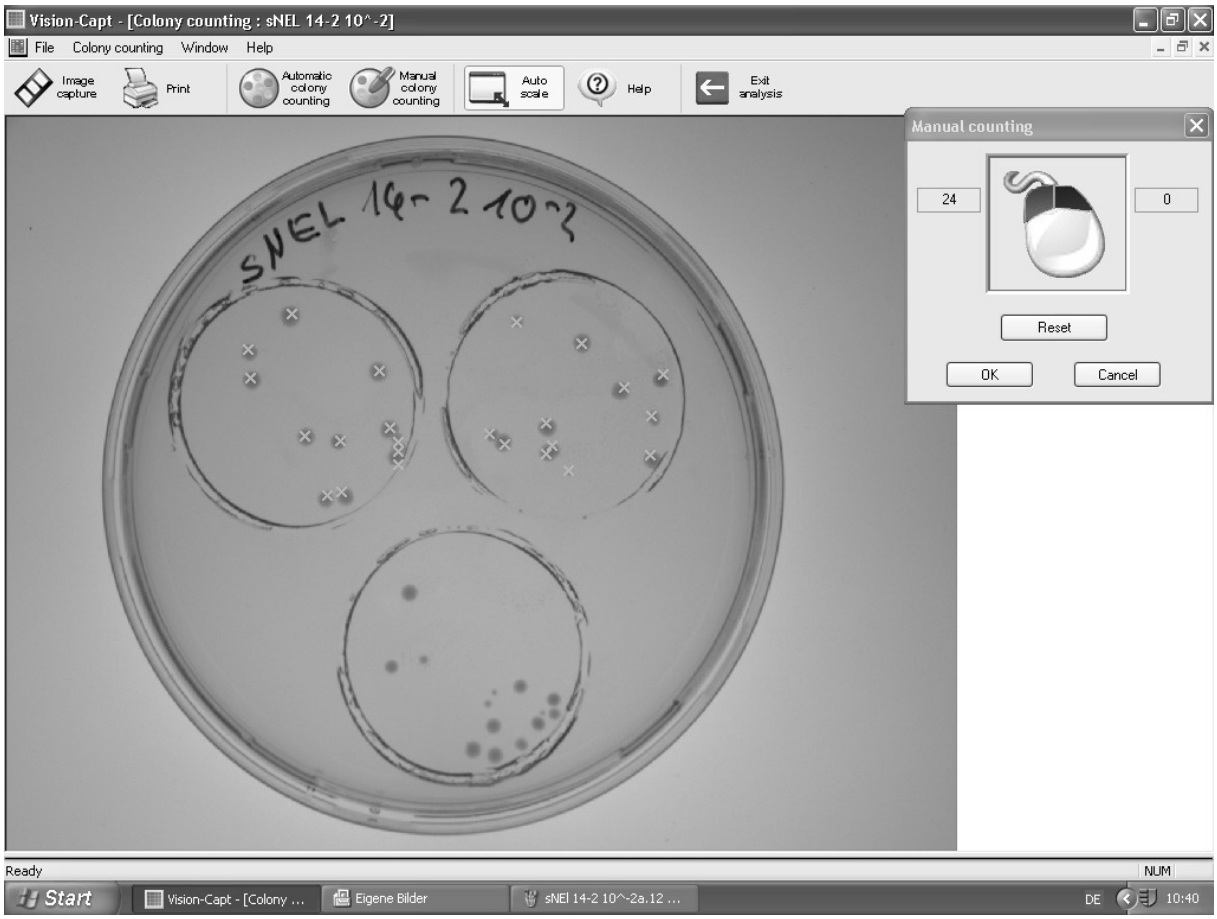


Abbildung 27: Beispiel für die Speichermethode nach dem Auszählen. Hier sind die beiden ersten Kreise ausgezählt, es wurden 24 Kolonien gezählt. Nach dem Auszählen jeden Kreises wird ein Screenshot gemacht, wobei beim Speichern die Kolonienanzahl in den Dateinamen aufgenommen wird, so dass ein Übertragen der Zahlen in eine Tabelle schnell möglich ist, ohne dass jede Bitmap noch einmal geöffnet werden muss.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Proben werden noch einige Kontrollen angefertigt. Einerseits muss sichergestellt werden, dass das verwendete Medium wirklich steril ist. Deshalb werden auch pro Versuchsreihe dreimal 50 µL reines Medium ausplattiert. Ferner wird die Metallpinzette, mit der die Proben in die verschiedenen Reagenzgläser überführt werden, nach jedem Transfer abgeflämmt und in einem Reagenzglas mit Medium abgekühlt. Das Medium aus diesem Reagenzglas wird ebenfalls ausplattiert. Um eine Kontamination durch den Erlenmeyerkolben auszuschließen, mit dem die Kreise in den Agar gestanzt wurden, wird der Kolben nach dem Abflämmen in einer Agarplatte abgekühlt. Bei keiner dieser drei Proben darf Bakterienwachstum auftreten, sonst wird die gesamte Probenserie des Tages verworfen.

Um die an verschiedenen Tagen angefertigten Proben miteinander vergleichen zu können, muss noch ein Standard eingeführt werden. Durch unterschiedlich lange Bebrütungszeiten, zwischenzeitliches Öffnen des Brutschrankes und vor allem durch unterschiedliche Konzentrationen der Bakteriensuspensionen, mit denen die Inkubationslösungen zu Beginn angeimpft werden, kann es zu erheblichen Unterschieden zwischen den Keimzahlen von gleichartigen Proben an verschiedenen Tagen kommen. Diese Unterschiede können eliminiert werden, indem ein Reagenzglas Medium mit 50 µL der Bakteriensuspension des jeweiligen Tages angeimpft wird, ohne dass eine Schlauchprobe zugegeben wird. Dieses Medium wird zusammen mit den anderen Proben inkubiert und dreimal 1:100 verdünnt. Von der $1:10^6$-Verdünnung werden dreimal 50 µL ausplattiert, bebrütet und ausgezählt. Alle an diesem Tag ermittelten Keimzahlen werden durch den Mittelwert der drei Keimzahlen dividiert, die zu diesem Standard gehören. So sind die Keimzahlen auch tagesübergreifend miteinander vergleichbar.

3 Ergebnisse

3.1 Messungen mit Spektralphaseninterferenz (SPI)

Die SPI-Messungen wurden vom Vorgänger in diesem Projekt, Christian Burger, durchgeführt. Da die Messungen jedoch für den Gesamtzusammenhang von Bedeutung und bislang nicht veröffentlicht sind, finden sie Eingang in diese Arbeit. Es handelt sich um die in diesem Teil 3.1 zusammengestellten Ergebnisse.

Es ging bei den Messungen darum, herauszufinden, ob sich die drei zur Auswahl stehenden antibakteriellen Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat auf einer Carboxyloberfläche bzw. auf einer Polyurethan-Oberfläche immobilisieren lassen. Die Spektralphaseninterferenz erlaubt eine Beobachtung der Bindungsereignisse in Echtzeit.

3.1.1 Messung der Bindung verschiedener Arzneistoffe an eine carboxylierte Oberfläche

Die Carboxyloberfläche wurde wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben hergestellt. Die Vorgehensweise am Messgerät wurde in Abschnitt 2.2.1.1.1.1 erläutert.

Die Sensogramme, die sich bei Behandlung der Oberfläche mit Natronlauge pH 8 und Benzalkoniumchlorid ergeben, sind in der folgenden Abbildung 28 für zwei Wirkstoffkonzentrationen dargestellt:

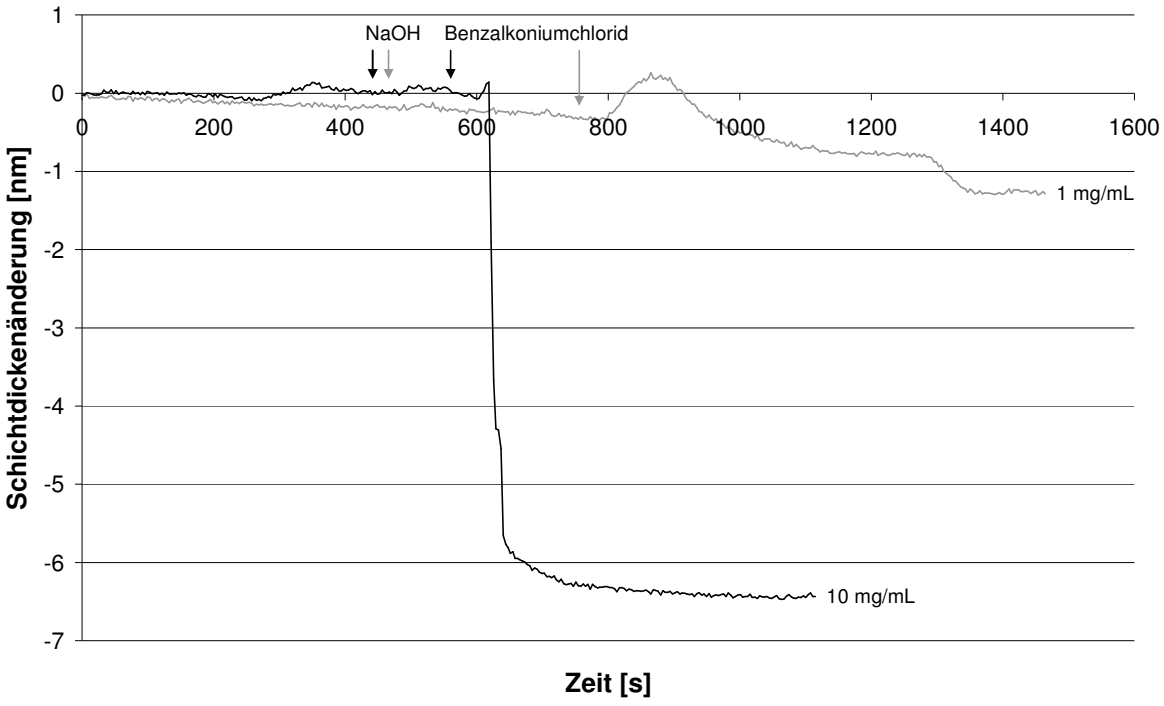


Abbildung 28: Sensogramm der Bindung von Benzalkoniumchlorid 1 mg/mL bzw. 10 mg/mL an eine carboxylierte Oberfläche. Bei der niedrig konzentrierten Lösung ist kein Signal zu verzeichnen, bei der höher konzentrierten Lösung wird eine Schichtdickenabnahme beobachtet.

Bei dem Sensogramm, das zur Wirkstoffkonzentration von 1 mg/mL gehört, ist kein nennenswertes Signal zu erkennen. Zwar steigt der Kurvenverlauf sehr kurzzeitig um knapp 0,5 nm an, aber nur, um innerhalb von 60 Sekunden auf den Ausgangswert zurückzukehren und schließlich sogar leicht darunter abzufallen.

Bei der höher konzentrierten Lösung (10 mg/mL) war eine deutliche Schichtdickenabnahme von ungefähr 6,5 nm zu verzeichnen. Dieses Phänomen war reproduzierbar und vermutlich auf die Tensidstruktur von Benzalkoniumchlorid zurückzuführen. Nähere Ausführungen dazu finden sich in der Diskussion (Abschnitt 4.1) und bei den Ergebnissen der zugehörigen Kontrollexperimente (Abschnitt 3.1.2).

Bei der Untersuchung der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid an eine carboxylierte Oberfläche ergab sich das folgende Bild:

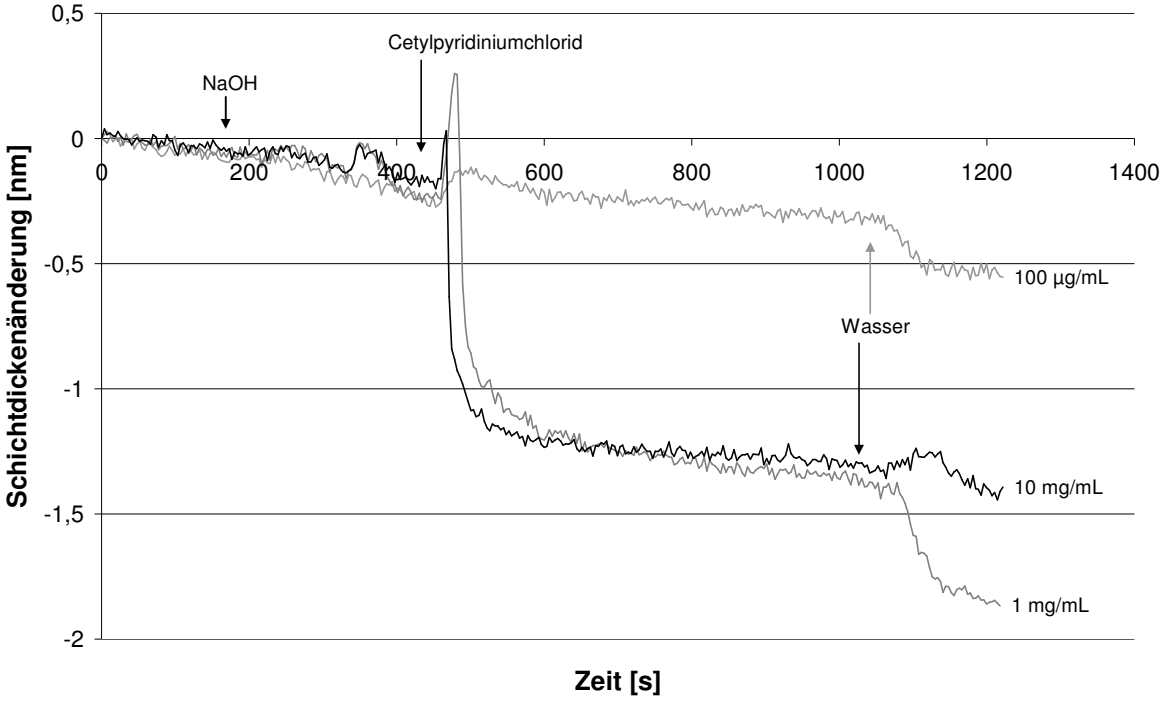


Abbildung 29: Sensogramm der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid 100 µg/mL, 1 mg/mL bzw. 10 mg/mL an eine carboxylierte Oberfläche. Bei der am niedrigsten konzentrierten Lösung ist kein Signal zu verzeichnen, bei den höher konzentrierten Lösungen wird eine Schichtdickenabnahme beobachtet.

Wieder zeigte sich bei der am niedrigsten konzentrierten Lösung kein nennenswertes Signal. Auf die Zugabe der Wirkstofflösung der Konzentration 100 µg/mL folgte eine Schichtdickenzunahme von 0,1 nm, die bei Zugabe von Wasser reversibel war. Solch geringe Änderungen der Schichtdicke dürften eher auf die Vermischung von Lösungen mit verschiedenen Brechungsindices oder Fließeigenschaften zurückzuführen sein als auf tatsächliche Bindungsereignisse.

Bei der Lösung mit 1 mg/mL Wirkstoff zeigte sich – im Gegensatz zu Benzalkoniumchlorid – ein deutliches Signal. Ebenso wie bei der Konzentration von 10 mg/mL nahm die Schichtdicke um etwa 1,3 nm ab. Die Abnahme war bei der Zugabe von Wasser nicht reversibel: bei der 1%igen Lösung (10 mg/mL) blieb die Messkurve auf dem gleichen Niveau, bei der 0,1%igen Lösung (1 mg/mL) sank sie auf Wasserzugabe sogar noch weiter ab.

Zur Erklärung der Schichtdickenabnahme sei auch an dieser Stelle auf die Diskussion in Abschnitt 4.1 und die Kontrollversuche in Abschnitt 3.1.2 verwiesen.

Die Bindung von Ethacridinlactat-Lösungen in vier verschiedenen Konzentrationen an eine carboxylierte Oberfläche ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

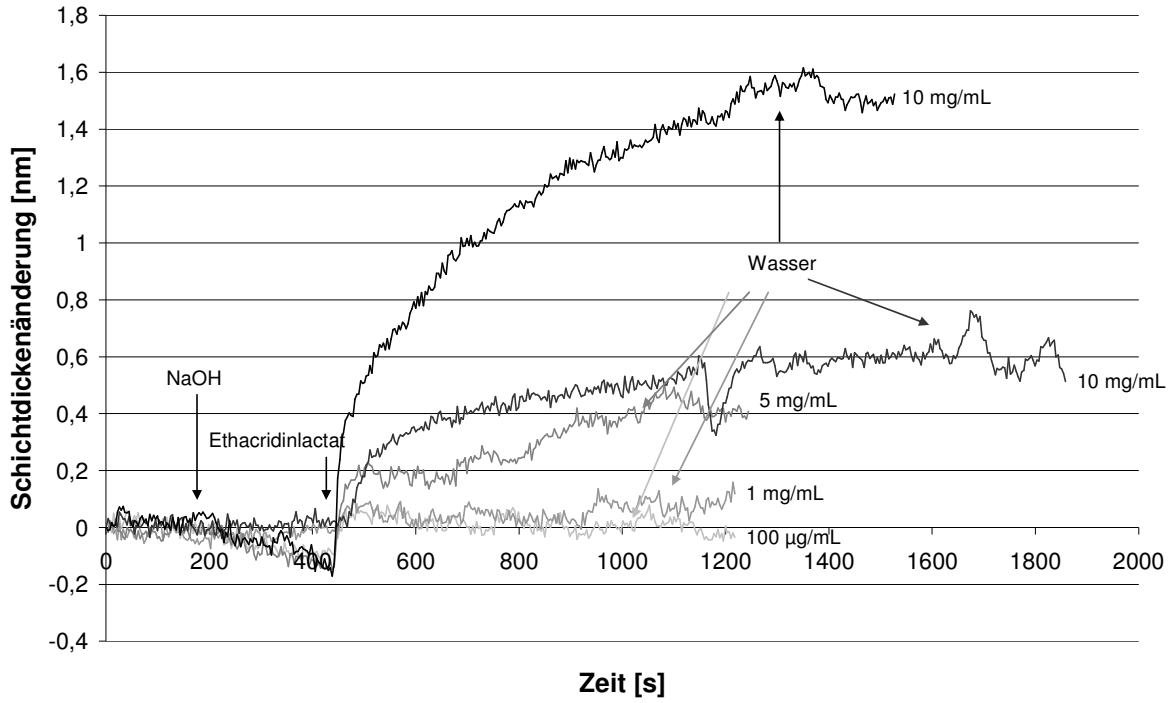


Abbildung 30: Sensogramm der Bindung von Ethacridinlactat 100 µg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL und zweimal 10 mg/mL an eine carboxylierte Oberfläche. Bei den beiden am niedrigsten konzentrierten Lösungen ist kein Signal zu verzeichnen, bei den höher konzentrierten Lösungen wird eine Schichtdickenzunahme beobachtet. Mit der Lösung der Konzentration 10 mg/mL wurden unterschiedlich hohe Signale gemessen.

Die Lösungen mit den Konzentrationen 100 µg/mL und 1 mg/mL ergaben kein Signal. Auf die Zugabe der einen Lösung mit 10 mg/mL und der Lösung mit 5 mg/mL Ethacridinlactat folgte eine Schichtdickenzunahme von 0,4 bis 0,6 nm. Die Bindung blieb auch nach der Zugabe von Wasser bestehen. Mit einem anderen Messchip kam es jedoch bei Zugabe der Lösung mit 10 mg/mL Ethacridinlactat zu einer Schichtdickenzunahme von etwa 1,5 nm, die ebenfalls bei Wasserzugabe bestehen blieb.

3.1.2 Kontrollversuche

Um die Schichtdickenabnahme auf die Zugabe von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zu einer carboxylierten Oberfläche zu erklären, wurden einige Kontrollversuche durchgeführt.

Vermutet wurde, dass die Schichtdickenabnahme auf die tensidische Struktur von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zurückzuführen ist. Mit dem hydrophilen Molekülteil würden die beiden Substanzen demnach an die Carboxylatgruppen auf der Oberfläche binden.

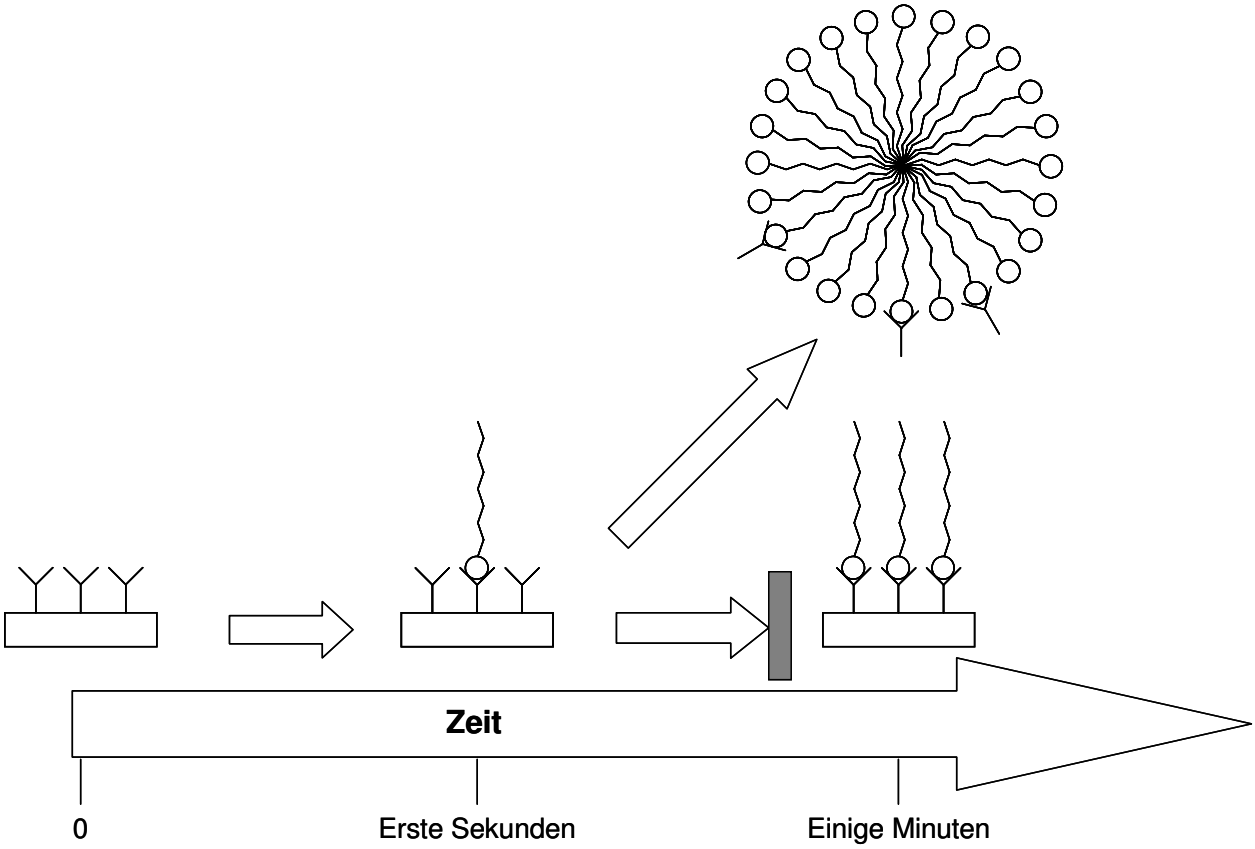


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Bindung von tensidischen Molekülen an eine hydrophile Oberfläche. In den ersten Sekunden lagern sich nur einzelne Moleküle an, so dass ein positives Signal beobachtet wird. Da sich in einer wässrigen Umgebung keine hydrophobe Oberfläche ausbilden wird (unten), schließen sich die Tenside zu Mizellen zusammen, wobei sie teilweise auch die Beschichtung zerstören.

Der untere Weg in Abbildung 31, bei dem sich die hydrophoben Molekülteile parallel zueinander anlagern, läuft im wässrigen Milieu nicht ab, sonst käme es nicht zu einer Schichtdickenabnahme, sondern zu einem stabilen, positiven Signal. Stattdessen bilden Mizellen aus (oberer Weg), wobei die Wirkstoffmoleküle, die schon an die

Carboxylatgruppen gebunden haben, anscheinend die Beschichtung mitreißen, wodurch die irreversible Schichtdickenabnahme zu erklären wäre.

Um diese Vermutung zu beweisen, wurden drei Kontrollexperimente durchgeführt. Einerseits wurde die Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an eine hydrophobe Oberfläche unter der Verwendung eines hydrophoben Lösungsmittels untersucht (Abschnitt 3.1.2.1).

Weiterhin wurde eine andere Substanz mit tensidischem Charakter auf ihr Bindungsverhalten an eine carboxylierte Oberfläche untersucht (Abschnitt 3.1.2.2).

Zuletzt wurde auch das Bindungsverhalten aller drei für die Harnleiterschienen in Frage kommenden Substanzen (Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat) an eine unbeschichtete Glasoberfläche beobachtet (Abschnitt 3.1.2.3).

3.1.2.1 Kontrollversuch: Bindung der tensidischen Substanzen an eine hydrophobe Oberfläche

Um zu untersuchen, ob die Schichtdickenabnahme bei der Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an eine Carboxyloberfläche tatsächlich auf die tensidische Struktur der Substanzen zurückzuführen ist, wurde eine hydrophobe Oberfläche vorbereitet, indem die Glasträger mit Octadecyltriethoxysilan behandelt wurden (Abschnitt 2.2.1.1.2). Dadurch bildet sich eine Schicht aus C_{18}-Ketten aus, an die sich Benzalkoniumchlorid bzw. Cetylpyridiniumchlorid mit ihrem hydrophoben Teil anlagern können. In wässriger Umgebung sollten sich keine Mizellen ausbilden, so dass ein positives Signal zu erwarten ist.

Zur Bindung wurden Lösungen aus Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid jeweils mit einer Konzentration von 10 mg/mL verwendet. Anstelle von Wasser wurde zum Spülen Toluol verwendet, da dieses die hydrophobe Oberfläche besser benetzt.

Das Sensogramm ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

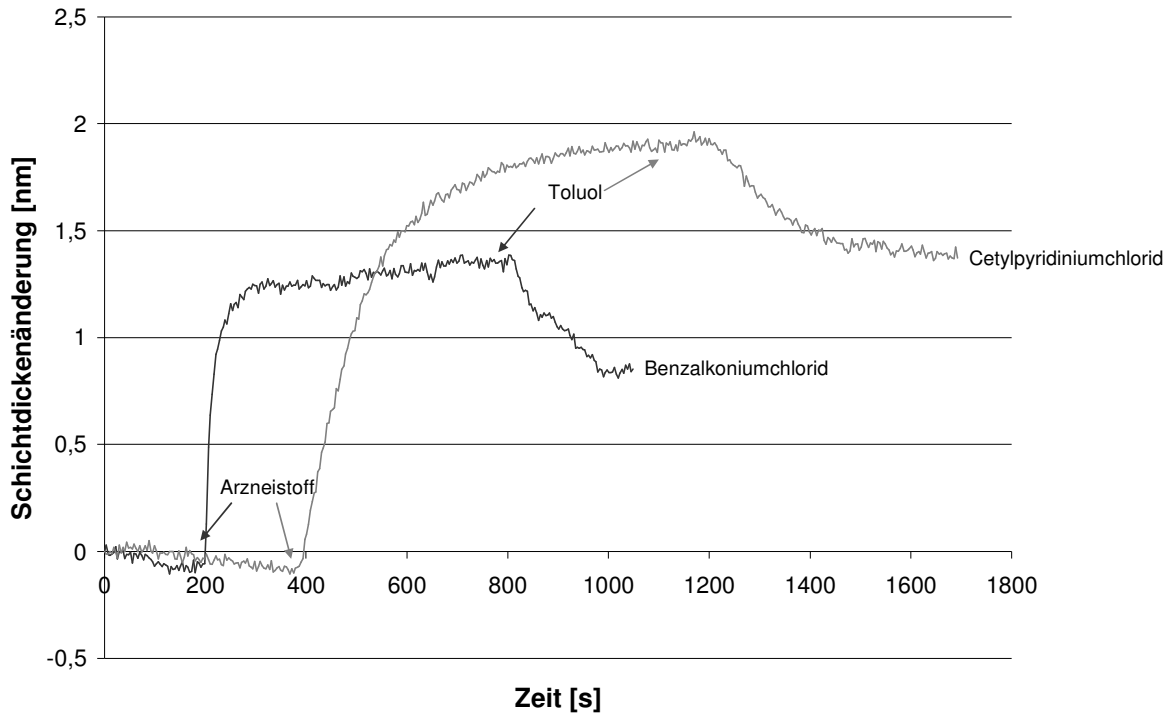


Abbildung 32: Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an eine hydrophobe C_{18}-Oberfläche. Es ist eine Schichtdickenzunahme zu beobachten, die jedoch gegenüber Toluol nicht beständig ist.

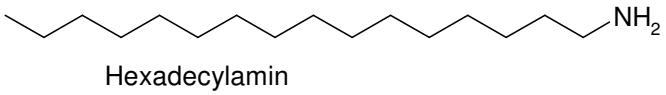
Bei beiden Stoffen zeigt sich eine Schichtdickenzunahme, die allerdings bei der Zugabe von Toluol nicht stabil ist. Bei Benzalkoniumchlorid beträgt sie 1,3 nm, bei Cetylpyridiniumchlorid knapp 2 nm. Die Schichtdickenzunahme ist ein Hinweis darauf, dass Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid auf einer hydrophoben Oberfläche binden bzw. adsorbieren, ohne die Beschichtung zu entfernen. Durch die Zugabe von Toluol können die hydrophilen Molekülteile, die nach oben ragen, nicht mehr solvatisiert werden und es bilden sich inverse Mizellen, also Mizellen, bei denen der hydrophile Teil innen liegt und der hydrophobe außen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Theorie der Mizellbildung zutreffen kann und wird als erster Beweis dafür angesehen, dass die tensidische Struktur von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid für die in Abschnitt 3.1.1 beobachteten Schichtdickenabnahmen verantwortlich sein könnte.

3.1.2.2 Kontrollversuch: Bindung einer anderen tensidischen Substanz an eine carboxylierte Oberfläche

Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurde auch eine andere tensidische Substanz auf ihre Bindungseigenschaften an die hydrophile Carboxyloberfläche hin untersucht.

Die Messungen wurden mit Hexadecylamin in einer Konzentration von 10 mg/mL durchgeführt.



Hexadecylamin

Abbildung 33: Strukturformel von Hexadecylamin

Wenn die Schichtdickenzunahme in Abschnitt 3.1.1 auf den tensidischen Charakter von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zurückzuführen ist, so müsste sich auch bei Hexadecylamin eine Schichtdickenabnahme ergeben.

Das Sensogramm ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

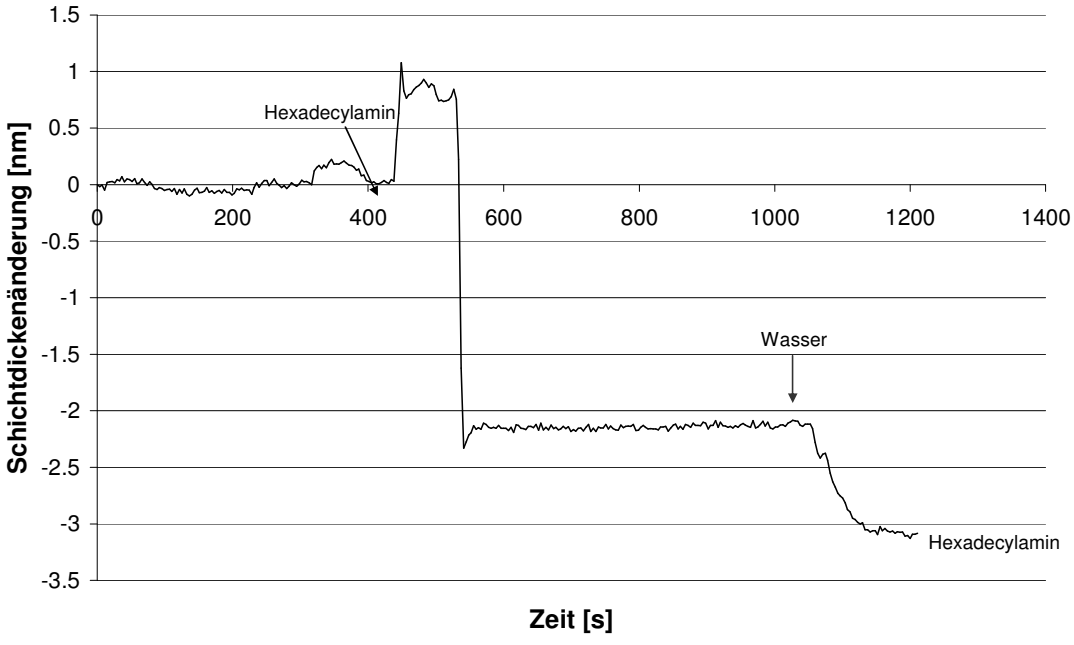


Abbildung 34: Bindung der tensidischen Substanz Hexadecylamin an eine carboxylierte Oberfläche. Die Konzentration der Tensidlösung beträgt 10 mg/mL. Es ist eine Schichtdickenabnahme zu beobachten.

Es ist eine deutliche Schichtdickenabnahme von etwa 2 nm zu beobachten. Auf die Tensidzugabe folgt zunächst ein positives Signal, was vermutlich die initiale Bindung einzelner Moleküle repräsentiert. Bei Wasserzugabe nimmt die Schichtdicke noch weiter ab.

Das Sensogramm sieht vom Prinzip her genauso aus wie die Sensogramme der Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an die Carboxyloberfläche in Abbildung 28 und Abbildung 29. Das bedeutet eine weitere Bestätigung, dass das Phänomen der Schichtdickenabnahme vermutlich auf die tensidische Struktur von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zurückzuführen ist.

3.1.2.3 Kontrollversuch: Bindung der Substanzen an Glas

Als letzter Kontrollversuch wurde die Adsorption von Benzalkoniumchlorid Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an eine gereinigte Glasoberfläche untersucht. Wenn die Schichtdickenabnahme durch das Ablösen der Beschichtung zustande kommt, kann diese Schichtdickenabnahme hier nicht stattfinden, da es hier keine Beschichtung gibt. Auch ist keine stabile Bindung der Stoffe an die Oberfläche zu erwarten; die Substanzen müssten sich bei Wasserzugabe wieder ablösen.

Gemessen wurde mit Lösungen von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat, jeweils in einer Konzentration von 10 mg/mL.

Die Sensogramme sind in Abbildung 35 dargestellt:

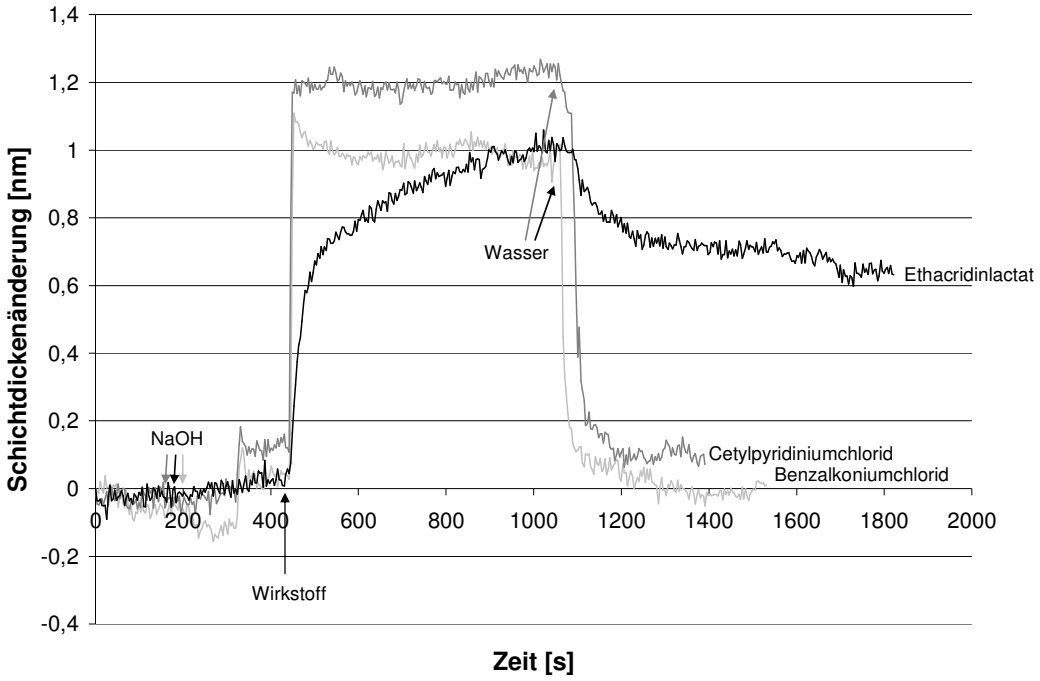


Abbildung 35: Bindungskurven von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat (jeweils 10 mg/mL) auf Glas. Es kommt bei allen Substanzen zu einer reversiblen Schichtdickenzunahme.

Es kommt zu einer Schichtdickenzunahme um etwa 1 nm bei Benzalkoniumchlorid und Ethacridinlactat und um 1,2 nm bei Cetylpyridiniumchlorid. Es wäre eigentlich zu erwarten,

dass das Signal von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid höher ausfällt als das von Ethacridinlactat, da die Moleküle größer sind. Das könnte zu Spekulationen anregen, wie sich die Moleküle auf der Oberfläche anordnen.

Auf die Zugabe von Wasser zeigt sich bei allen drei Messkurven eine Schichtdickenabnahme, die Stoffe werden also wieder von der Oberfläche abgespült. Dieser Prozess ist bei Ethacridinlactat nicht vollständig, allerdings ist hier auch zu beachten, dass die Basislinie in diesem Fall leicht ansteigt. Verlängert man diese, so gelangt man nach 1700 Sekunden beinahe auf ein Signal von 0,6 nm, also auf die Höhe des Signals zum Ende der Messung.

Die Kontrollmessung zeigt, dass die Schichtdickenabnahme in Abschnitt 3.1.1 vermutlich auf das Ablösen der Beschichtung zurückgeht. Dass dies durch den tensidischen Charakter von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid verursacht werden könnte, zeigen die Kontrollversuche in den Abschnitten 3.1.2.1 und 3.1.2.2.

3.1.3 Messung der Bindung verschiedener Arzneistoffe in unterschiedlicher Konzentration an eine Polyurethan-Oberfläche

3.1.3.1 Ermitteln einer geeigneten Polyurethan-Konzentration für die Beschichtung der Glasträger

Bevor die Einlagerung der drei Substanzen Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat in die Polyurethanmatrix untersucht werden kann, muss zunächst eine geeignete Beschichtungstechnik für die Glasträger ermittelt werden.

Die Glasträger sollen mit Polyurethan beschichtet werden, indem eine Lösung von Polyurethan in Chloroform durch Spincoating in einer dünnen Schicht auf die Glasträger gebracht wird. Die geeignete Konzentration der Polyurethan-Lösung ist noch zu ermitteln.

Hierzu wurde so vorgegangen, dass jeweils 200 µL verschieden konzentrierter Polyurethan-Lösungen für das Spincoating verwendet wurden (vgl. Abschnitt 2.2.1.1.3) und die Bindung von Ethacridinlactat (Konzentration 10 mg/mL) auf diesen Oberflächen beobachtet wurde.

Die entsprechenden Sensogramme sind der folgenden Abbildung zusammengestellt:

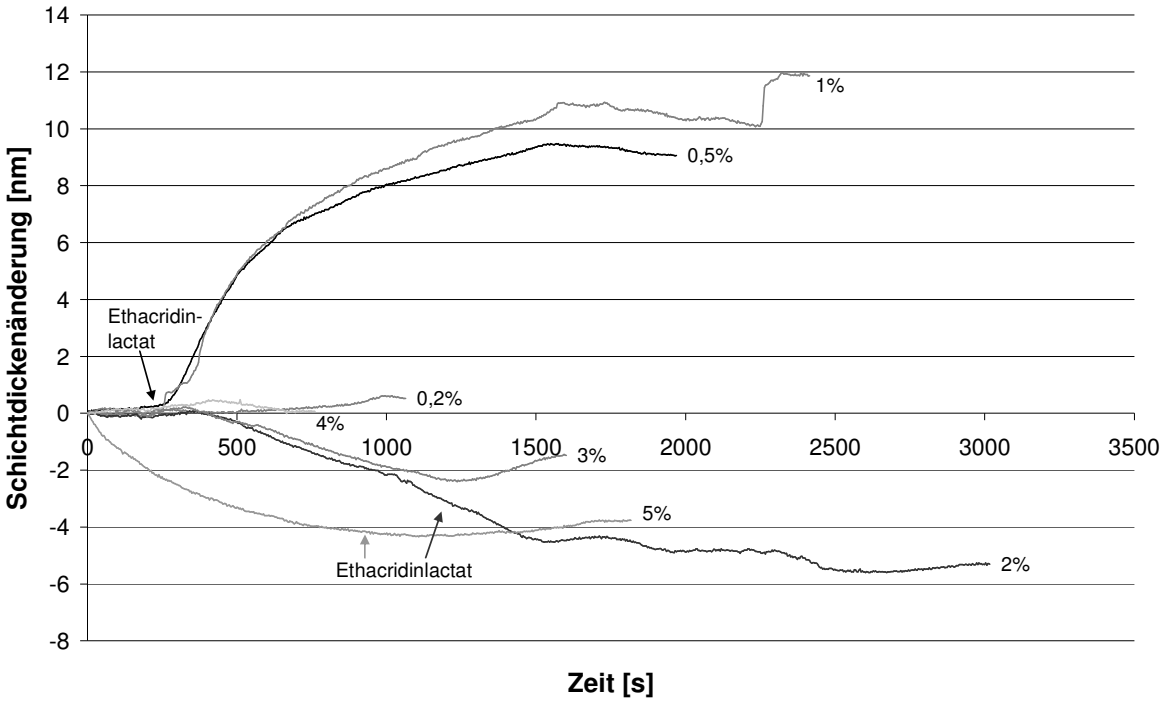


Abbildung 36: Bindung von Ethacridinlactat 10 mg/mL auf Polyurethan. Es wurden Polyurethan-Lösungen der Konzentration 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% und 5% verwendet, von denen jeweils 200 µL auf die Glasträger aufgebracht wurden. Eine Schichtdickenzunahme ist nur bei der 0,5%igen und bei der 1%igen Lösung zu beobachten.

Bei der am niedrigsten konzentrierten Polyurethan-Lösung (0,2%) und der 4%igen Lösung ist überhaupt kein Signal zu sehen.

Schichtdickenzunahmen von 9 bzw. 10 nm ergaben sich mit den Beschichtungen aus der 0,5%igen und der 1%igen Polyurethan-Lösung.

Mit den höher konzentrierten Lösungen ergaben sich Schichtdickenabnahmen, bzw. eine signalfreie Messkurve (4%). Auch waren auf den Trägern nach dem Spincoating deutliche Schlieren zu erkennen, so dass es nicht sinnvoll erscheint, die hohen Polyurethan-Konzentrationen für die Beschichtung zu verwenden.

Im Folgenden wird die 0,5%ige Polyurethan-Lösung zum Beschichten der Glasträger verwendet.

3.1.3.2 Bindung von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an Polyurethan

Nachdem festgelegt worden war, wie die Beschichtung vorzubereiten ist, wurde nun auch die Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an Polyurethan untersucht. Die Bindungskurve von Ethacridinlactat entspringt Abbildung 36.

Die folgende Abbildung stellt die drei Wirkstoffe einander gegenüber:

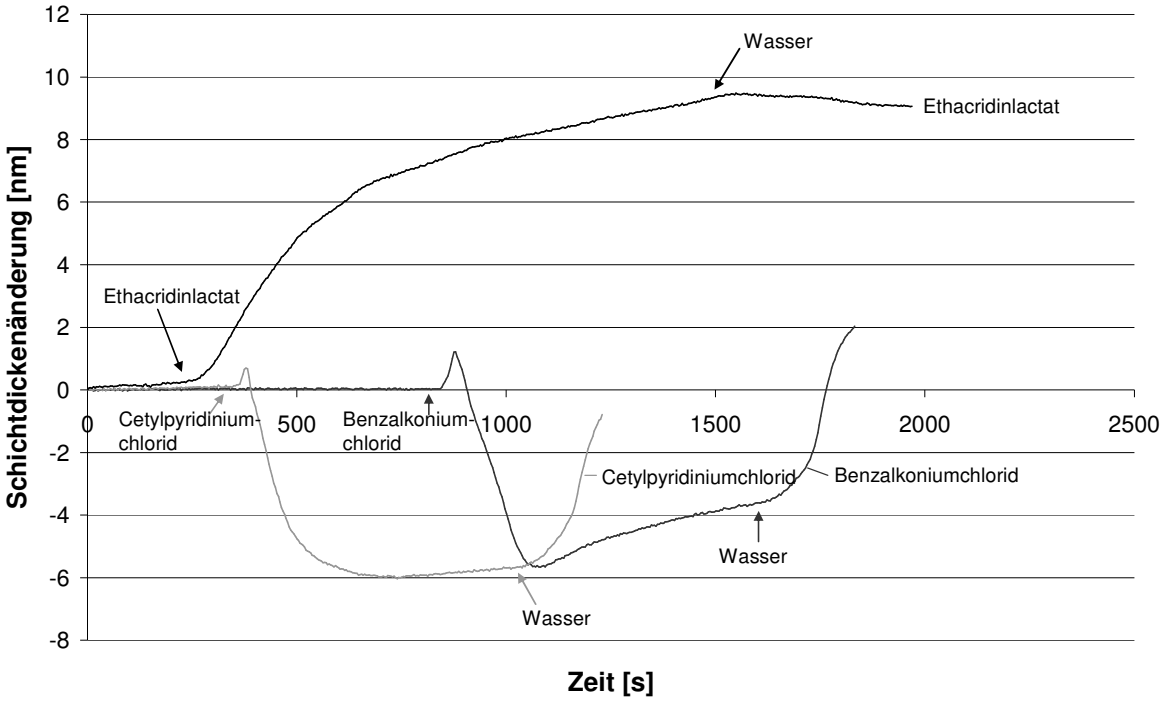


Abbildung 37: Bindung von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an eine Polyurethan-Oberfläche (0,5%). Auch hier ist bei Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid eine Schichtdickenabnahme zu beobachten, die aber bei Wasserzugabe reversibel ist. Bei Ethacridinlactat sieht man eine Schichtdickenzunahme, die bei Wasserzugabe bestehen bleibt.

Wie schon auf der Carboxyloberfläche ergibt sich bei den tensidischen Substanzen Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid eine Schichtdickenabnahme. Bei Cetylpyridiniumchlorid beträgt diese 6 nm. Bei Benzalkoniumchlorid wird die Schicht zunächst ebenfalls um 6 nm kleiner, die Messkurve steigt jedoch noch während der Wirkstoffzugabe auf -3 nm an. Bei der Zugabe von Wasser kommt es bei beiden Messkurven wieder zu einer Schichtdickenzunahme um etwa 6 nm, möglicherweise auch um mehr. Leider wurden die Messungen beendet, bevor eine Annäherung der Kurven an einen bestimmten Wert zu erkennen war. Diese auf die Wasserzugabe folgende Zunahme deutet darauf hin, dass Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid sich nicht stabil in die Polyurethanmatrix einlagern konnten und wieder ausgewaschen wurden.

Bei Ethacridinlactat wird eine Schichtdickenzunahme um 9 nm beobachtet, die auch bei der Zugabe von Wasser bestehen bleibt. Die Einlagerung des Wirkstoffes in die Polyurethanmatrix scheint also stabil zu sein.

Aus den bisher beschriebenen Ergebnissen heraus fiel die Entscheidung, im Folgenden mit Ethacridinlactat weiterzuarbeiten.

3.1.3.3 Ermitteln eines geeigneten Volumens zum Spincoating

Ein Versuch, der eigentlich schon zu einem früheren Zeitpunkt hätte durchgeführt werden müssen, ist das Ermitteln des Volumens, das vor dem Spincoating auf den Glasträger aufgebracht wird.

Bisher wurde mit einem Volumen von 200 µL gearbeitet; nun wurde untersucht, ob sich andere Bindungskurven ergeben, wenn stattdessen 400 µL Polyurethan-Lösung verwendet werden.

Um die Volumina miteinander zu vergleichen, wurde die Bindung von Ethacridinlactat (10 mg/mL) auf den jeweiligen Oberflächen untersucht:

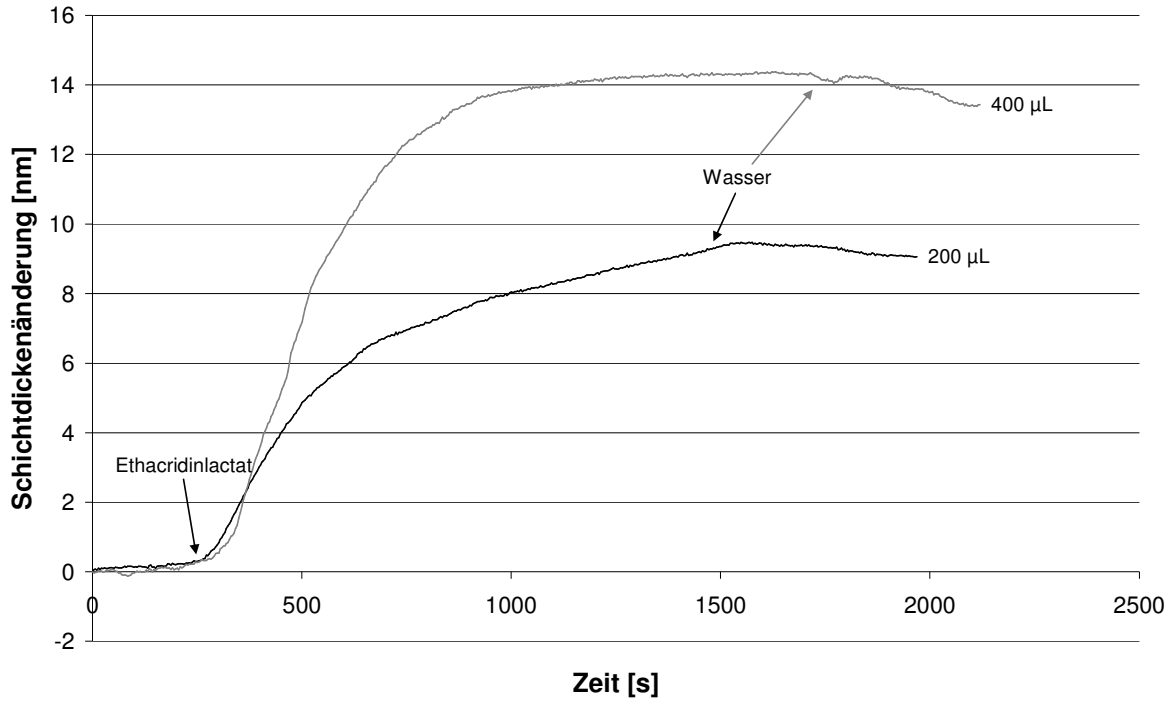


Abbildung 38: Bindung von Ethacridinlactat (10 mg/mL) auf zwei Oberflächen, die durch das Aufbringen von 200 µL bzw. 400 µL 0,5%iger Polyurethan-Lösung hergestellt wurden.

Während bei dem geringeren Volumen eine Schichtdickenzunahme von 9 nm zu verzeichnen war, ist bei dem höheren Volumen sogar eine Schichtdickenzunahme von 14 nm zu

beobachten. Die Bindung ist in beiden Fällen stabil, d.h. das Signal bleibt auch bei Wasserzugabe bestehen.

Da die Schichtdickenzunahme durch die Verwendung des höheren Volumens erheblich gesteigert werden konnte, wird im Folgenden die Beschichtung mit 400 µL 0,5% Polyurethan-Lösung hergestellt.

3.1.3.4 Bindung von Ethacridinlactat-Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Polyurethan

Für die Untersuchung der Bindung unterschiedlich konzentrierter Ethacridinlactat-Lösungen an Polyurethan wurde die Polyurethan-Schicht durch Spincoating mit 400 µL 0,5%iger Lösung hergestellt.

Es wurden Ethacridinlactat-Konzentrationen von 1 mg/mL, 5 mg/mL und 10 mg/mL untersucht:

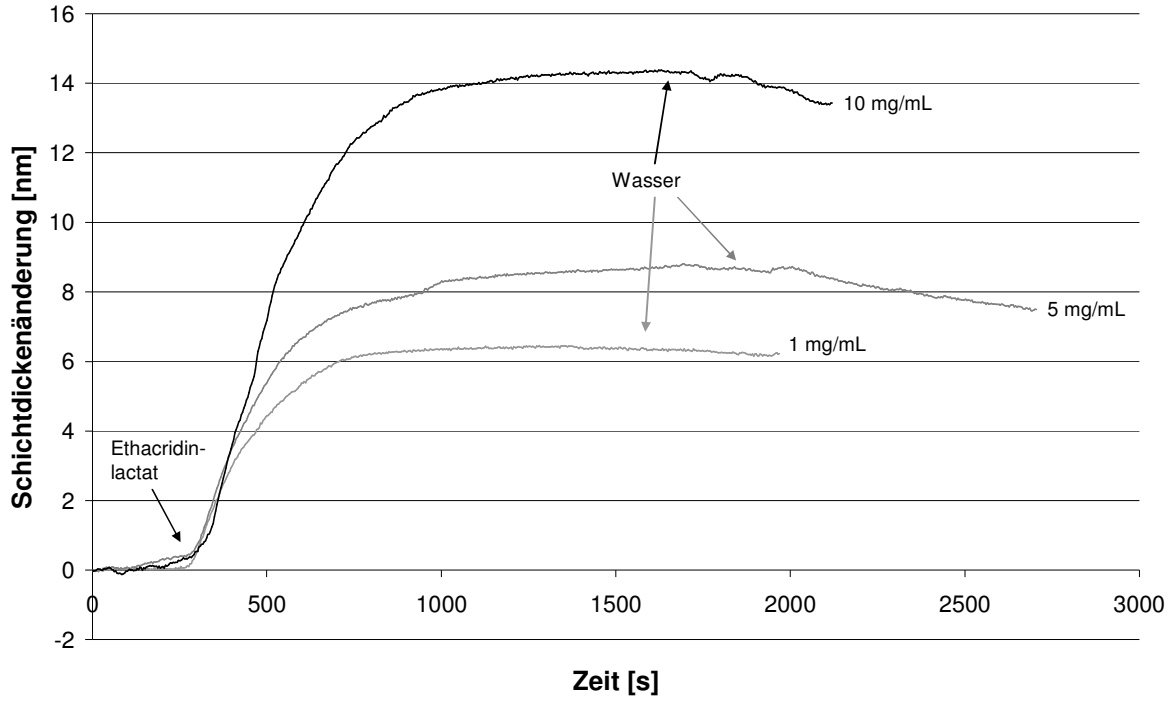


Abbildung 39: Sensogramm der Bindung von Ethacridinlactat an Polyurethan (0,5%, 400 µL) in den Konzentrationen 1 mg/mL, 5 mg/mL und 10 mg/mL. Je höher die Lösung konzentriert ist, desto ausgeprägter ist die Schichtdickenzunahme.

Wie schon aus Abschnitt 3.1.3.3 bekannt, ergibt sich bei der Ethacridinlactat-Lösung der Konzentration 10 mg/mL ein Signal von 14 nm. Bei der Konzentration von 5 mg/mL wird ein Signal von 9 nm beobachtet, bei einer Konzentration von 1 mg/mL eine Schichtdicken-zunahme um gut 6 nm. Alle Signale bleiben bei Wasserzugabe weitestgehend bestehen.

Beim Auftragen der Schichtdickenzunahmen gegen die Konzentration ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang:

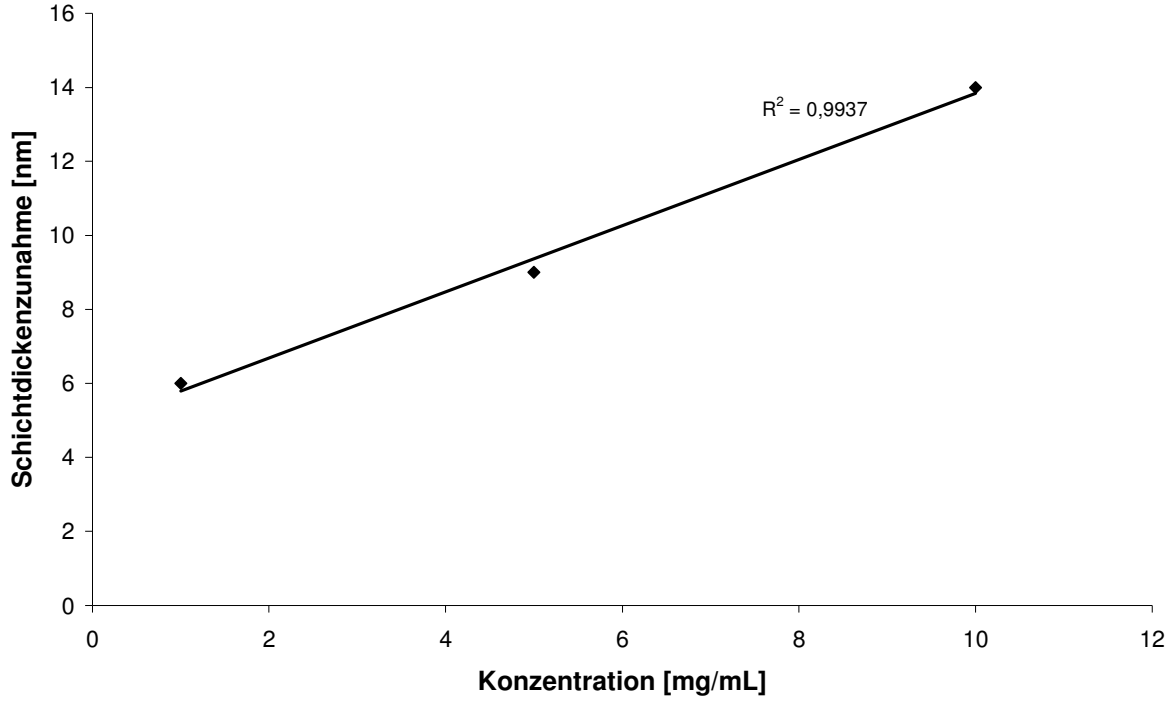


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen Ethacridinlactat-Konzentration und Schichtdickenzuwachs

3.1.4 Bindung von Ethacridinlactat an eine aminofunktionalisierte amorphe Kohlenstoff-Beschichtung

Dieser Versuch soll die Bindung von Ethacridinlactat an die auf dem Schlauchmaterial immobilisierten Spacer simulieren. Die Aminooberfläche, an die Bernsteinsäure gekoppelt wird, entstammt nun nicht mehr einer Aminosilanisierung mit APTES, sondern einer Plasmabeschichtung mit Ethylengas, dem Ammoniak beigemischt wurde.

Die Sensogramme der Bindung von Ethacridinlactat in zwei Konzentrationen sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

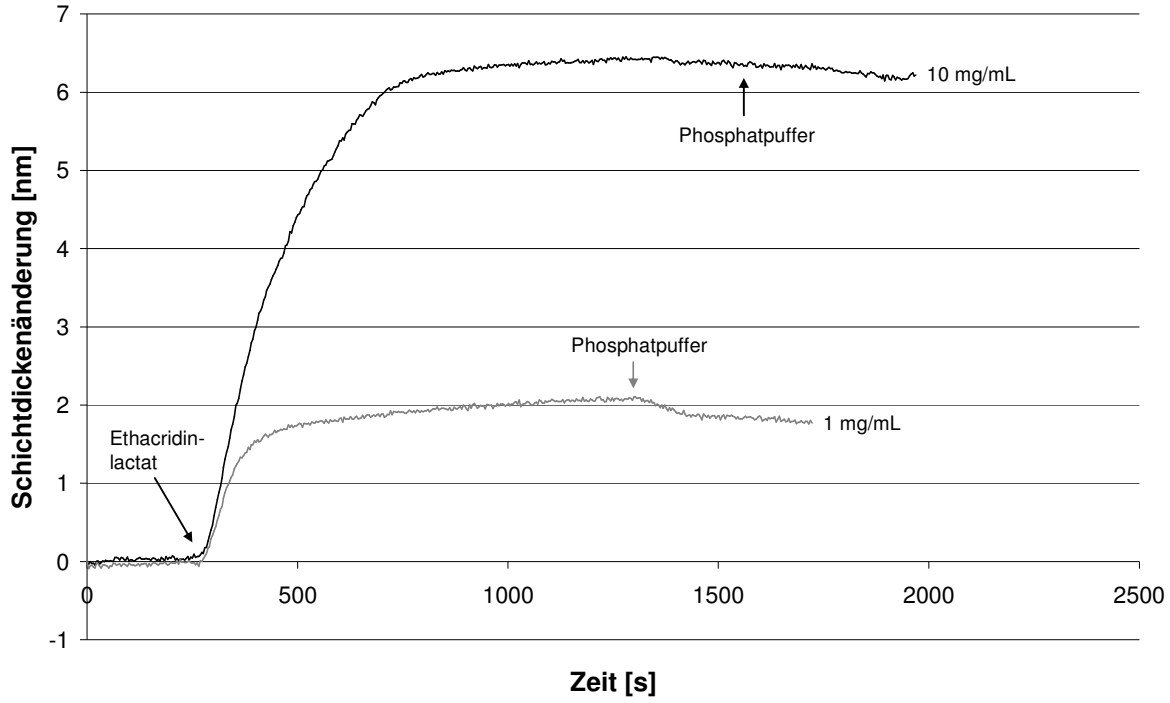


Abbildung 41: Bindung von Ethacridinlactat in den Konzentrationen 1 mg/mL und 10 mg/mL an eine DLC-NH3-Schicht, die mit Bernsteinsäureanhydrid carboxyfunktionalisiert wurde.

Mit der Ethacridinlactat-Lösung in der Konzentration von 1 mg/mL ist ein Schichtdicken-zuwachs von 2 nm zu beobachten, bei der Konzentration von 10 mg/mL ergibt sich sogar ein Signal von 6,5 nm. Beide Signale bleiben beim Spülen der Chips mit Phosphatpuffer bestehen.

Damit wurde gezeigt, dass Ethacridinlactat auch auf der funktionalisierten a:CH-Schicht binden kann, eine Immobilisierung des Wirkstoffes auf dem Stent über einen Spacer ist demnach möglich.

Versuche, die a:CH-Schicht auf einen mit Polyurethan beschichteten Glasträger aufzubringen, sind zwar gelungen. Eine Messung der Bindung von Ethacridinlactat auf dieser Schicht mit der Spektralphaseninterferenz-Methode war jedoch nicht möglich. Es wurde entweder die Bindung von Ethacridinlactat auf Polyurethan erfasst oder die an den Spacer, je nachdem ob der Messpunkt auf einer Beschichtungslücke lag oder nicht. Die Messung der Bindung über den Spacer wurde in den entsprechenden Fällen zusätzlich sehr stark durch Quelleffekte der Polymermatrix gestört.

Ein Bespiel hierfür zeigt Abbildung 42:

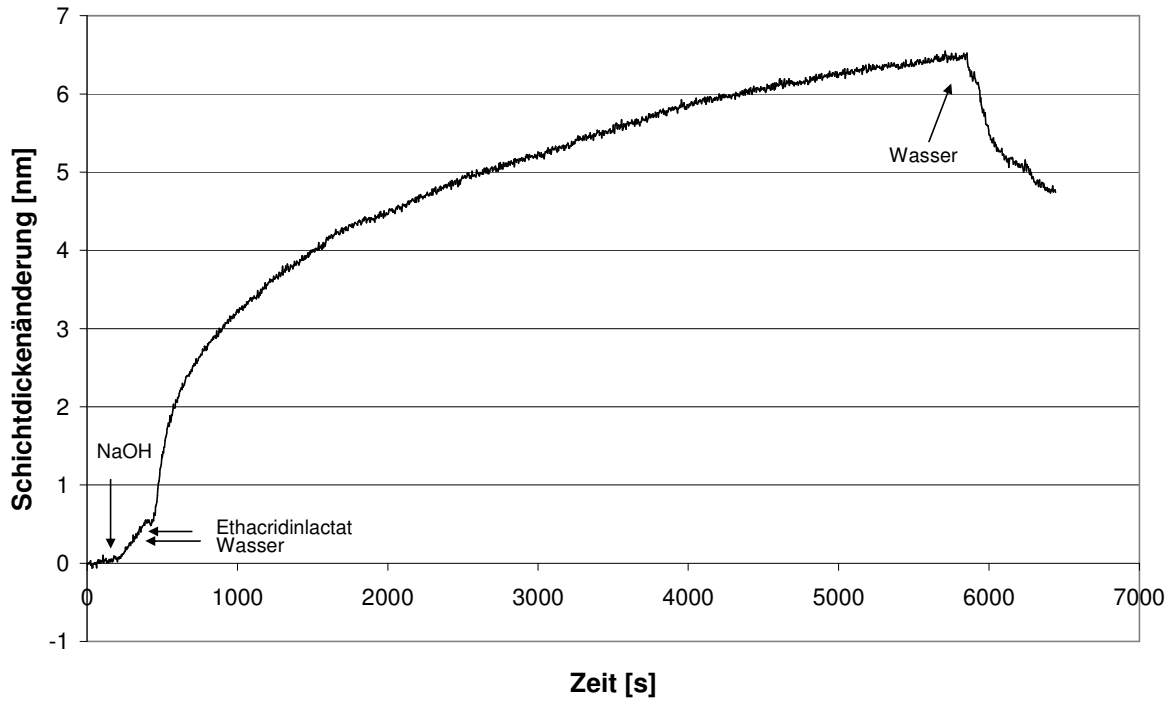


Abbildung 42: Bindung von Ethacridinlactat 10 mg/mL auf einer DLC-NH3-Schicht, die auf eine Polyurethan-Schicht aufgebracht und anschließend mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt wurde. Es ist nur die Bindung an Polyurethan zu sehen.

3.2 Messungen mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS)

3.2.1 Messung der Bindung von verschiedenen Wirkstoffen an eine carboxylierte Oberfläche

In den ersten Versuchen wurden wie bei den SPI-Messungen die Messchips zunächst mit Wasser gespült, dann mit Natronlauge pH 8, wieder mit Wasser und schließlich mit Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid oder Ethacridinlactat, bevor am Ende wieder Wasser zugegeben wurde, um zu testen, ob eine stabile Bindung stattgefunden hatte.

Nach einiger Zeit erfolgte jedoch der Wechsel auf Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten. Schließlich wurde festgestellt, dass die bisherigen Messungen nicht korrekt durchgeführt worden waren, da der Messchip falsch herum in das Messgerät eingelegt worden war.

In den folgenden Abschnitten finden sich nur diejenigen Ergebnisse, die nach der Identifizierung dieses Fehlers erzielt wurden, da sich nur hier die Signale in realistischen Bereichen befinden. Es findet also keine Zugabe von Natronlauge mehr statt.

Die Messchips wurden wie in Abschnitt 2.2.1.1.1 beschrieben vorbereitet und die Messung entsprechend der in Abschnitt 2.2.1.1.1.2 erläuterten Methode durchgeführt.

3.2.1.1 Messung der Bindung von Ethacridinlactat

Diese erste Messung zeigt die Bindung von Ethacridinlactat in einer Konzentration von 5 mg/mL an eine Carboxyloberfläche, wobei der Chip entweder mit Wasser oder mit Ammoniumchlorid-Puffer pH 8,7 0,1 M konditioniert und gespült wurde. Die Messkurven stellen sich als Mittelwerte von jeweils drei Messungen dar. Alle Messungen wurden auf demselben Chip durchgeführt.

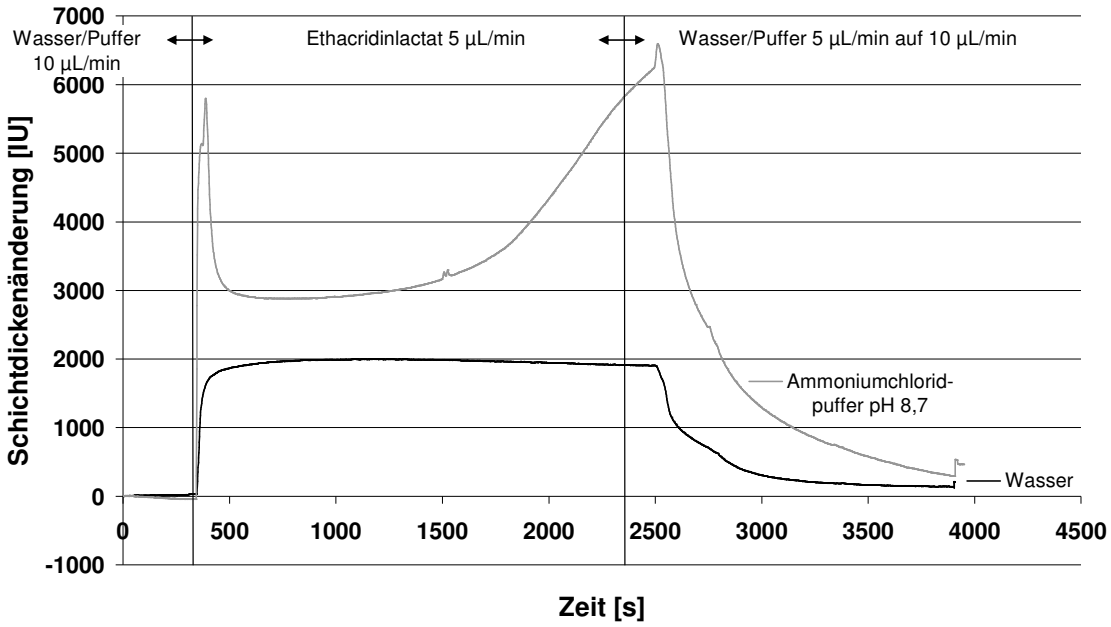


Abbildung 43: Sensogramm der Bindung von Ethacridinlactat in einer Konzentration von 5 mg/mL an eine Carboxyloberfläche in einem ungepufferten System und bei pH 8,7 0,1 M.

Im wässrigen Milieu zeigt sich bei der Bindung von Ethacridinlactat eine schöne Bindungskurve, deren Sättigung bei 2000 IU (etwa 2 nm) eintritt. Beim Spülen wird das Ethacridinlactat jedoch – im Unterschied zu den SPI-Messungen – vollständig wieder abgewaschen.

Bei pH 8,7 0,1 M ergibt sich bei Zugabe der Ethacridinlactat-Lösung im Sensogramm eine Spitze. Unter weiterer Wirkstoffzugabe sinkt die Kurve zunächst wieder auf 3000 IU (etwa 3 nm), stagniert dort jedoch nicht, sondern steigt wieder an bis auf 6000 IU. Bei Zugabe des Ammoniumchlorid-Puffers ergibt sich wiederum eine Spitze; der Wirkstoff wird aber auch hier komplett wieder abgewaschen.

3.2.1.2 Messung der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid

In der folgenden Abbildung ist die Bindung von Cetylpyridiniumchlorid an eine Carboxyloberfläche bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Cetylpyridiniumchlorid wurde in einer Konzentration von 5 mg/mL eingesetzt; als Puffersysteme fanden Acetatpuffer pH 4,7 0,2 M, PBS pH 7,3 0,012 M, sowie Ammoniumchlorid-Puffer pH 8,7 0,1 M Anwendung. Zusätzlich wurden Messungen in einem ungepufferten System durchgeführt. Auch hier wurden die Messungen jeweils mehrmals durchgeführt und der Mittelwert aus allen Messungen gebildet. Die Messungen wurden mit demselben Chip durchgeführt, der auch für die Messung der Bindung von Ethacridinlactat (siehe Abschnitt 3.2.1.1) verwendet wurde.

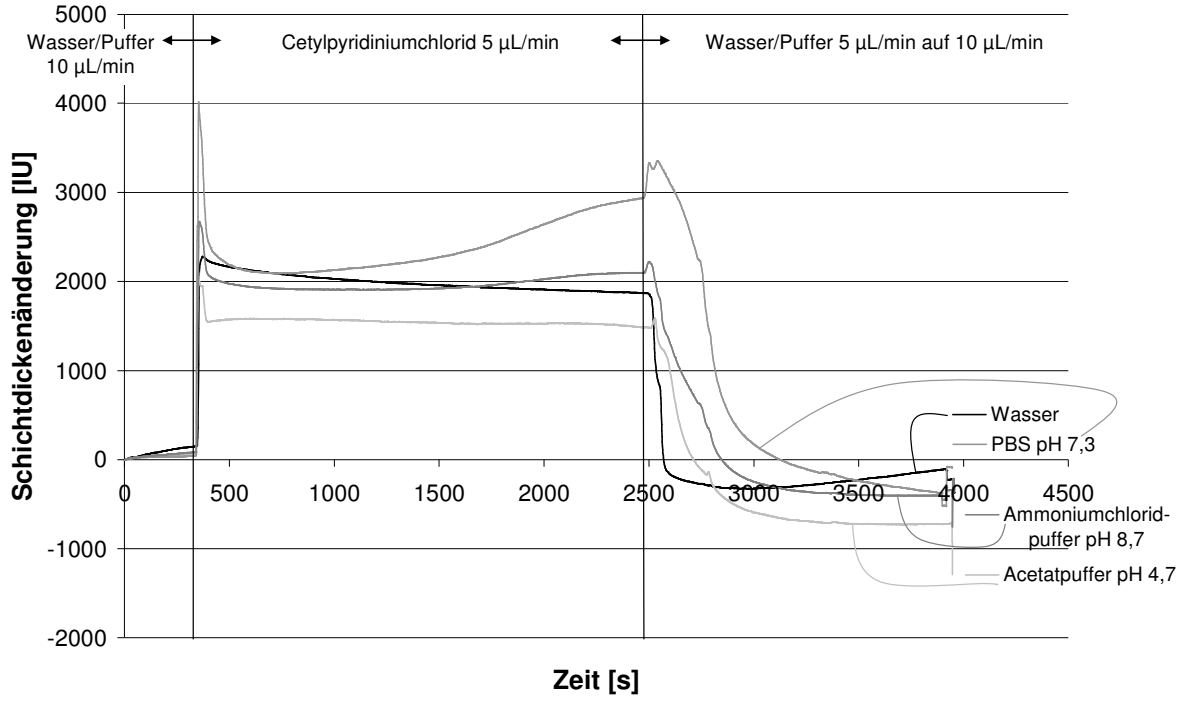


Abbildung 44: Sensogramm der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid in einer Konzentration von 5 mg/mL an eine Carboxyloberfläche in einem ungepufferten System, sowie bei pH 4,7 0,2 M, pH 7,3 und bei pH 8,7 0,1 M.

Bei allen vier Kurven zeigt sich bei Zugabe von Cetylpyridiniumchlorid eine Spitze, bei Wasser ist sie am schwächsten ausgeprägt. Das Signal nach der Spitze erreicht bei Wasser, pH 8,7 0,1 M und pH 7,3 zunächst eine Höhe von 2000 IU (2 nm). Bei pH 7,3 erfolgt unter weiterer Zugabe von Cetylpyridiniumchlorid noch eine allmähliche Zunahme des Signals auf knapp 3000 IU (3 nm). Bei pH 4,7 0,2 M erreicht das Signal nur eine Höhe von etwa 1500 IU (1,5 nm).

Beim anschließenden Spülen treten bei den drei Pufferlösungen wieder Spitzen auf, bei Wasser nicht. In allen Fällen wird der Wirkstoff jedoch von der Oberfläche wieder abgewaschen.

Bemerkenswert ist vor allem, dass sich in den Sensogrammen eine Schichtdickenzunahme zeigt, während bei den SPI-Messungen bei Zugabe von Cetylpyridiniumchlorid zu einer Carboxylschicht eine Schichtdickenabnahme beobachtet wurde. Es ist möglich, dass die Beschichtung der RIfS-Glasträger mit der Beschichtungsmethode für die SPI-Glasträger nicht funktioniert. Diese Vermutung soll in einem Kontrollversuch abgesichert werden (Abschnitte 2.2.1.1.4 und 3.2.1.4).

Die Messung der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid auf einer Carboxyloberfläche wurde noch einmal auf einem anderen Messchip wiederholt, um zu untersuchen, ob die Messsignale auch chipübergreifend reproduzierbar sind.

Dazu wurde das Puffersystem mit Ammoniumchlorid (pH 8,7 0,1 M) verwendet:

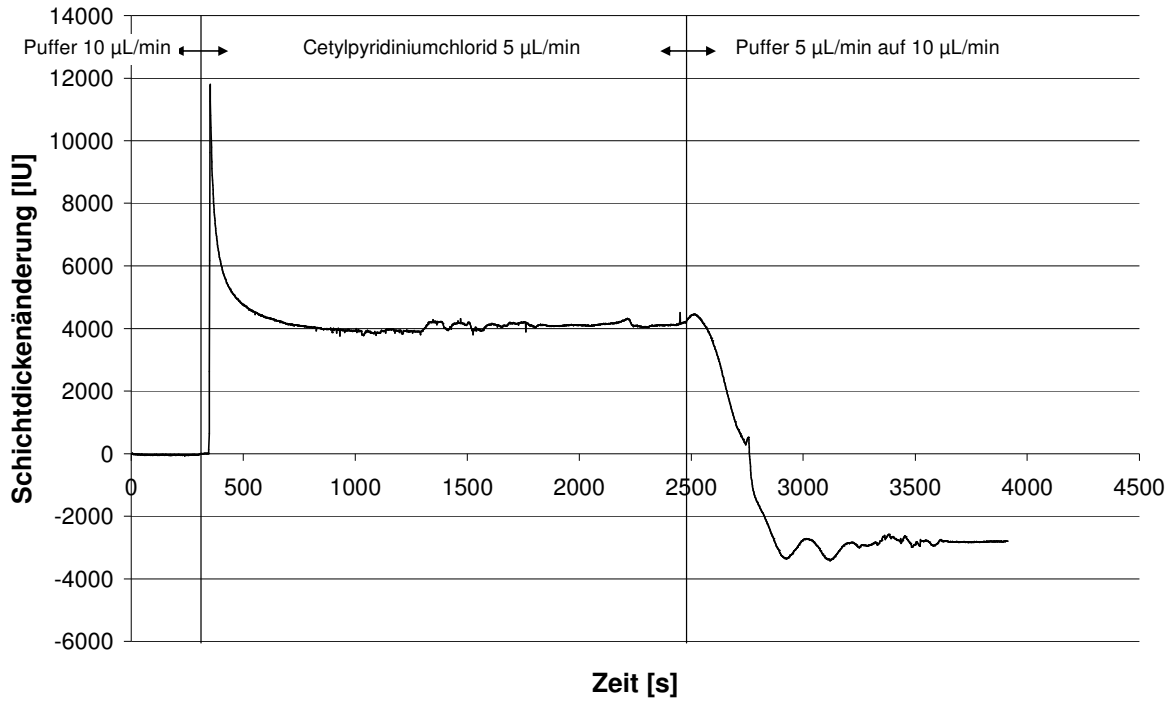


Abbildung 45: Sensogramm der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid der Konzentration 5 mg/mL auf einem anderen, carboxylbeschichteten Chip bei pH 8,7 0,1 M.

Während mit dem ersten Chip (Abbildung 44) bei der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid bei pH 8,7 0,1 M ein Signal von 2000 IU erreicht wurde, zeigt sich hier sogar eine Schichtdickenzunahme um 4000 IU (4 nm). Die Spitze bei Wirkstoffzugabe ist hier ebenfalls

vorhanden, die Spitze zu Beginn des Spülvorganges ist weniger ausgeprägt. Der Wirkstoff wird vollständig von der Oberfläche abgespült.

Je nach Chip kann das Messergebnis also unterschiedlich sein.

3.2.1.3 Vergleich der Bindungskurven von Ethacridinlactat und Cetylpyridiniumchlorid

Um die Bindungskurven der beiden untersuchten Wirkstoffe Ethacridinlactat und Cetylpyridiniumchlorid einander gegenüberzustellen, wurden die in Abbildung 44 dargestellten Messkurven der Bindung des Cetylpyridiniumchlorid gemittelt. Aus den Messkurven der Bindung von Ethacridinlactat wurde kein Mittelwert gebildet, da die beiden Kurven dafür zu weit auseinander liegen.

Im folgenden Diagramm ist der Vergleich der beiden Wirkstoffe in drei Messkurven dargestellt:

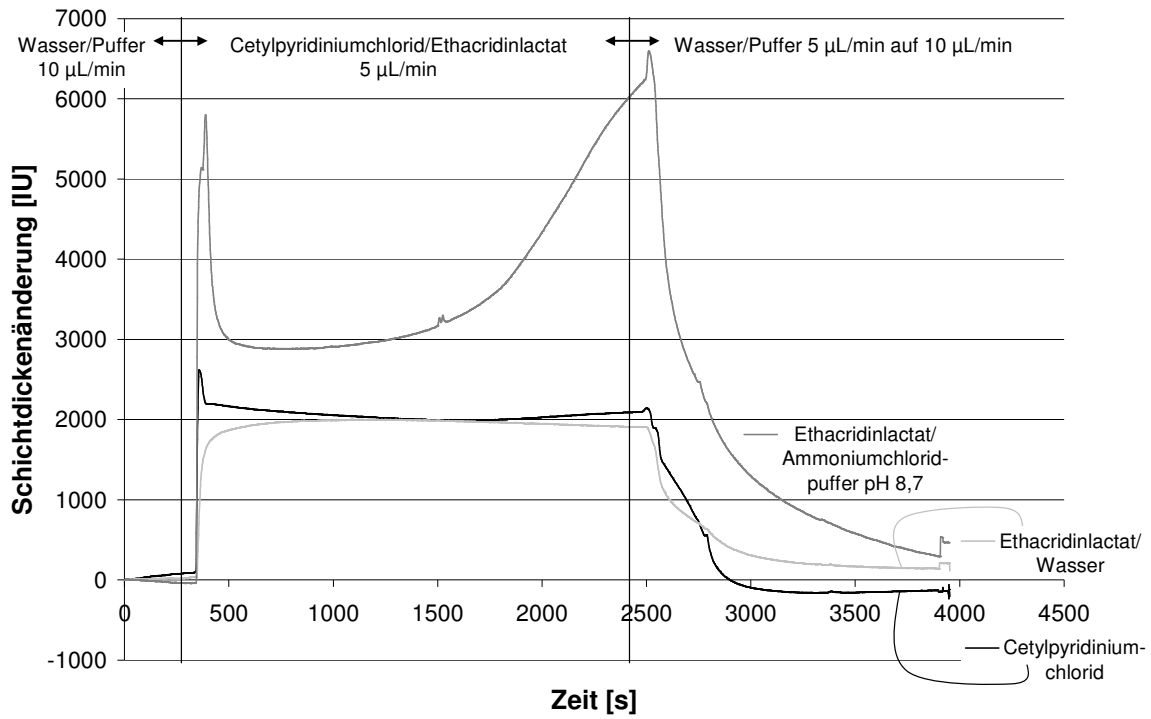


Abbildung 46: Vergleich der Bindungskurven von Ethacridinlactat und Cetylpyridiniumchlorid. Bei Cetylpyridiniumchlorid wurde über alle Messkurven in Abbildung 44 gemittelt, bei Ethacridinlactat wurden die Messkurven aus Abbildung 43 übernommen.

In dieser Übersicht zeigt sich noch einmal, dass sich zwischen den Messsignalen der Bindung von Ethacridinlactat (in Wasser) und Cetylpyridiniumchlorid keine wesentlichen Unterschiede ergeben. Beide erzielen einen Schichtdickenzuwachs von etwa 2000 IU, obwohl die Moleküle unterschiedlich groß sind. Das kann Aufschluss über die Art der Anlagerung an

die Oberfläche geben. In diesem Zusammenhang ist es auch denkbar, dass die andere Kurvenform der Bindung von Ethacridinlactat bei pH 8,7 0,1 M nicht durch Wirkstoffaggregation zustande kommt, sondern dadurch, dass für Ethacridinlactat bei diesem pH-Wert eine andere Anordnung auf der Oberfläche günstiger ist.

3.2.1.4 Kontrollversuch: Erfolg der Carboxylbeschichtung auf RIfS-Chips

Um zu überprüfen, ob die Carboxylbeschichtung erfolgreich war, wurden die carboxylbeschichteten Chips mit NHS und DCC aktiviert, um Streptavidin an die Oberfläche zu koppeln. Streptavidin bildet mit Biotin eine stabile und spezifische Wechselwirkung aus.

Es ist also zu erwarten, dass sich bei der Zugabe von Biotin oder eines biotinylierten Antikörpers eine stabile Schichtdickenzunahme bei der Interferenz-Messung ergibt.

Das entsprechende Sensogramm ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

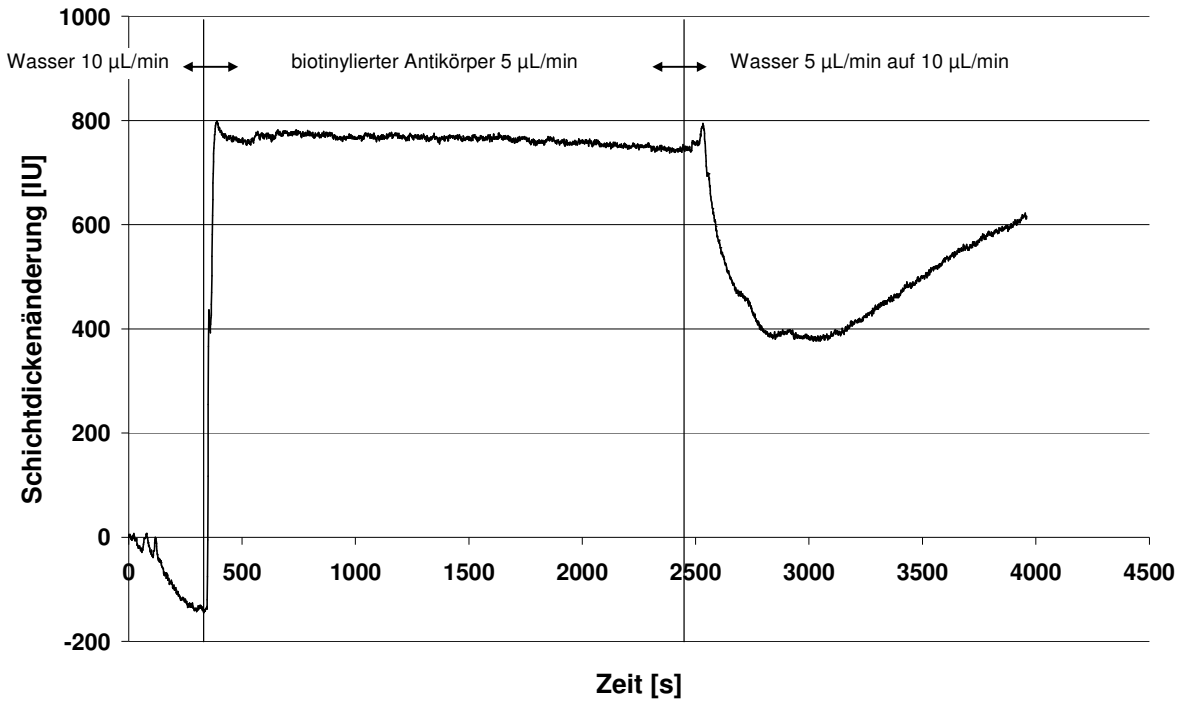


Abbildung 47: Sensogramm der Bindung eines biotinylierten Antikörpers an eine Oberfläche auf der Streptavidin immobilisiert wurde.

Die Bindung des biotinylierten Antikörpers an die Oberfläche ist nicht stabil. Das Signal beträgt nur 800 IU, das sind ungefähr 0,8 nm. Das kleine Molekül Ethacridinlactat verursachte bereits ein höheres Signal.

3.3 Untersuchung der Freisetzungskinetik

Es soll ermittelt werden, wie die Schläuche am besten zu behandeln sind um möglichst viel Wirkstoff durch Quellen in das Material einzuschließen. Dabei ist auf zwei Punkte zu achten:

Einerseits soll ein geeignetes Lösungsmittel zum Quellen des Polyurethan-Materials gefunden werden. Andererseits soll auch eine geeignete Vorgehensweise zur Wirkstoffeinbringung entwickelt werden, d.h. am Ende soll eine Entscheidung darüber fallen, womit die Schläuche nach dem Quellen im wirkstoffhaltigen Lösungsmittel gespült werden sollen und ob vor dem Spülen ein Trocknungsschritt stattfinden sollte.

Weiterhin soll festgestellt werden, ob zwischen den verschiedenen Plasmabeschichtungen, die von NTTF geliefert wurden, Unterschiede hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften bestehen. Sollte dies der Fall sein, könnte das für das Projekt BioMinMed den Ausschlag für die Entscheidung für eine der Beschichtungen geben.

Da die Harnleiterschienen über einen längeren Zeitraum in den Körper implantiert werden, ist es auch wichtig, zu untersuchen, wie sich die Freisetzungskinetik über einen längeren Zeitraum darstellt. Dazu wurden zunächst Freisetzungsversuche über eine Woche durchgeführt, später auch ein Freisetzungsversuch über ein halbes Jahr.

Abschließend wurde noch untersucht, wie verschiedene Einflussfaktoren die Freisetzungskinetik beeinflussen. Es wurden der Einfluss des Sterilisierens mit Ethylenoxid, der Einfluss der Bestrahlung der Proben mit UV-Licht, sowie der Einfluss des Freisetzungsmediums auf die Freisetzungskurven betrachtet. Weiterhin wurde untersucht, ob sich Unterschiede zwischen den Freisetzungskurven von Schläuchen unterschiedlichen Alters ergeben.

3.3.1 Ermitteln der geeigneten Quell- und Spültechnik

Der erste Schritt des Vorgehens ist die Bestimmung eines Lösungsmittels, das für das Einbringen von Ethacridinlactat in die Polyurethan-Matrix durch Quellen geeignet ist.

Weiterhin muss bestimmt werden, wie die Schläuche nach dem Quellen gereinigt werden sollen. Sollen sie mit Wasser gespült werden oder mit dem Lösungsmittel, in dem sie gequollen wurden?

Es wurden für diesen Versuchsteil Polyurethan-Schläuche mit einer DLC-K-Beschichtung, einer unfunktionalisierten Beschichtung mit amorphem Kohlenstoff, verwendet. Diese wurden gemäß der Beschreibung in Abschnitt 2.2.1.2.2 in den verschiedenen Ethacridinlactat-haltigen Lösungsmitteln gequollen und entweder mit Wasser oder mit dem Lösungsmittel, das

zum Quellen verwendet wurde, gespült. Es wurden auch für jedes Lösungsmittel ungespülte Schläuche zum Positivvergleich zurückgestellt.

Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden sie für Freisetzungsexperimente in PBS pH 7,3 0,012 M bei 37°C verwendet, die etwa sechs Stunden dauerten. Die Vermessung der freigesetzten Wirkstoffmengen erfolgte mit UV/Vis-Spektroskopie bei 420 nm, indem aus dem Gefäß mit dem Freisetzungspuffer zu verschiedenen Zeitpunkten je 150 µL Flüssigkeit entnommen wurden. Der Puffer wurde dabei nicht ausgetauscht. Der Grund hierfür liegt darin, dass die zu erwartenden Wirkstoffmengen zu gering sind, als dass sie bei einer nichtkumulativen Messung mit dieser Methode erfasst werden würden.

Anhand des Vergleiches der Freisetzungskurven soll die Entscheidung getroffen werden, mit was die Proben nach Quellen in Zukunft gespült werden sollen. Eine vorteilhafte Freisetzungskurve würde einen gleichmäßig steigenden Verlauf auf möglichst hohem Niveau zeigen.

Um die freigesetzten Wirkstoffmengen aus den gemessenen Absorptionen zu berechnen, wurde für den Absorptionsbereich von 0,115 AU bis 0,581 AU (25 bis 150 µg/mL) die folgende Kalibriergerade verwendet:

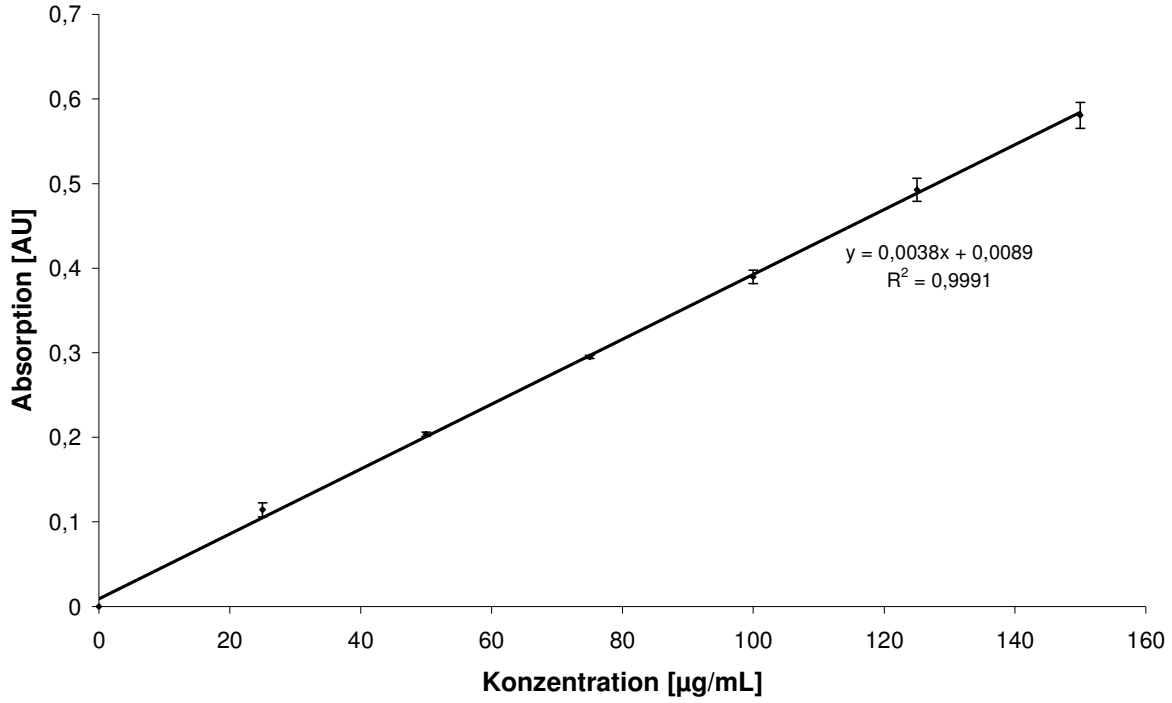


Abbildung 48: Kalibriergerade für die UV/Vis-Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmengen im Konzentrationsbereich von 25 bis 150 µg/mL (Absorption von 0,115 bis 0,581 AU)

Für den Absorptionsbereich von 0,012 AU bis 0,115 AU (2 bis 25 µg/mL) wurde hingegen die folgende Kalibriergerade verwendet:

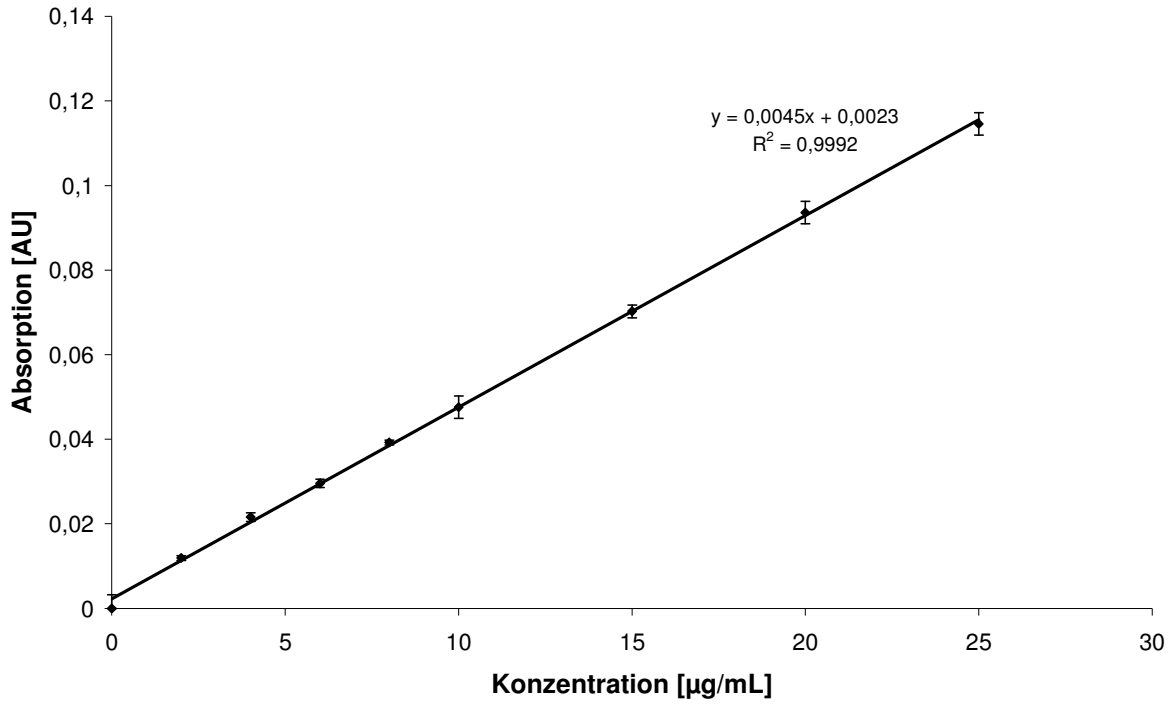


Abbildung 49: Kalibriergerade für die UV/Vis-Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmengen im Konzentrationsbereich von 2 bis 25 µg/mL (Absorption von 0,012 bis 0,115 AU)

Normalerweise geht man sogar davon aus, dass in Bereichen unterhalb von 0,25 AU keine Messungen zur Konzentrationsbestimmung mehr durchgeführt werden sollten, da hier kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Absorption mehr bestehe [Rücker et al., 2001]. Die Kalibriergeraden zeigen jedoch durchaus auch in diesem niedrigen Konzentrationsbereich noch einen linearen Zusammenhang an (Bestimmtheitsmaß von 0,9992). Da die gemessenen Wirkstoffmengen tatsächlich sehr niedrig waren, war es erforderlich, auch für den Bereich unterhalb von 25 µg/mL eine Kalibriergerade zu erstellen. Die meisten Freisetzungsmengen hätten sonst nicht bestimmt werden können, da sie außerhalb des durch die erste Kalibriergerade (Abbildung 48) bestimmten Bereiches lagen. Absorptionen, die oberhalb von 0,581 AU lagen, konnten durch Verdünnen der Untersuchungslösung in den durch die Kalibriergerade bestimmten Konzentrationsbereich gebracht werden.

Um die Errechnung negativer Freisetzungsmengen zu vermeiden, wurde zu allen gemessenen Absorptionen 0,0053 AU addiert. Der Wert setzt sich zusammen aus dem Betrag der niedrigsten gemessenen Absorption (-0,003 AU) und dem y-Achsenabschnitt der zweiten

Kalibriergerade (0,0023 AU). Dadurch wird der niedrigste Messpunkt per Definition auf eine Konzentration von 0 µg/mL gesetzt, die Abstände zwischen den Kurven bleiben gleich, es ergeben sich aber keine negativen Freisetzungsmengen.

Der vorliegende Abschnitt ist so aufgebaut, dass für jedes Lösungsmittel die Spülmethoden in einem eigenen Unterabschnitt miteinander verglichen werden. Am Ende erfolgt eine Zusammenfassung, die die Lösungsmittel einander gegenüberstellt, um auch auf die Frage nach einem geeigneten Quellmittel eine Antwort zu erhalten.

3.3.1.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer Mischung von 5 mL einprozentiger wässriger Ethacridinlactat-Lösung und 5 mL Aceton gequollen. Es resultiert also für die Quelllösung eine Ethacridinlactat-Konzentration von 0,5%.

Beim Quellen zeigten die 10 mm langen Schlauchstücke eine Längenzunahme auf 12,5 mm, also um 25%. Beim Trocknen schrumpften die Schlauchstücke wieder auf ihre ursprüngliche Größe zusammen.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, ein Teil wurde mit Aceton gespült und ein Teil mit Wasser.

Die Freisetzung fand bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M statt, die Vermessung erfolgte photometrisch, für die Umrechnung des Messsignals in die Konzentration wurde die in Abbildung 48 dargestellte Kalibriergerade verwendet.

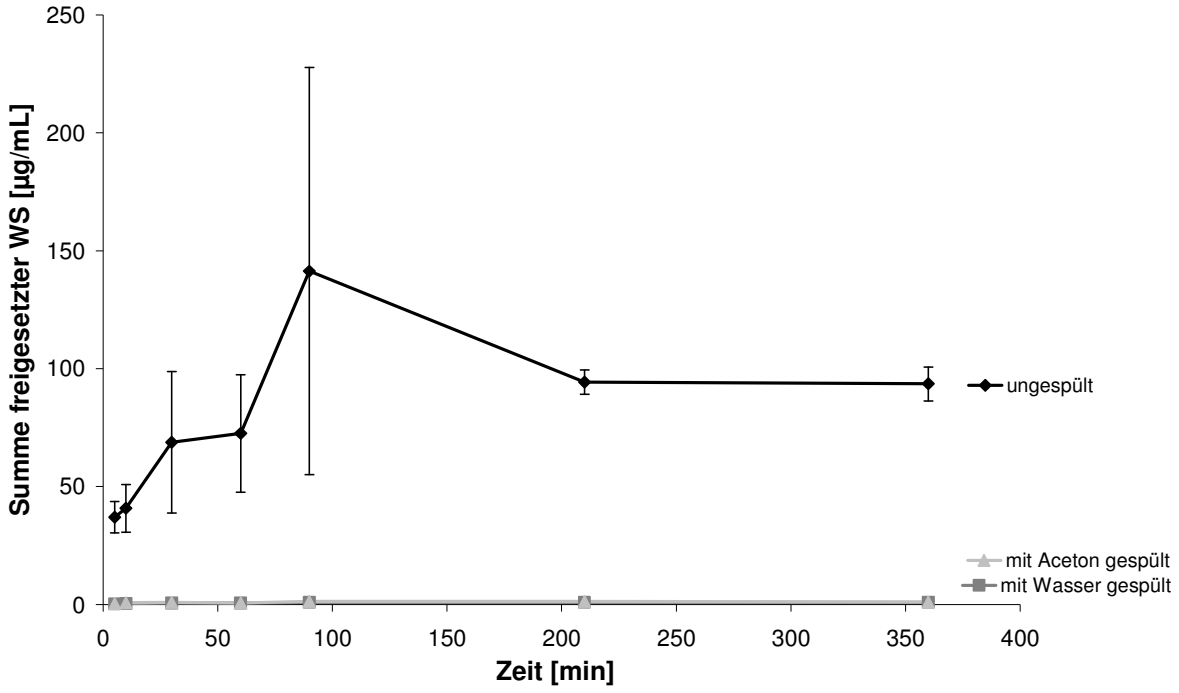


Abbildung 50: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Aceton 0,5% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht, mit Aceton oder mit Wasser gespült.

Betrachtet man den höchsten Wert (141 µg/mL) bei den ungespülten Schläuchen als Ausreißer, so werden hier nach 6 Stunden Wirkstoffmengen von 94 µg/mL erreicht. Bei dieser Menge stagniert die Kurve. Aus der Tatsache, dass die Freisetzungskurve der ungespülten Schläuche sich so weit über denen der gespülten Schläuche befindet, lässt sich

schließen, dass der detektierte Wirkstoff nicht etwa aus einer Freisetzung stammt, sondern dass es sich um Reste aus der Wirkstofflösung handelt, die noch an der Schlauchoberfläche anhaften.

Da die großen Unterschiede zwischen der Freisetzung aus gespülten und ungespülten Schläuchen die Übersichtlichkeit der Graphik erheblich beeinträchtigen, wird die Freisetzung aus den gespülten Schläuchen noch einmal in einem gesonderten Diagramm dargestellt:

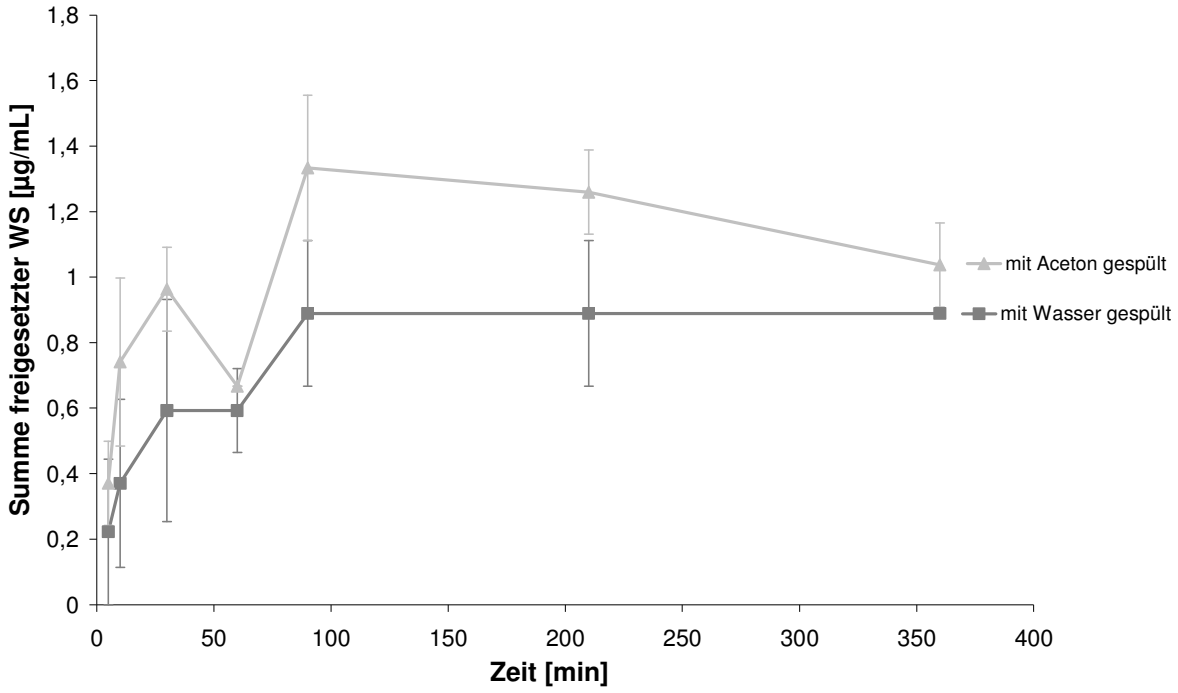


Abbildung 51: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Aceton 0,5% gequollenen Schläuchen. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurde die Messreihe der ungespülten Schläuche entfernt.

Einerseits ist hier zu sehen, dass sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Spülmethoden ergibt. Die Freisetzungskurve der mit Aceton gespülten Schläuche befindet sich geringfügig oberhalb der Freisetzungskurve der mit Wasser gespülten Schläuche.

Aus den mit Aceton gespülten Schläuchen sind nach 6 Stunden insgesamt 1,0 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, bei den mit Wasser gespülten Schläuchen waren es 0,9 µg/mL.

3.3.1.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 1 Stunde in einer Mischung von 1 mL einprozentiger wässriger Ethacridinlactat-Lösung und 9 mL Dioxan gequollen. Es resultiert also für die Quelllösung eine Ethacridinlactat-Konzentration von 0,1%.

Beim Quellen zeigten die Schläuche eine beim Trocknen reversible Längenzunahme von 10 mm auf 32,5 mm, also um 325%. Das starke Aufquellen hatte allerdings zur Folge, dass sich die Schläuche beim Trocknen stark verformten, auch wenn sie wieder auf ihre ursprüngliche Länge zusammenschrumpften.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, ein Teil wurde mit dreimal 20 mL Dioxan gespült und ein Teil mit dreimal 20 mL Wasser.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

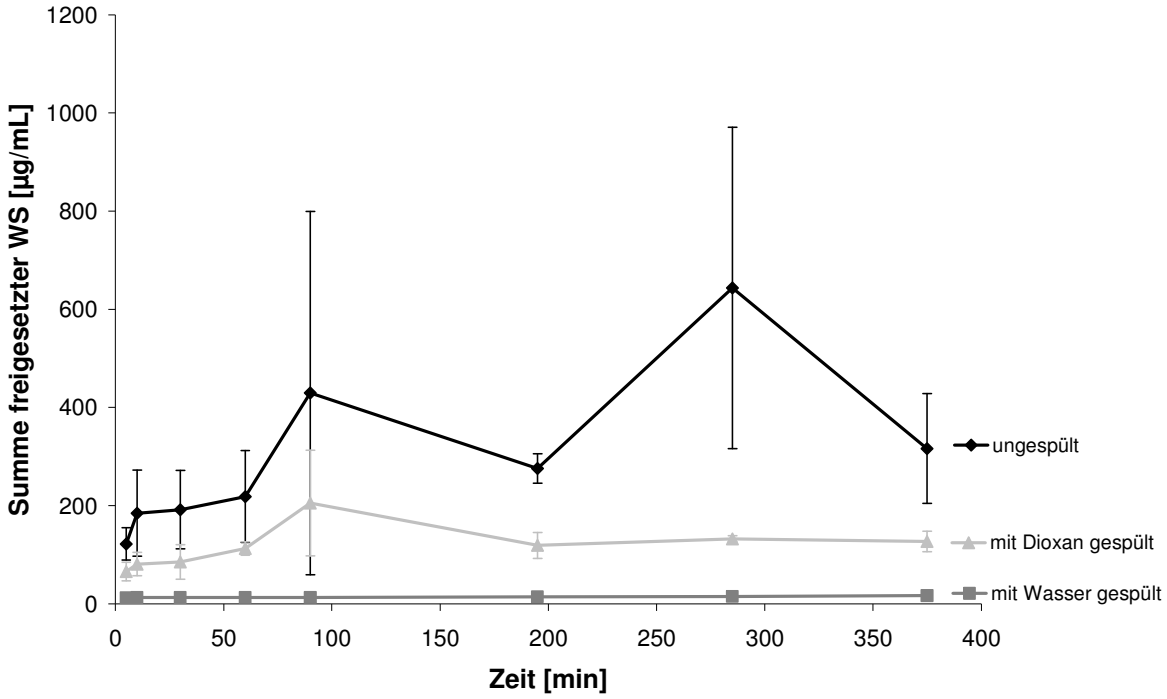


Abbildung 52: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht, mit Dioxan oder mit Wasser gespült.

Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass wiederum die größten Wirkstoffmengen bei der Freisetzung aus den ungespülten Schläuchen gemessen wurden. Die gemessene Konzentration nach 375 Minuten beträgt 316 µg/mL. Die Messpunkte bei 90 und 285 Minuten (429 µg/mL bzw. 643 µg/mL) wurden als Ausreißer interpretiert.

Auch bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen liegt die Freisetzungskurve der mit dem reinen Quellmittel gespülten Schläuche oberhalb der Kurve der mit Wasser gespülten Schläuche:

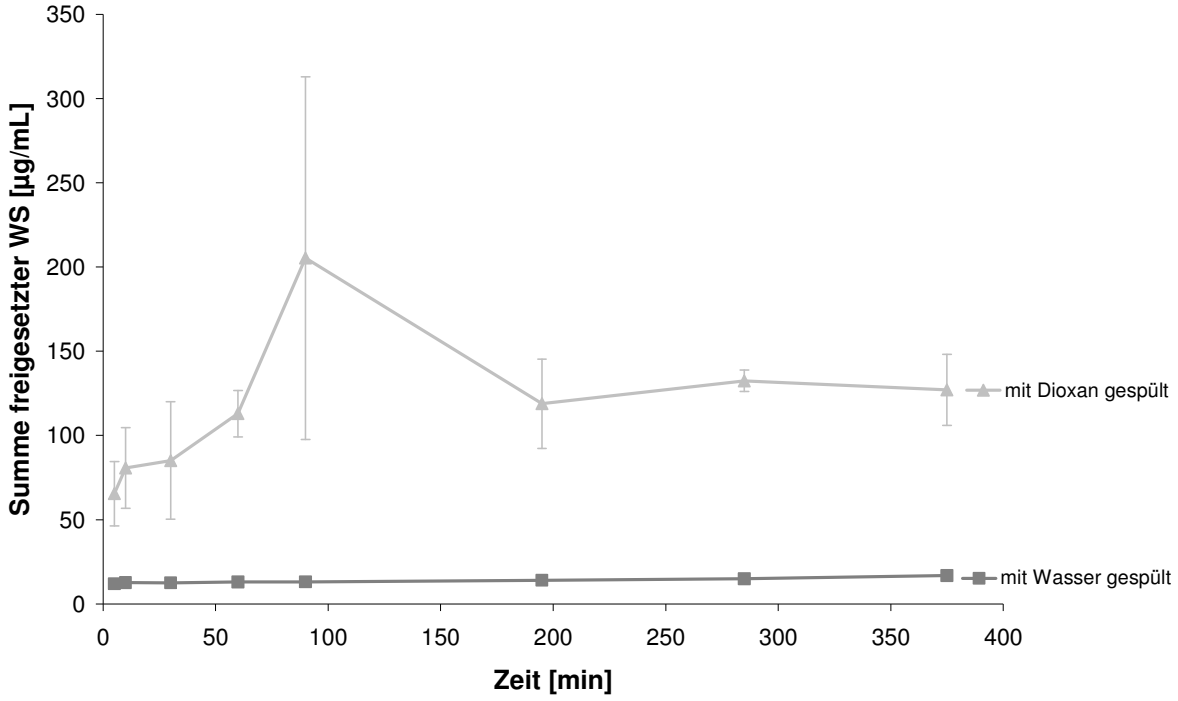


Abbildung 53: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollenen Schläuchen. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurde die Messreihe der ungespülten Schläuche entfernt.

Diesmal ist der Unterschied zwischen den beiden Kurven allerdings deutlich zu erkennen und auch zu erklären. Ethacridinlactat ist in Dioxan praktisch unlöslich; folglich kann es auch durch das Lösungsmittel nicht wirklich abgespült werden. Die nach 6 Stunden freigesetzte Wirkstoffmenge befindet sich mit 127 µg/mL ungefähr in der Mitte zwischen der von den ungespülten Schläuchen abgelösten Wirkstoffmenge (316 µg/mL) und der aus den mit Wasser gespülten freigesetzten Wirkstoffmenge von knapp 17 µg/mL. Die Tatsache, dass die von mit Dioxan gespülten Schläuche stammende Wirkstoffmenge trotz der Unlöslichkeit des Ethacridinlactats geringer ist als die von den ungespülten Schläuchen stammende, ist vermutlich schlicht auf Scherkräfte zurückzuführen.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Freisetzungskurve der mit Wasser gespülten Schläuche:

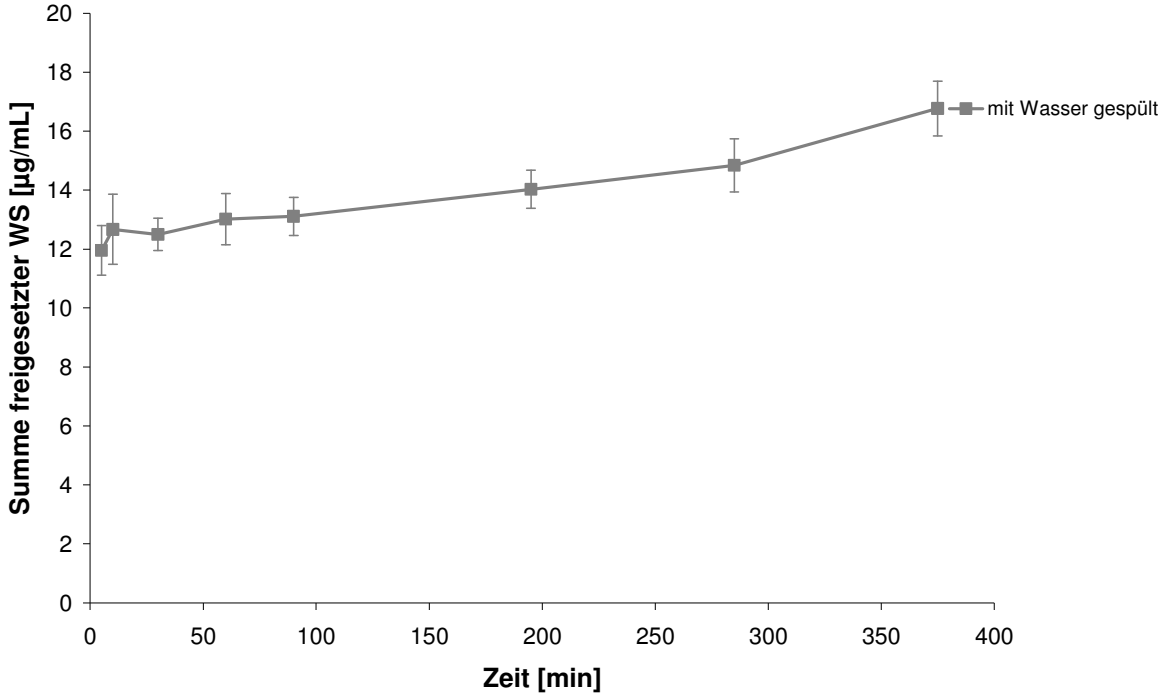


Abbildung 54: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollenen Schläuchen. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurden die Messreihen der ungespülten und der mit Dioxan gespülten Schläuche entfernt.

Bei der isolierten Betrachtung der Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Dioxan gequollenen und mit Wasser gespülten Schläuchen sieht man eine kontinuierliche Freisetzung über die gesamten 6 Stunden. Der Verlauf der Freisetzungskurve ist der Form nach zufrieden stellend. Den in Abschnitt 3.3.1.7 folgenden Ergebnissen vorgreifend sei noch angemerkt, dass auch die nach 6 Stunden insgesamt freigesetzte Wirkstoffmenge von 17 µg/mL die höchste im Vergleich der verschiedenen Quellmittel ist, sofern sie mit Wasser gespült wurden.

Allerdings quellen die Schläuche in Dioxan so stark auf, dass die Form der Schläuche auch nach dem Trocknen nicht mehr der Form vor dem Quellen entspricht. Die Materialeigenschaften werden so stark beeinträchtigt, dass es schon makroskopisch erkennbar ist. Daher ist Dioxan als Quellmittel zur Wirkstoffeinbringung nicht geeignet. In der folgenden Abbildung ist diese makroskopische Beeinträchtigung dargestellt. Der linke Schlauch wurde in Dioxan gequollen. Die Oberfläche spreizt sich zu den Schnittflächen hin auseinander, während der Vergleichsschlauch keine solche Wölbung aufweist. Bei dem Vergleichsschlauch handelt es sich um einen in Wasser gequollenen Schlauch. Beim Quellen

in Wasser ergeben sich keinerlei Formveränderungen, nicht einmal im ungetrockneten Zustand.

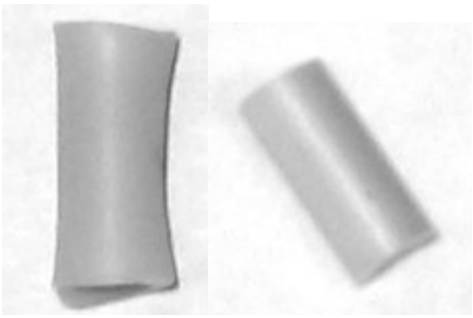


Abbildung 55: Aussehen von Schläuchen nach dem Quellen. Auf der linken Seite ist ein in Dioxan gequollenes Schlauchstück zu sehen, auf der rechten Seite zum Vergleich ein in Wasser gequollenes, welches genauso aussieht wie vor dem Quellen. Es gilt zu beachten, dass der in Dioxan gequollene Schlauch an den Enden breiter wird, während die Außenseiten des in Wasser gequollenen Schlauchstücks auch an den Enden parallel zueinander sind. Die etwas dunklere Färbung des linken Schlauchstücks kommt durch die Einbettung des Wirkstoffes zustande.

3.3.1.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Beim Quellen zeigten die Schläuche eine beim Trocknen reversible Längenzunahme von 10 mm auf 12,5 mm, also um 25%.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, ein Teil wurde mit dreimal 20 mL Ethanol gespült und ein Teil mit dreimal 20 mL Wasser.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

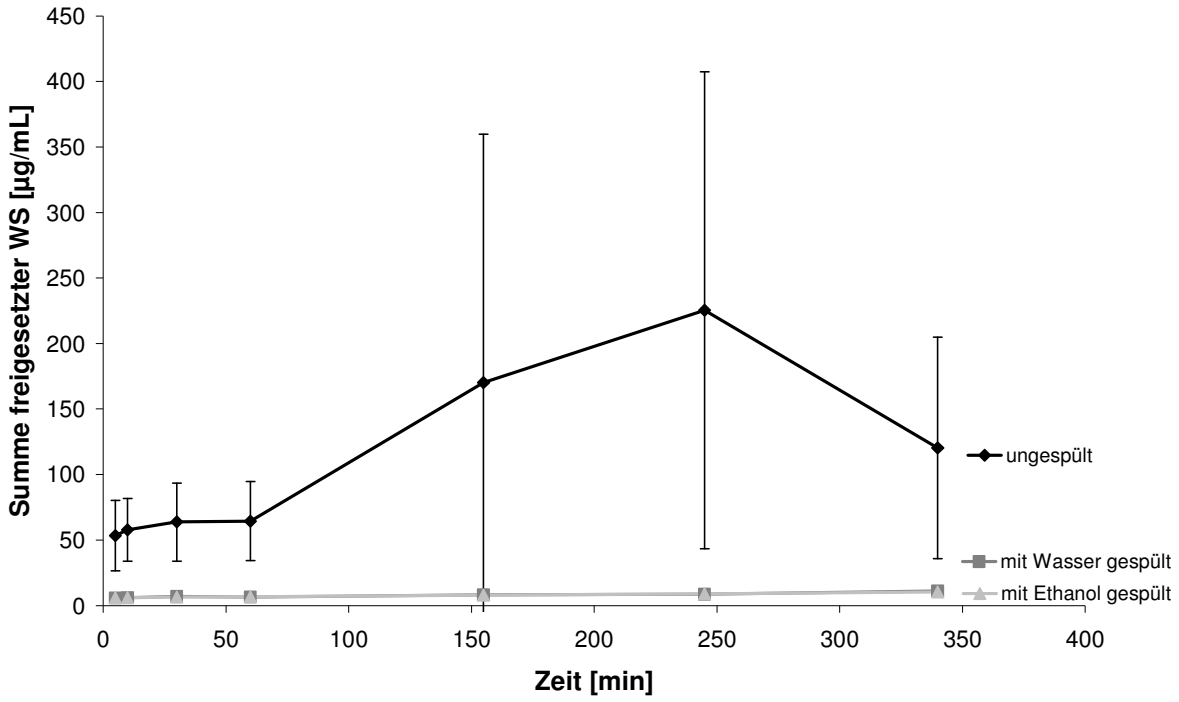


Abbildung 56: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht, mit Ethanol oder mit Wasser gespült.

Wie schon bei den in Aceton und Dioxan gequollenen Schläuchen ist auch hier zu sehen, dass die höchste Wirkstoffmenge bei den ungespülten Schläuchen gemessen wird. Nach 340 Minuten liegt sie bei 120 µg/mL. Die beiden höheren Werte bei 155 und 245 Minuten (170 bzw. 225 µg/mL) weisen sehr große Standardabweichungen auf. Daher werden diese Werte als Ausreißer betrachtet.

Da die großen Unterschiede zwischen den Freisetzungskurven eine Beurteilung des Kurvenverlaufs der Freisetzungen aus den gespülten Schläuchen unmöglich machen, wurde im folgenden Diagramm die Messreihe der ungespülten Schläuche entfernt:

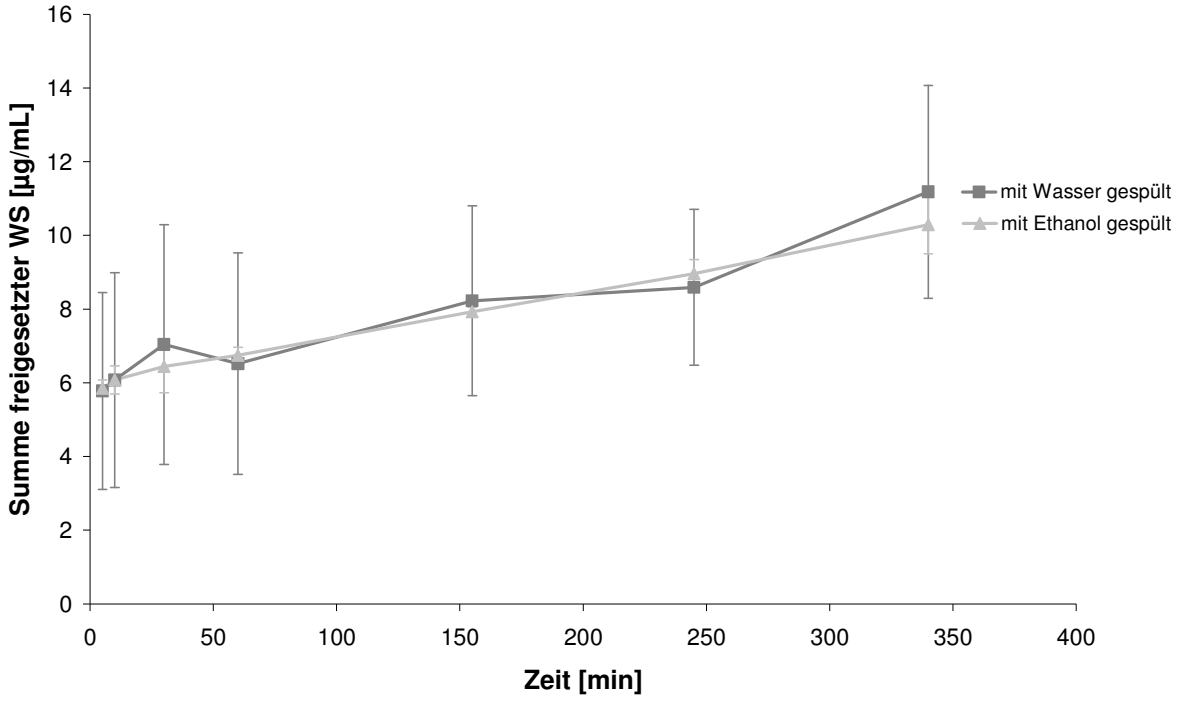


Abbildung 57: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollenen Schläuchen. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurde die Messreihe der ungespülten Schläuche entfernt.

Einerseits ist hier kein Unterschied zwischen den mit Wasser gespülten und den mit Ethanol gespülten Schläuchen zu erkennen. Das kann durch die sehr ähnliche Polarität der Lösungsmittel erklärt werden. Ethacridinlactat löst sich in Ethanol fast ebenso gut wie in Wasser.

Andererseits ist ein ausgeprägt linearer Verlauf der Freisetzungskurve zu erkennen. Die Freisetzung erfolgt also sehr gleichmäßig. Die freigesetzten Wirkstoffmengen nach 340 Minuten betragen 11 bzw. 10 µg/mL, also gut die Hälfte der Menge, die aus den in Dioxan gequollenen und mit Wasser gespülten Schläuchen freigesetzt wurde.

3.3.1.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen methanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Beim Quellen zeigten die Schläuche eine beim Trocknen reversible Längenzunahme von 10 mm auf 12,5 mm, also um 25%.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, ein Teil wurde mit dreimal 20 mL Methanol gespült und ein Teil mit dreimal 20 mL Wasser.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

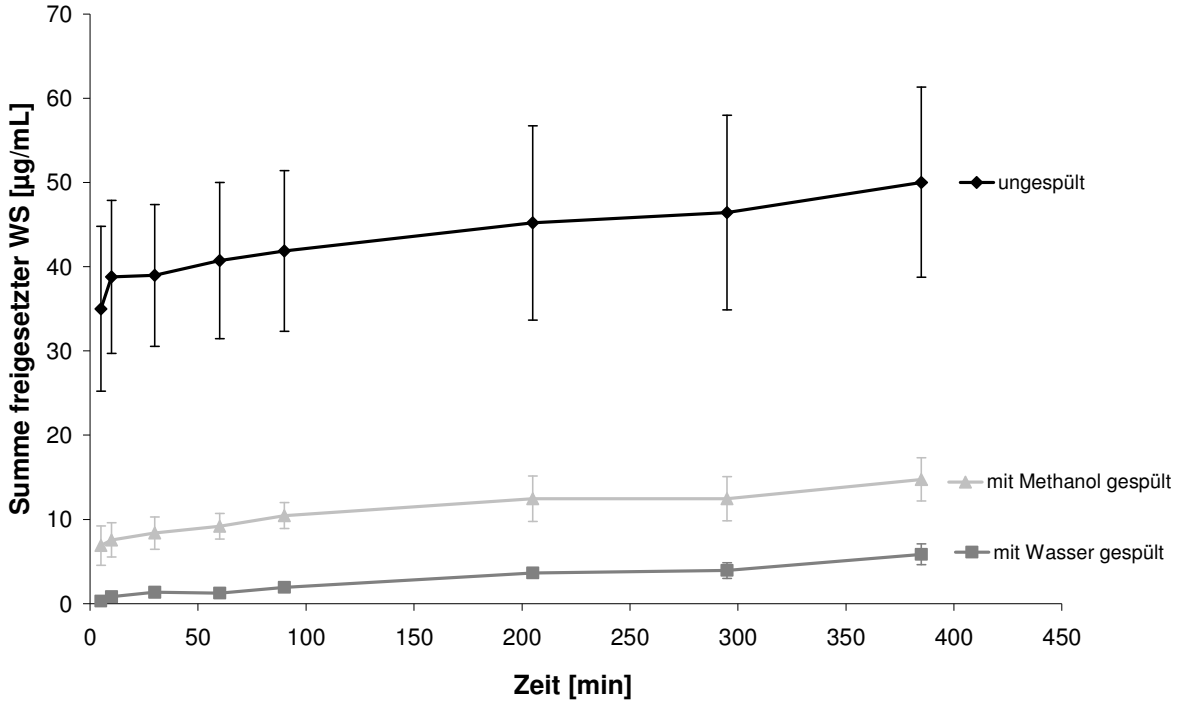


Abbildung 58: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Methanol 1% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht, mit Methanol oder mit Wasser gespült.

Ein linearer Verlauf der aller Freisetzungskurven ist schon in diesem Diagramm zu erkennen. Außerdem sind hier die Unterschiede zwischen den gespülten und den ungespülten Schläuchen nicht ganz so groß wie bei den bisher betrachteten Lösungsmitteln.

Die gemessene Wirkstoffmenge nach 385 Minuten beträgt bei den ungespülten Schläuchen 50 µg/mL. Bei den gespülten Schläuchen wurden aus den mit Methanol gespülten Schläuchen 15 µg/mL Wirkstoff freigesetzt, aus den mit Wasser gespülten nur knapp 6 µg/mL. Dieser Unterschied ist insofern überraschend, weil die Polarität von Methanol der von Wasser eigentlich noch ähnlicher ist als die von Ethanol. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich die

beiden Kurven der gespülten Schläuche wie bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen überlagern.

3.3.1.5 Freisetzung aus in Toluol gequollenen Schläuchen

Das in Toluol unlösliche Ethacridinlactat wurde durch Zugabe von konzentrierter Natronlauge zu einer wässrigen Ethacridinlactat-Lösung in die Ethacridin-Base überführt, die anschließend im Scheidetrichter in die Toluol-Phase ausgeschüttelt wurde. Die Ethacridin-Lösungen in Toluol wurden zunächst photometrisch vermessen. Nach dem Vermessen wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand ausgewogen. Hieraus konnte dann eine Kalibriergerade erstellt werden:

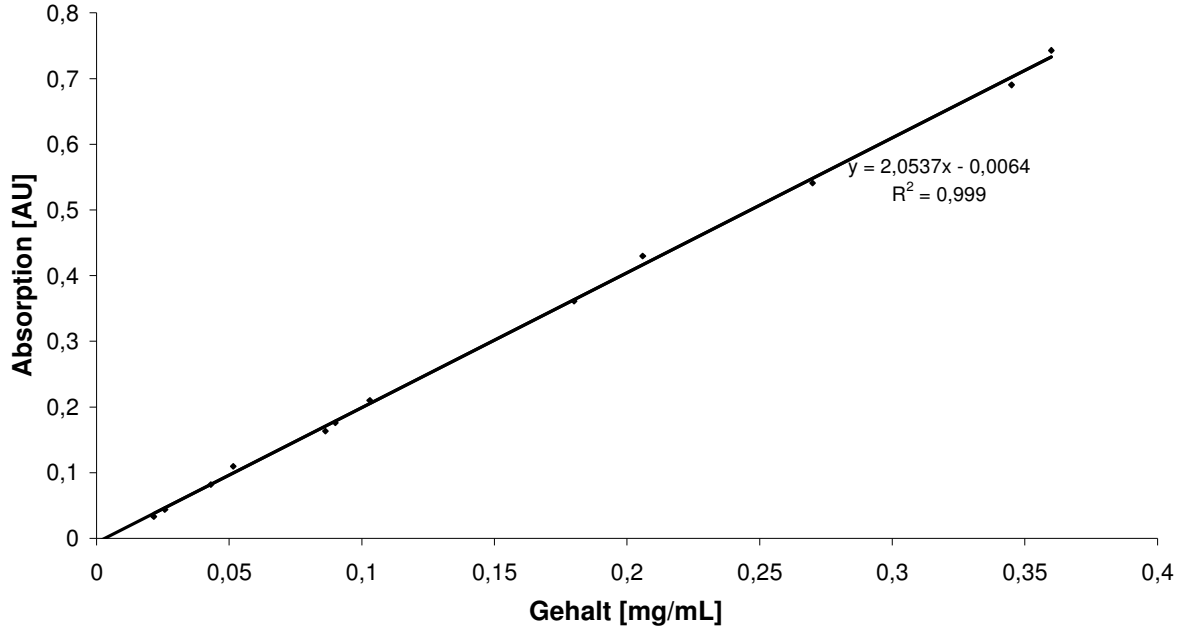


Abbildung 59: Kalibriergerade für Ethacridin-Base in Toluol. Da sich der Gehalt wegen des Ausschüttelns und Eindampfens zufällig ergibt, gibt es zu jeder Konzentration nur einen Messpunkt und demnach keine Standardabweichung.

Die letztlich zum Quellen verwendete Lösung von Ethacridin in Toluol musste dann zur Bestimmung der Konzentration nur noch photometrisch vermessen werden. Es ergab sich eine Konzentration von 0,104 mg/mL, also von etwa 0,01%. Das entspricht einem Zehntel der Ethacridinlactat-Menge, die in Dioxan gelöst wurde, oder einem Hundertstel der Menge an Ethacridinlactat in der ethanolischen, methanolischen und wässrigen Quelllösung.

In dieser Lösung wurden die Schläuche dann 3,5 Stunden gequollen.

Beim Quellen zeigten die Schläuche eine beim Trocknen reversible Längenzunahme von 10 mm auf 12,5 mm, also um 25%.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, ein Teil wurde mit dreimal 20 mL Toluol gespült und ein Teil mit dreimal 20 mL Wasser.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

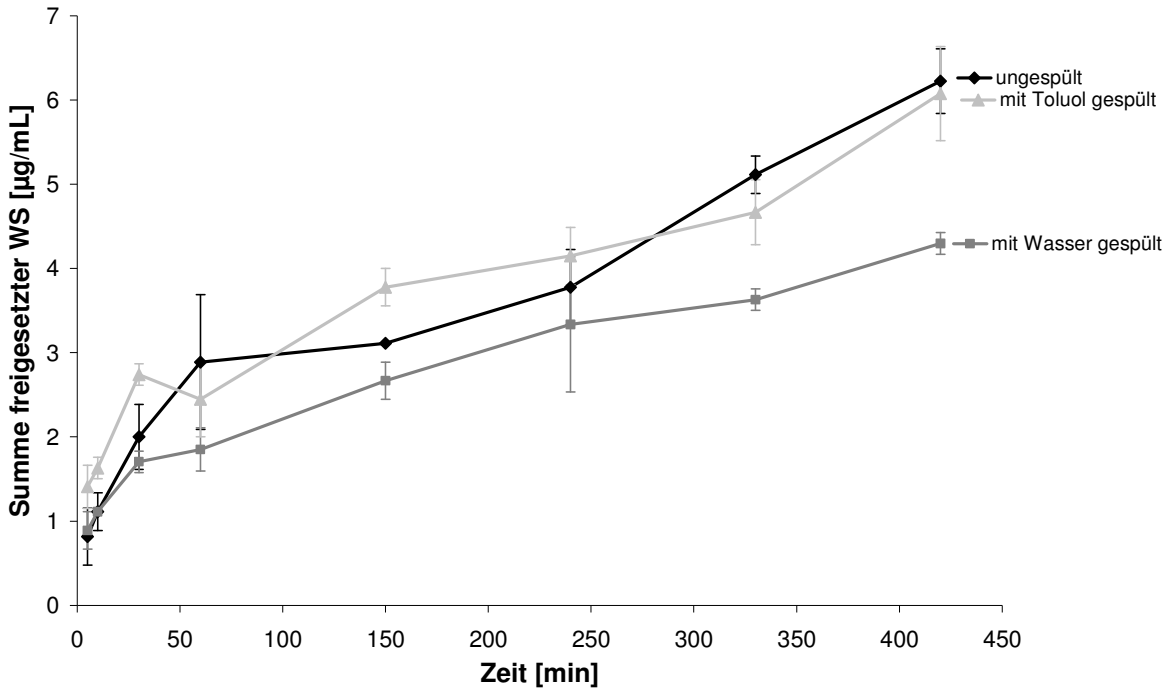


Abbildung 60: Freisetzung aus in Ethacridin/Toluol 0,01% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht, mit Toluol oder mit Wasser gespült.

Erstmals ist hier eine Überlagerung der Freisetzungskurven von ungespülten und gespülten Schläuchen zu sehen. Die mit Wasser gespülten Schläuche weisen – wie in den anderen bisher gezeigten Diagrammen – die niedrigste Freisetzung auf. Allerdings ist hier der Unterschied zu den beiden anderen Kurven nicht besonders ausgeprägt.

Ein Grund für die geringen Wirkstoffmengen auch bei den ungespülten Schläuchen könnte sein, dass die hydrophile Matrix des Schlauches durch das hydrophobe Lösungsmittel Toluol praktisch nicht benetzt wird, so dass das Schlauchmaterial kaum in Berührung mit der Wirkstofflösung kommt.

Die nach 420 Minuten freigesetzten Wirkstoffmengen bewegen sich zwischen 4 und 6 µg/mL. Die freigesetzte Wirkstoffmenge ist damit zwar recht gering, jedoch ist der Kurvenverlauf linear.

Zwei Punkte sprechen allerdings gegen die Verwendung von Toluol als Quellmittel: Einerseits ist die Herstellung der Quelllösung extrem aufwändig und wird nicht durch hohe Ausbeuten belohnt. Andererseits ist Toluol auch gesundheitsschädlich, beispielsweise kann es Nerven- und Nierenschädigungen verursachen. Da auch bei einigen der anderen Quellmittel viel versprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, sollte von einer Verwendung von Toluol als Quellmittel abgesehen werden.

3.3.1.6 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen wässrigen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Beim Quellen zeigten die Schläuche keine Längenzunahme.

Nach dem Quellen wurde ein Teil der Schläuche ungespült getrocknet, der andere Teil wurde mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

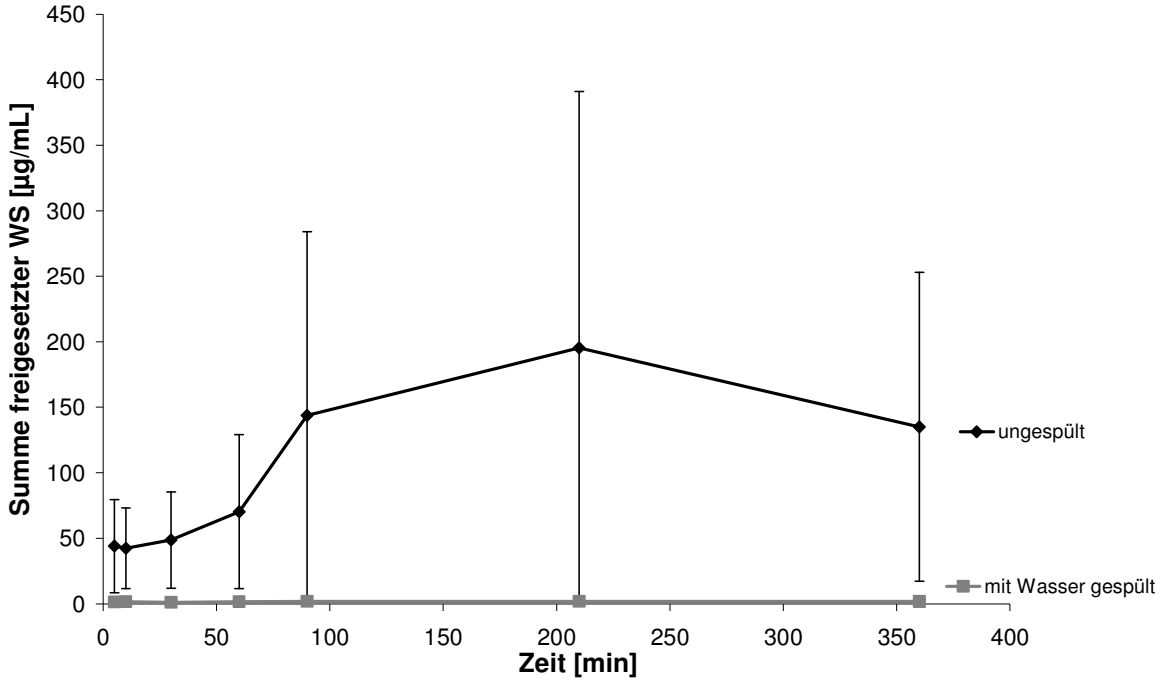


Abbildung 61: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Wasser 1% gequollenen Schläuchen. In der Nachbehandlung wurden die Schläuche gar nicht oder mit Wasser gespült.

Beim Diagramm der in Wasser gequollenen Schläuche zeigt sich wieder das gewohnte Bild: die bei den ungespülten Schläuchen gemessene Wirkstoffmenge liegt mit 135 µg/mL nach

360 Minuten sehr viel höher als die bei den gespülten Schläuchen gemessene Menge, so dass sich der Kurvenverlauf der gespülten Schläuche in dieser Graphik nicht erkennen lässt.

Aus diesem Grund erfolgt wieder eine gesonderte Darstellung der gespülten Schläuche:

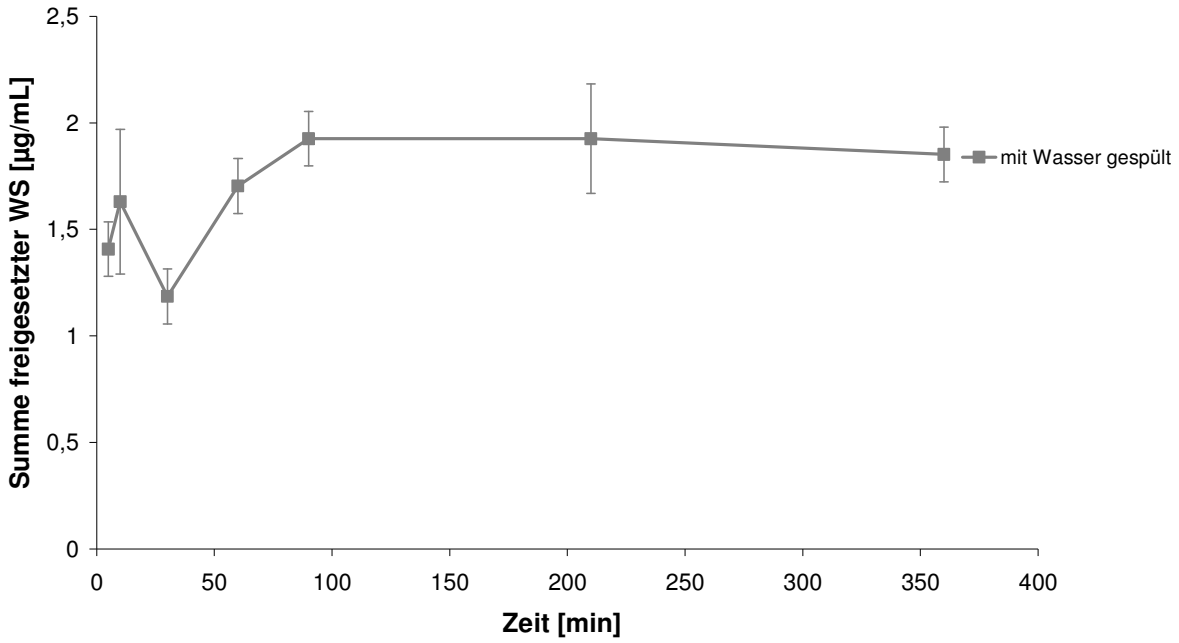


Abbildung 62: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Wasser 1% gequollenen Schläuchen. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurde die Messreihe der ungespülten Schläuche entfernt.

Wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen verläuft diese Freisetzungskurve stagnierend auf niedrigem Niveau (knapp 2 µg/mL nach sechs Stunden). Die gemessenen Absorptionswerte liegen mit 0,002 AU bis 0,007 AU alle unterhalb der Bestimmungsgrenze. Daher sind die resultierenden Konzentrationsangaben wahrscheinlich ungenau.

3.3.1.7 Vergleich der Lösungsmittel miteinander

Die folgenden Diagramme beinhalten dieselben Daten wie die letzten sechs Abschnitte. Sie wurden jedoch anders zusammengestellt, so dass die Wirkungen der verschiedenen Quellmittel besser miteinander verglichen werden können.

Am relevantesten erscheint die Darstellung der im Anschluss an das Quellen mit Wasser gespülten Schläuche, denn hier wurden die verschiedenen Schläuche zumindest in der gleichen Weise nachbehandelt.

Dennoch soll die Gegenüberstellung der verschiedenen Quellmittel aus Gründen der Vollständigkeit auch für die mit dem jeweiligen Quellmittel gespülten und die ungespülten Schläuche vorgenommen werden.

Die mit Wasser gespülten Schläuche werden jedoch an erster Stelle behandelt:

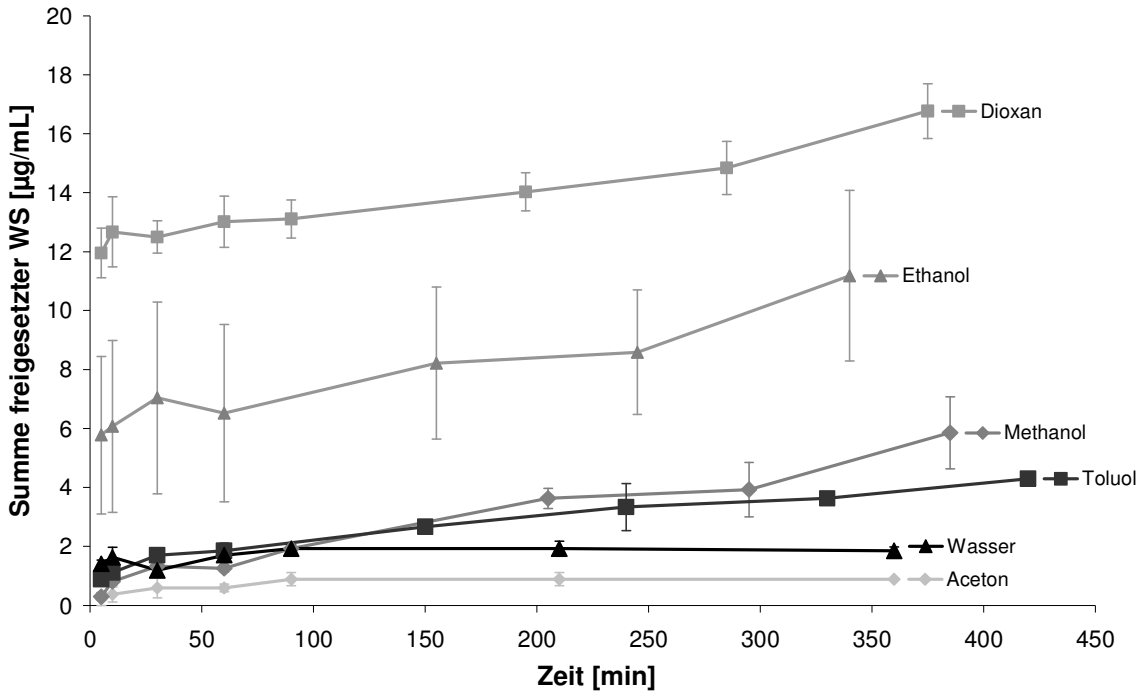


Abbildung 63: Vergleich der Freisetzungen der in den verschiedenen wirkstoffhaltigen Lösungsmittel gequollenen und mit Wasser gespülten Schläuche

Das Diagramm zeigt noch einmal anschaulich die Größenverhältnisse der Unterschiede zwischen den einzelnen Freisetzungskurven wie es durch einen gedanklichen Vergleich der in den anderen Diagrammen abgelesenen Zahlenwerte nicht möglich wäre.

Die Gleichmäßigkeit der Freisetzung erkennt man hier sehr schön bei den vier höchsten Freisetzungskurven. Es handelt sich hierbei (in dieser Reihenfolge) um die in Dioxan,

Ethanol, Methanol und um die in Toluol gequollenen Schläuche. Die Freisetzungskurven der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche stagnieren auf niedrigem Niveau.

Die Freisetzungskurven der Schläuche, die mit reinem Quellmittel gespült wurden, werden in der folgenden Abbildung einander gegenübergestellt:

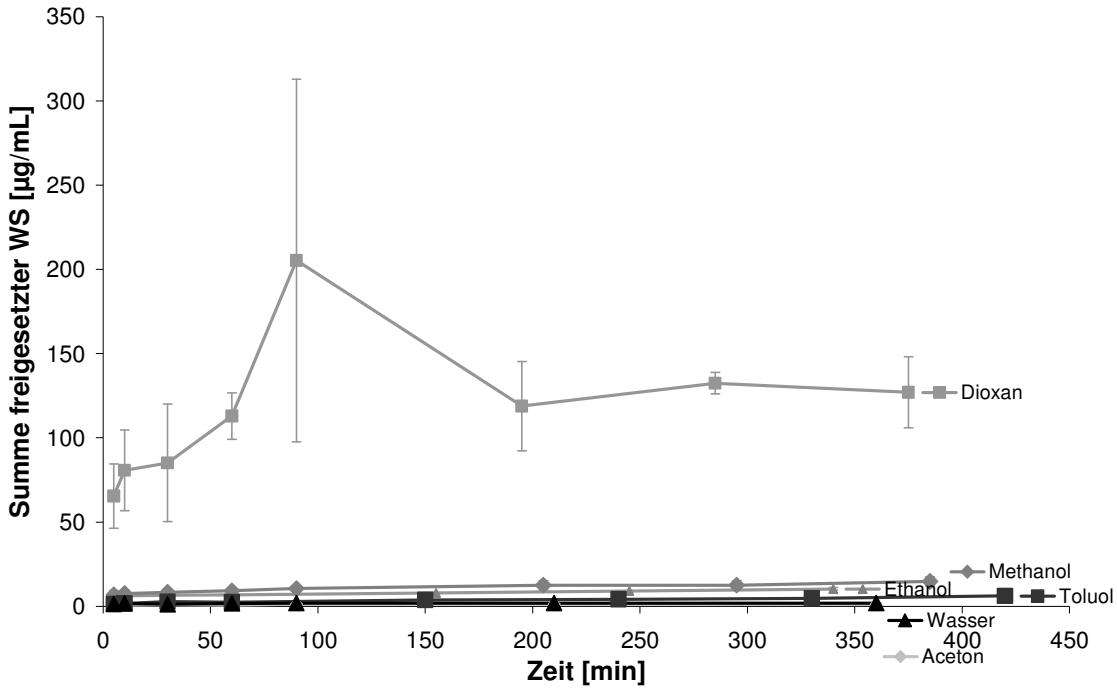


Abbildung 64: Vergleich der Freisetzungen der in den verschiedenen wirkstoffhaltigen Lösungsmittel gequollenen und mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespülten Schläuche

Bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen wurde eine deutlich höhere Wirkstoffmenge gefunden als in den anderen Schläuchen. Der Grund hierfür wurde bereits angeführt: Da Ethacridinlactat in Dioxan nicht löslich ist, kann es durch Spülen auch so gut wie nicht entfernt werden. Das Niveau der Freisetzungskurve der mit Dioxan gespülten Schläuche ist daher fast ebenso hoch wie das der ungespülten Schläuche. Aus dem genannten Grund heraus scheint es auch nicht sinnvoll, dieser hohen Wirkstoffmenge eine besondere Bedeutung beizumessen.

Um auch die Freisetzungskurven der Schläuche miteinander vergleichen zu können, die in den anderen Lösungsmitteln gequollen und gespült wurden, wurde in dem folgenden Diagramm die Messreihe der in Dioxan gequollenen Schläuche eliminiert:

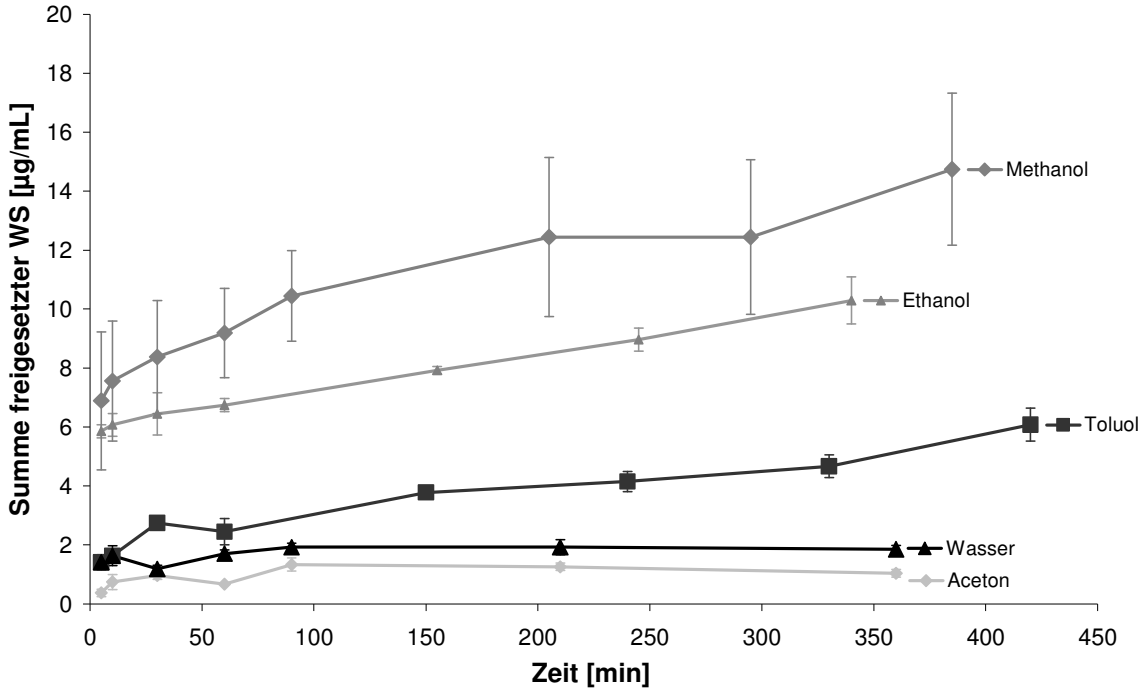


Abbildung 65: Vergleich der Freisetzungen der in den verschiedenen wirkstoffhaltigen Lösungsmittel gequollenen und mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespülten Schläuche ohne die Messreihe „Dioxan“

Die gleichmäßige Freisetzung aus den in Ethanol, Methanol, bzw. Toluol gequollenen Schläuchen ist hier noch einmal schön zu erkennen. Der meiste Wirkstoff wird aus den in Methanol gequollenen Schläuchen freigesetzt, dann folgt die Freisetzungskurve der in Ethanol gequollenen Schläuche. Die Reihenfolge im Vergleich zu den mit Wasser gespülten Schläuchen ist hier also umgedreht. Die dritthöchste (bei Einbeziehung von Dioxan die vierthöchste) Freisetzungskurve gehört zu den in Toluol gequollenen Schläuchen. Die Kurven der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche verlaufen auch hier weitestgehend parallel zur Zeitachse und auf niedrigem Niveau.

Die Gegenüberstellung der ungespülten Schläuche erfolgt in der folgenden Graphik:

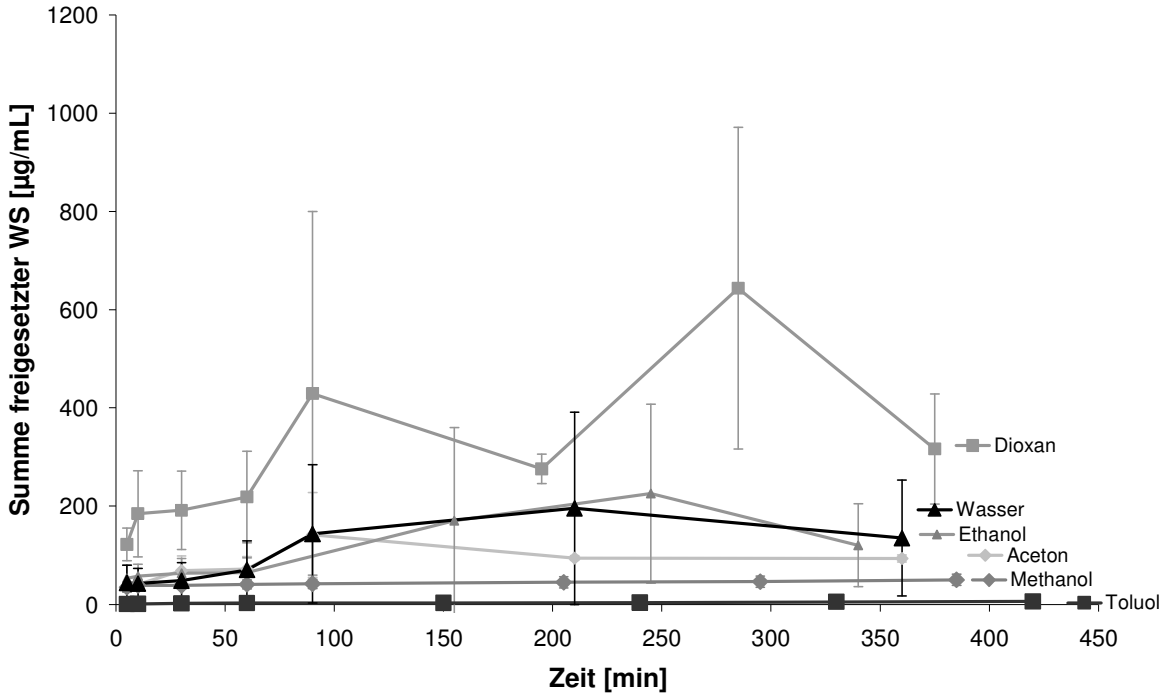


Abbildung 66: Vergleich der Freisetzungen der in den verschiedenen wirkstoffhaltigen Lösungsmittel gequollenen, ungespülten Schläuche

Aus der Gegenüberstellung der ungespülten Schläuche kann man entnehmen, dass die verschiedenen Lösungsmittel die Schlauchoberflächen offensichtlich unterschiedlich stark benetzen. Bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen wurden die höchsten Wirkstoffkonzentrationen gemessen, obwohl die Wirkstoffkonzentration in der Quelllösung mit 0,1% am zweitniedrigsten war, nach der Lösung von Ethacridin in Toluol. Bei den in Toluol gequollenen Schläuchen wurden mit Abstand die geringsten Wirkstoffkonzentrationen gemessen, was vermutlich an der schlechten Benetzung der Oberfläche durch das Lösungsmittel liegt (siehe auch Abschnitt 3.3.1.5). Die Freisetzungskurven der in den anderen Lösungsmitteln gequollenen Schläuche liegen dazwischen. Die Kurve der in Methanol gequollenen Schläuche verläuft davon am weitesten unten; die Kurven der in Aceton, Ethanol und Wasser gequollenen Schläuche überlagern sich, so dass man hier keine genaue Reihenfolge festlegen kann.

Der Grund für die hohen Wirkstoffmengen bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen liegt möglicherweise nicht nur an den Benetzungseigenschaften. Beim Quellen in Dioxan wurden die Schlauchstücke mehr als dreimal länger als im getrockneten Zustand. Die Oberfläche, auf

der sich Wirkstoffpartikel ablagern konnten, war also wesentlich größer als bei den Schläuchen, die in den anderen Lösungsmitteln gequollen wurden.

3.3.2 Einfluss des Trocknens vor dem Spülen

Eine weitere Frage, die bei der Entwicklung einer geeigneten Methode zur Wirkstoffeinbringung durch Quellen des Schlauchmaterials zu klären war, war die, ob die Schläuche vor dem Spülvorgang getrocknet werden sollten. Das aufgequollene Polyurethan zieht sieht sich beim Trocknen wieder zusammen, wie man an den reversiblen Längenzunahmen beim Quellen erkennen kann. Es ist denkbar, dass der Wirkstoff hierdurch besser eingeschlossen werden kann, und somit mehr Wirkstoff in den Schlauch einzubringen ist. Wenn das der Fall sein sollte, wäre es sinnvoll, den Trocknungsschritt in das Verfahren einzubeziehen. Sollte sich die Vermutung jedoch als falsch erweisen, so kann man sich den zusätzlichen Zeitaufwand des Trocknens ersparen.

3.3.2.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer Mischung von 5 mL einprozentiger wässriger Ethacridinlactat-Lösung und 5 mL Aceton gequollen. Es resultiert also eine Ethacridinlactat-Konzentration von 0,5%.

Nach dem Quellen wurde die Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, ein Viertel der Schläuche wurde mit dreimal 20 mL Aceton gespült und ein Viertel mit dreimal 20 mL Wasser. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Aceton bzw. mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

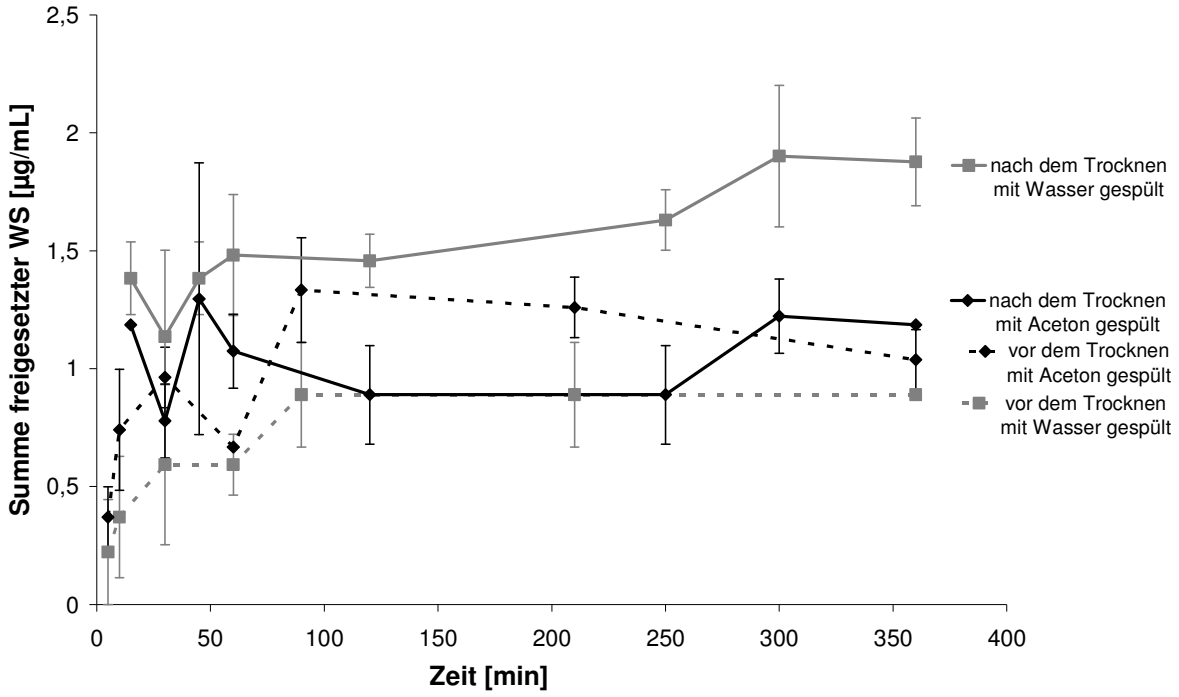


Abbildung 67: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridinlactat/Aceton gequollenen Schläuchen

Die Freisetzungskurve der erst nach dem Trocknen mit Wasser gespülten Schläuche (durchgezogene graue Linie) erweist sich als diejenige auf dem höchsten Niveau. Entscheidend ist vor allem, dass sie sich oberhalb der Freisetzungskurve befindet, die zu den Schläuchen gehört, die sofort mit Wasser gespült wurden (gestrichelte graue Linie). Der Abstand zwischen den beiden Kurven beträgt zwar nur etwa 1 µg/mL, jedoch überschneiden sich die Fehlerbalken (Standardabweichungen) nicht, so dass man hier einen signifikanten Unterschied vermuten kann. Eine statistische Absicherung durch einen Student'schen t-Test gestaltet sich dieser Stelle schwierig, da viele der Messzeitpunkte unterschiedlich sind. Für die drei Messpunkte, für die es möglich ist, wurde der t-Test durchgeführt (siehe untenstehende Tabelle 4).

Bei den mit Aceton gespülten Schläuchen zeigt sich kein so deutlicher Unterschied zwischen den sofort und den später gespülten Schläuchen. Die beiden schwarzen Linien schneiden sich mehrfach, so dass hier eine eindeutige Entscheidung nicht möglich ist.

Tabelle 4: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche für die Spülmittel Wasser bzw. Aceton. „n.s.“ steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*“ steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser	Aceton
30	0,133 n.s.	0,306 n.s.
60	0,013 *	0,170 n.s.
360	0,001 *	0,272 n.s.

Der t-Test zeigt für den ersten Messpunkt bei 30 Minuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messreihenpaaren auf. Bei den Messpunkten 60 und 360 Minuten zeigen sich bei den mit Wasser gespülten Schläuchen signifikante Unterschiede.

Bei 30 Minuten haben die Kurven der beiden Klassen von mit Wasser gespülten Schläuchen den geringsten Abstand zueinander und die Standardabweichungen sind an dieser Stelle besonders groß. Da an den anderen Stellen der Abstand der Kurven größer ist und die Standardabweichungen geringer sind, ist zu vermuten, dass sich an anderen Messpunkten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Messreihen ergeben würden.

Bei den mit Aceton gespülten Schläuchen werden durch den t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden angezeigt. Die mehrmaligen Überschneidungen der beiden Kurven legen nahe, dass auch bei Einbeziehung der anderen Messpunkte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen feststellbar wäre.

Daraus lässt sich letztlich die Beobachtung ableiten, dass zumindest bei den mit Wasser gespülten Schläuchen die eingelagerte Wirkstoffmenge durch das Trocknen erhöht werden konnte.

3.3.2.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 1 Stunde in einer Mischung von 1 mL einprozentiger wässriger Ethacridinlactat-Lösung und 9 mL Dioxan gequollen. Es resultiert also eine Ethacridinlactat-Konzentration von 0,1%.

Nach dem Quellen wurde die Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, ein Viertel der Schläuche wurde mit dreimal 20 mL Dioxan gespült und ein Viertel mit dreimal 20 mL Wasser. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Dioxan bzw. mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

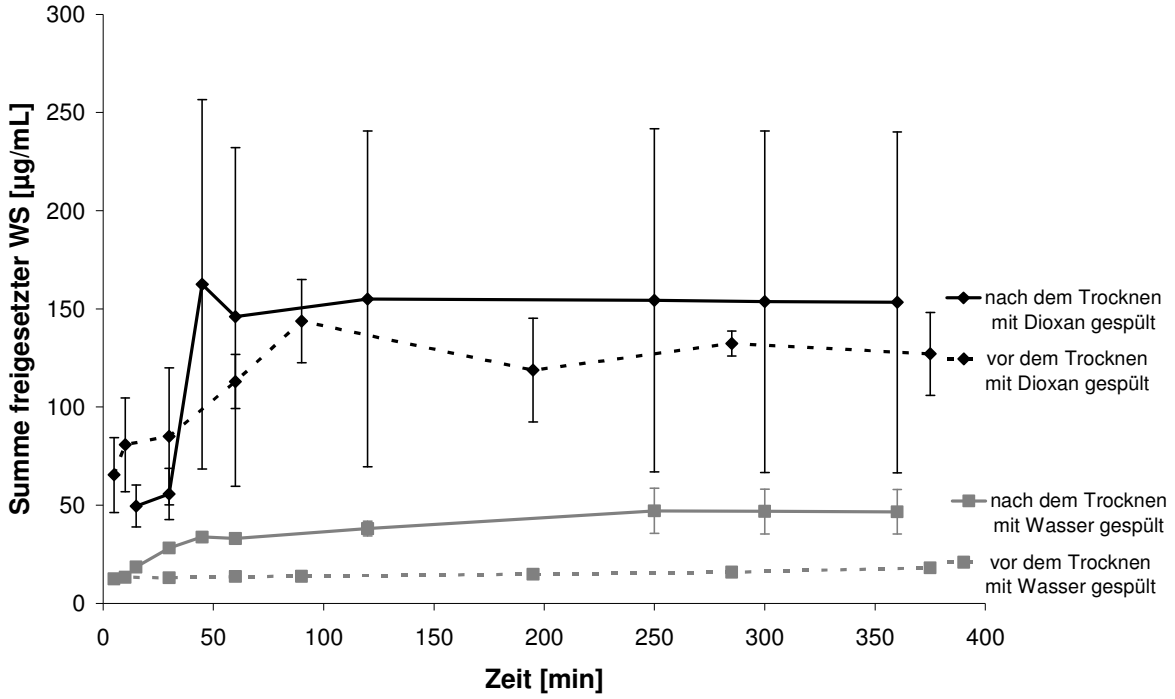


Abbildung 68: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridinlactat/Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Schläuche, die vor dem Spülen mit Wasser getrocknet wurden (durchgezogene graue Linie), zeigen eine höhere Freisetzung als die Schläuche, die sofort mit Wasser gespült wurden (gestrichelte graue Linie). Die geringen Standardabweichungen lassen vermuten, dass der Unterschied signifikant ist. Eine Absicherung mittels t-Test gestaltet sich auch hier schwierig, da die meisten Messzeitpunkte der beiden Messreihen nicht übereinstimmen. Für die beiden Messpunkte, für die es möglich ist, wurde der Test jedoch durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Beim Vergleich der mit Dioxan gespülten Schläuche ist eine eindeutige Aussage nicht möglich. Zwar liegt die Freisetzungskurve der Schläuche, die vor dem Spülen getrocknet wurden (durchgezogene schwarze Linie) oberhalb der der sofort mit Dioxan gespülten Schläuche (gestrichelte schwarze Linie), doch sind die Standardabweichungen insbesondere bei den getrockneten Schläuchen so hoch, dass es zu einer Überlagerung der Fehlerbalken mit der jeweils anderen Freisetzungskurve kommt. Damit ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen nicht feststellbar, was für die beiden Messpunkte, für die das möglich ist, durch den t-Test bestätigt werden soll:

Tabelle 5: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche für die Spülmittel Wasser bzw. Dioxan. „n.s." steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*" steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser	Dioxan
30	0,007 *	0,280 n.s.
60	0,001 *	0,578 n.s.

Der t-Test bestätigt die oben beschriebenen visuellen Eindrücke. Bei den mit Wasser gespülten Schläuchen besteht zwischen den sofort und erst nach dem Trocknen gespülten Schläuchen zumindest bei den beiden betrachteten Messpunkten ein signifikanter Unterschied. (Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 0,7% bzw. 0,1%.) Bei den mit Dioxan gespülten Schläuchen bestätigt sich der Eindruck der Nichtsignifikanz recht deutlich: die Ergebnisse des t-Tests liegen hier weit über dem geforderten Wert von 0,05.

3.3.2.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Nach dem Quellen wurde die Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, ein Viertel der Schläuche wurde mit dreimal 20 mL Ethanol gespült und ein Viertel mit dreimal 20 mL Wasser. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Ethanol bzw. mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

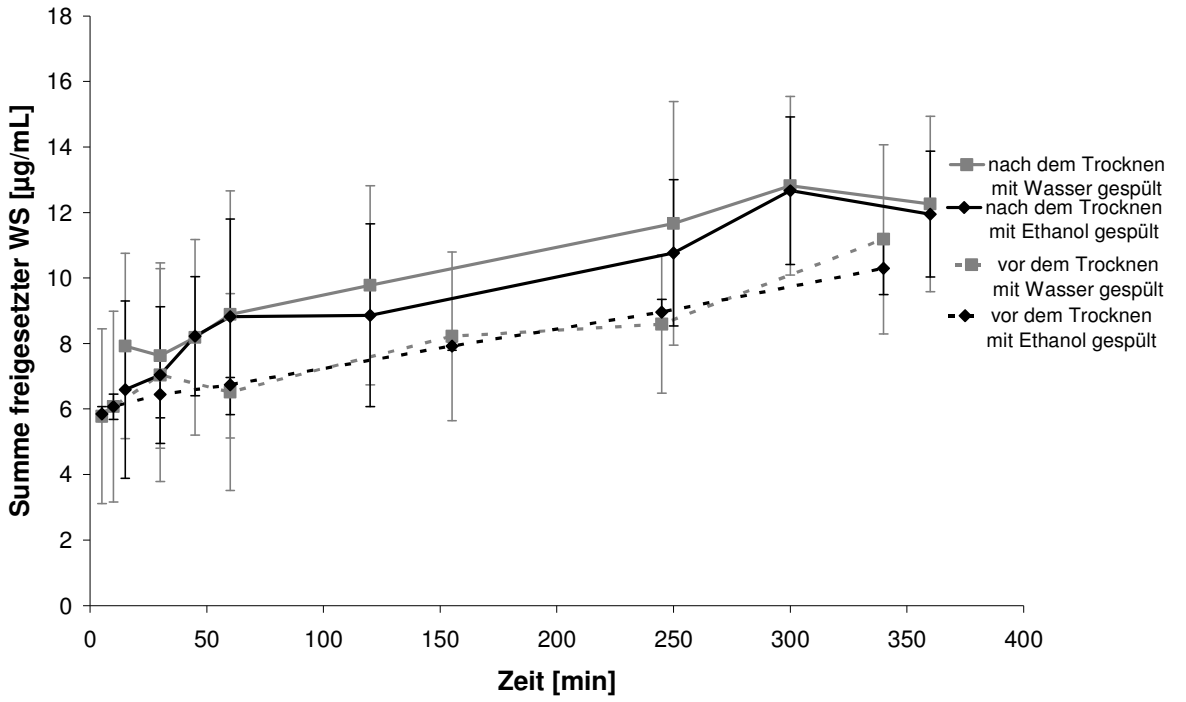


Abbildung 69: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen

Betrachtet man nur die Mittelwerte, so verlaufen die beiden Freisetzungskurven, die zu den vor dem Spülen getrockneten Schläuchen gehören (durchgezogene Linien), oberhalb der Freisetzungskurven der sofort gespülten Schläuche (gestrichelte Linien).

Unter Einbeziehung der Standardabweichungen muss man jedoch bei allen Kurven Überschneidungen anerkennen, so dass hier eine eindeutige Überlegenheit des Trocknens rein visuell nicht festgestellt werden kann.

Tabelle 6: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche für die Spülmittel Wasser bzw. Ethanol. „n.s.“ steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*“ steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser	Ethanol
30	0,402 n.s.	0,679 n.s.
60	0,261 n.s.	0,352 n.s.

Der t-Test kann nur für zwei Messpunkte durchgeführt werden, da sich alle anderen Messzeitpunkte zwischen den zu vergleichenden Messreihen unterscheiden. Entsprechend dem visuellen Eindruck ist kein eindeutiger Unterschied zu erkennen.

3.3.2.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen methanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Nach dem Quellen wurde die Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, ein Viertel der Schläuche wurde mit dreimal 20 mL Methanol gespült und ein Viertel mit dreimal 20 mL Wasser. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Methanol bzw. mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

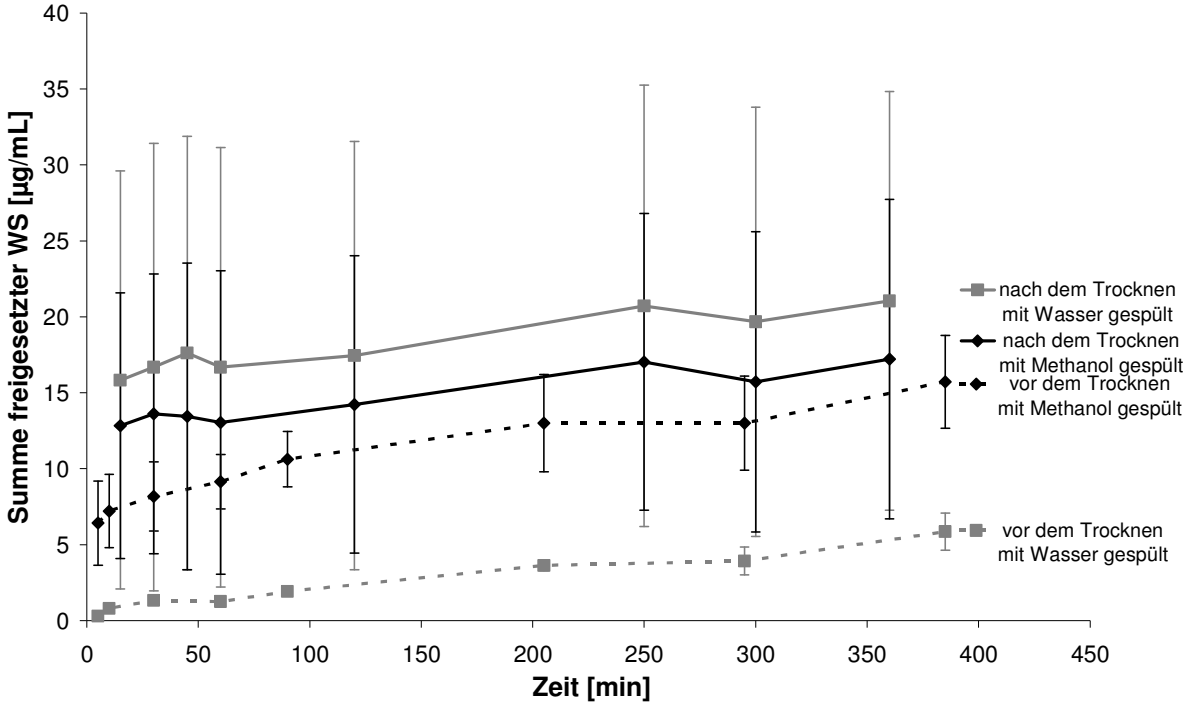


Abbildung 70: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridinlactat/Methanol gequollenen Schläuchen

Ein deutlicher Unterschied ist bei den mit Wasser gespülten Schläuchen (graue Linien) zu sehen. Die Freisetzung aus den getrockneten Schläuchen (durchgezogene Linie) ist deutlich höher als aus den Schläuchen, die sofort gespült wurden (gestrichelte Linie).

Auch bei mit Methanol gespülten Schläuchen liegt die Freisetzung der getrockneten Schläuche (durchgezogene Linie) im Mittel höher als bei den sofort gespülten Schläuchen (gestrichelte Linie). Allerdings kommt es hier wieder zu leichten Überschneidungen der Fehlerbalken der Messreihe der sofort gespülten Schläuche mit der Messreihe der getrockneten Schläuche. Die Überschneidungen sind nicht so ausgeprägt wie bei den

bisherigen Diagrammen, doch der Unterschied zwischen den beiden Messreihen muss wegen der Überschneidungen als uneindeutig eingestuft werden.

Tabelle 7: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche für die Spülmittel Wasser bzw. Methanol. „n.s." steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*" steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser	Methanol
30	0,011 *	0,033 *
60	0,005 *	0,042 *

Der t-Test zeigt signifikante Unterschiede zwischen allen untersuchten Messpunkten auf, auch beim Vergleich der mit Methanol gespülten Schläuche. Beim Vergleich der mit Wasser gespülten Schläuche wird erwartungsgemäß eine deutliche Signifikanz mit einer geringen Fehlerwahrscheinlichkeit (1,1% bzw. 0,5%) gefunden.

3.3.2.5 Freisetzung aus in Toluol gequollenen Schläuchen

Das in Toluol unlösliche Ethacridinlactat wurde durch Zugabe von Natronlauge in die Ethacridin-Base überführt, die anschließend im Scheidetrichter in die Toluol-Phase ausgeschüttelt wurde. Die Ethacridin-Lösungen in Toluol wurden zunächst photometrisch vermessen. Nach dem Vermessen wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand ausgewogen. Hieraus konnte dann eine Kalibriergerade erstellt werden (siehe Abbildung 59 in Abschnitt 3.3.1.5). Mit Hilfe dieser Kalibriergerade wurde als Konzentration der Quelllösung ein Gehalt von 0,01% ermittelt.

In dieser Lösung wurden die Schläuche dann 3,5 Stunden gequollen.

Nach dem Quellen wurde die Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, ein Viertel der Schläuche wurde mit dreimal 20 mL Toluol gespült und ein Viertel mit dreimal 20 mL Wasser. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Toluol bzw. mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

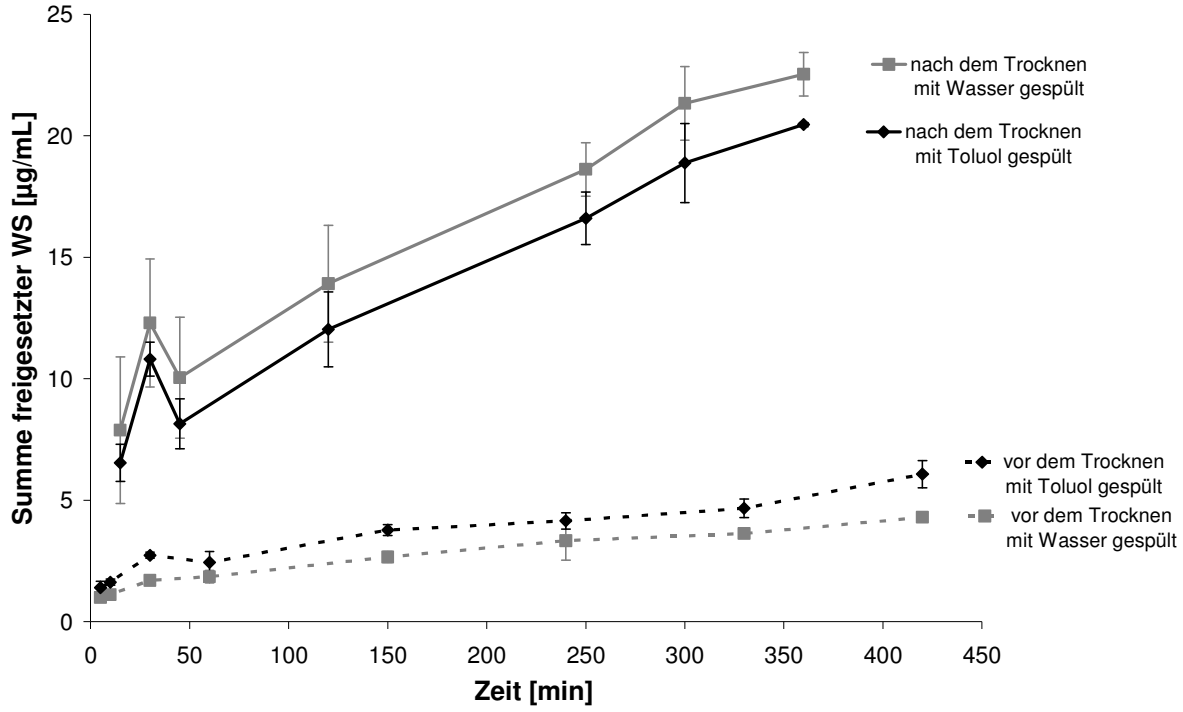


Abbildung 71: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridin/Toluol gequollenen Schläuchen

Bei den in Toluol gequollenen Schläuchen fällt der Unterschied zwischen getrockneten und sofort gespülten Schläuchen besonders deutlich aus. Sowohl die nach dem Trocknen mit

Wasser gespülten Schläuche (durchgezogene graue Linie) als auch die nach dem Trocknen mit Toluol gespülten Schläuche (durchgezogene schwarze Linie) zeigen eine deutlich höhere Freisetzung als die mit dem jeweiligen Lösungsmittel sofort gespülten Schläuche (gestrichelte Linien), und zwar auch bei Beachtung der Fehlerbalken. Anscheinend kann der Wirkstoff überhaupt nur durch das zwischenzeitliche Trocknen in die Polymermatrix der Schläuche eingebracht werden.

Tabelle 8: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche für die Spülmittel Wasser bzw. Toluol. „n.s." steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*" steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser	Toluol
30	0,020 *	0,002 *

Bei diesen Messreihen gab es leider nur einen einzigen Messzeitpunkt, der in allen Messreihen vorhanden war und somit für einen t-Test herangezogen werden konnte. Dieser Test fällt allerdings erwartungsgemäß sehr deutlich aus. Sowohl bei den mit Wasser als auch bei den mit Toluol gespülten Schläuchen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den sofort und den später gespülten Schläuchen.

3.3.2.6 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen

Die Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen wässrigen Ethacridinlactat-Lösung gequollen.

Nach dem Quellen wurde die eine Hälfte der Schläuche zunächst ungespült getrocknet, die andere Hälfte wurde mit dreimal 20 mL Wasser gespült. Nach dem Trocknen wurden dann auch die bislang ungespülten Schläuche mit dreimal 20 mL Wasser gespült.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

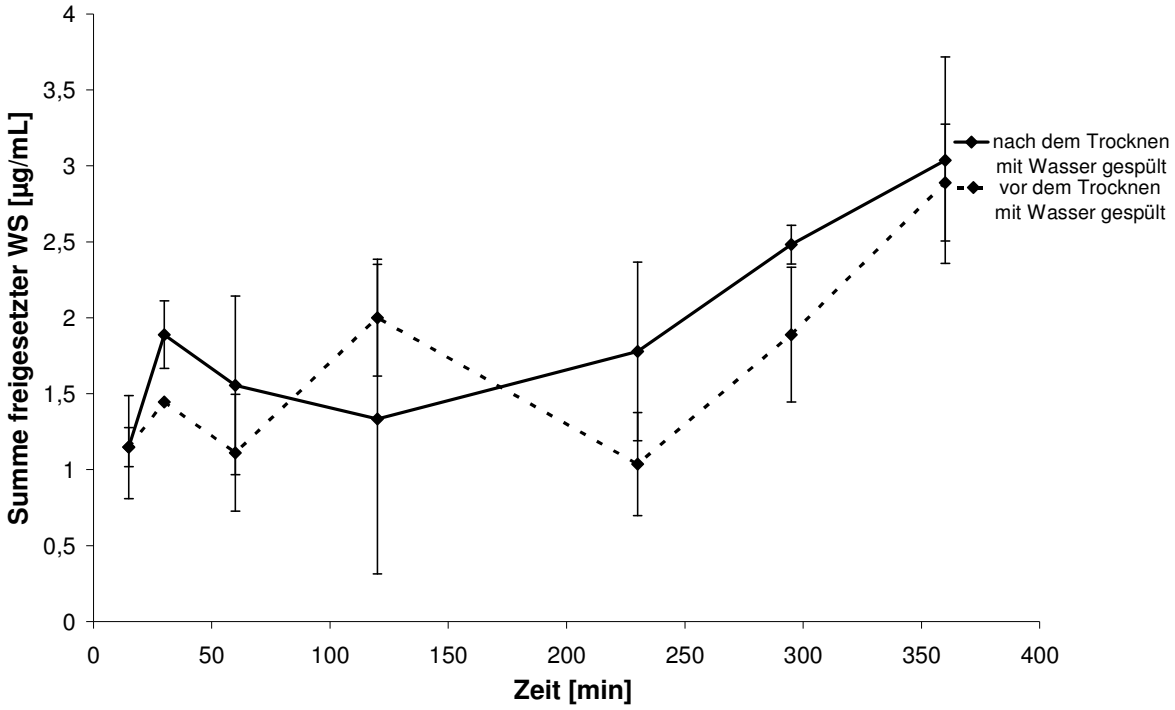


Abbildung 72: Einfluss des Trocknens vor dem Spülen bei in Ethacridinlactat/Wasser gequollenen Schläuchen

Die beiden Freisetzungskurven verlaufen praktisch auf demselben Niveau und schneiden sich mehrmals. Es sind visuell keine Unterschiede zwischen den beiden Messreihen zu erkennen. Der t-Test bestätigt dies:

Tabelle 9: t-Test für die Messreihen-Paare der sofort gespülten bzw. erst nach dem Trocknen gespülten Schläuche. „n.s.“ steht für nicht signifikant bei p-Werten die größer sind als 0,05, „*“ steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Zeit [min]	Wasser
15	1,000 n.s.
30	0,074 n.s.
60	0,344 n.s.
120	0,379 n.s.
230	0,149 n.s.
295	0,138 n.s.
360	0,763 n.s.

Dieser Freisetzungsversuch mit den in Wasser gequollenen Schläuchen ist ein Wiederholungsversuch. Bei der ersten Durchführung zeigte sich, dass bei zwei der drei Proben der getrockneten Schläuche nach dem Spülen noch Wirkstoffrückstände vorhanden waren, die viel zu hohe Freisetzungswerte verursachten. Da man keine statistischen Untersuchungen durchführen kann, wenn man von drei Messreihen zwei eliminiert, wurde der Versuch wiederholt. Bei der Wiederholung stimmen nun alle Messzeitpunkte miteinander überein, so dass der t-Test in diesem Fall für die kompletten Messreihen durchgeführt werden konnte.

Bei keinem der Messpunkte konnte eine signifikante Abweichung gezeigt werden, auch wenn die Nichtsignifikanz bei einigen Messpunkten nicht so deutlich ausfällt (30 Minuten, 295 Minuten und 230 Minuten). Andererseits ergibt sich bei 15 Minuten der Maximalwert von 1,000, der besagt, dass ein Unterschied sicher auszuschließen ist.

Daraus, dass sich zwischen den beiden Messreihen keine Unterschiede ergeben, kann man schließen, dass die Schläuche aus einer wässrigen Lösung keinen Wirkstoff aufnehmen können, ob man die Schläuche nach dem Quellen trocknen lässt oder nicht. Das wiederum muss bedeuten, dass die Schläuche durch eine Behandlung mit Wasser fast überhaupt nicht aufquellen, was sich mit der Beobachtung aus Abschnitt 3.3.1.6 deckt, dass die Schläuche bei der Inkubation in der wässrigen Lösung keine Längenzunahme zeigen.

3.3.2.7 Zusammenfassung

Bei den in Aceton gequollenen Schläuchen scheint sich beim Spülen mit Wasser ein Unterschied zwischen den getrockneten und sofort gespülten Schläuchen zu ergeben. Bei den mit Aceton gespülten Schläuchen war kein Unterschied zu erkennen.

Das gleiche Bild ergab sich bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen. Bei den mit Wasser gespülten Schläuchen konnte ein Unterschied zwischen den getrockneten und den sofort gespülten Schläuchen nachgewiesen werden, bei den mit Dioxan gespülten Schläuchen nicht.

Bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen konnte weder bei den Schläuchen, die mit Wasser gespült wurden, noch bei denen, die mit Ethanol gespült wurden, ein Unterschied zwischen den sofort und später gespülten Schläuchen nachgewiesen werden.

Bei den in Methanol gequollenen Schläuchen wurden sowohl beim Vergleich der mit Wasser als auch der mit Methanol gespülten Proben signifikante Unterschiede gefunden.

Bei den in Toluol gequollenen Schläuchen ist der Vorteil des Trocknens ebenfalls sehr deutlich, während er bei den in Wasser gequollenen Schläuchen nicht nachzuweisen ist.

Da das Trocknen zwar nicht in allen aber doch in einigen Fällen Vorteile brachte und niemals einen Nachteil (abgesehen von dem Zeitaufwand), werden die Schläuche bei den zukünftigen Versuchen vor dem Spülen getrocknet.

3.3.3 Vergleich der Plasmabeschichtungen

3.3.3.1 Freisetzung aus in Aceton gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer Mischung aus einem Teil Aceton und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen. Die für die Quelllösung resultierende Ethacridinlactat-Konzentration betrug also 0,5%.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

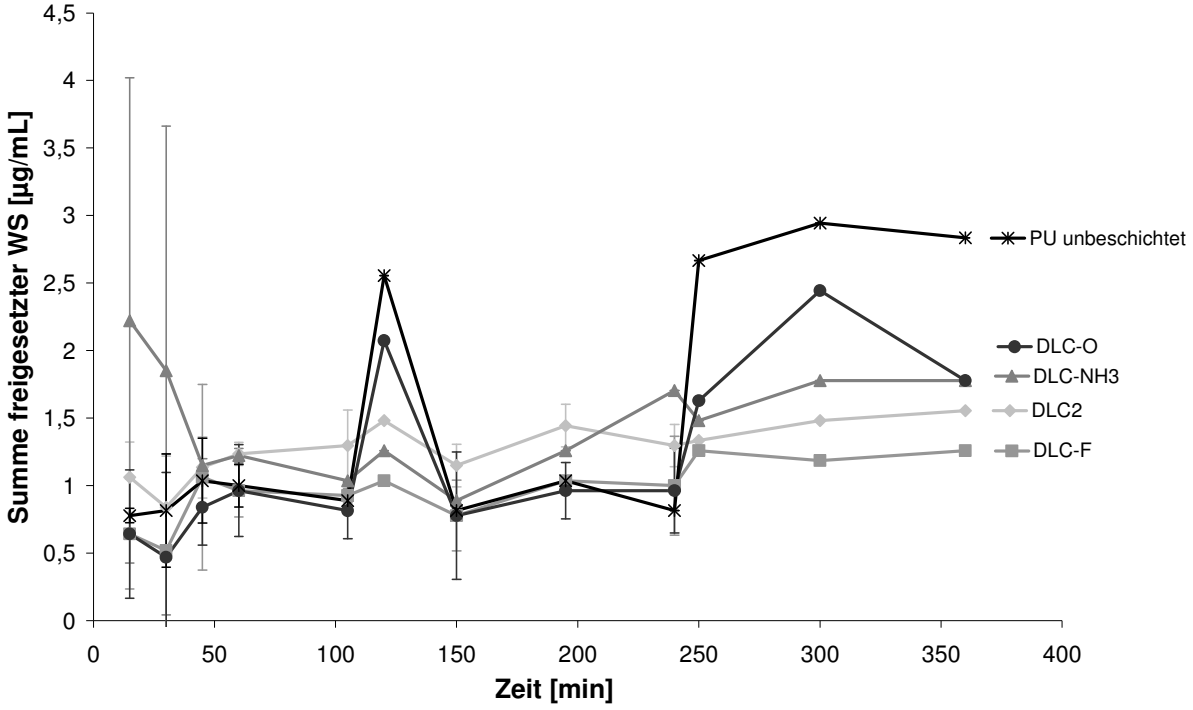


Abbildung 73: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Aceton-Lösung 0,5% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Es wurden insgesamt drei Proben an zwei verschiedenen Tagen vermessen. Da die Messzeitpunkte sich wieder teilweise unterschieden, gibt es bei einigen Messpunkten nur einen einzigen Messwert, was sich im Fehlen des Fehlerbalkens äußert (120 Minuten, 250 Minuten, 300 Minuten und 360 Minuten).

Dieser Umstand führt einerseits zu dem etwas unregelmäßigen Kurvenverlauf (Zacke bei 120 Minuten bei den Messreihen „PU unbeschichtet“ und „DLC-O“, Anstieg der

Freisetzungskurve „PU unbeschichtet“ bei den letzten drei Messzeitpunkten), andererseits kann für diese Messzeitpunkte natürlich auch kein t-Test durchgeführt werden, da man hierfür mindestens zwei Messwerte pro Messreihe oder Messpunkt braucht.

Die fünf Freisetzungskurven schneiden sich alle mehrfach. Die höchste Freisetzung gegen Ende zeigen die unbeschichteten Schläuche. Allerdings ist dieser Umstand – wie bereits erwähnt – darauf zurückzuführen, dass bei eben diesen drei letzten Messpunkten jeweils nur ein einziger Messwert zugrunde liegt, bei dem gerade eine höhere Freisetzung gemessen wurde. Deshalb sollte dieser Verlauf auch nicht überbewertet werden. Insgesamt scheinen sich die Beschichtungen hinsichtlich ihrer Freisetzungseigenschaften nicht wesentlich voneinander zu unterscheiden. Auch ein Unterschied zu den unbeschichteten Schläuchen ist nicht wahrscheinlich.

Um diesen Eindruck statistisch zu untermauern, wurde ein t-Test für alle Kombinationen der Beschichtungen für jeden Messzeitpunkt durchgeführt, für den es möglich war.

Tabelle 10: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
15	0,220 n.s.	0,379 n.s.	0,270 n.s.	0,194 n.s.	0,264 n.s.	1,000 n.s.	0,624 n.s.	0,264 n.s.	0,298 n.s.	0,671 n.s.
30	0,541 n.s.	0,436 n.s.	0,442 n.s.	0,952 n.s.	0,332 n.s.	0,933 n.s.	0,601 n.s.	0,316 n.s.	0,429 n.s.	0,516 n.s.
45	0,873 n.s.	0,935 n.s.	0,231 n.s.	0,744 n.s.	0,848 n.s.	0,645 n.s.	0,960 n.s.	0,192 n.s.	0,705 n.s.	0,545 n.s.
60	0,124 n.s.	0,854 n.s.	0,298 n.s.	0,244 n.s.	0,140 n.s.	1,000 n.s.	0,832 n.s.	0,316 n.s.	0,273 n.s.	0,880 n.s.
105	0,286 n.s.		0,186 n.s.			0,588 n.s.				
150	0,255 n.s.		0,457 n.s.			1,000 n.s.				
195	0,170 n.s.		0,131 n.s.			0,705 n.s.				
240	0,445 n.s.		0,350 n.s.			0,924 n.s.				

Für keine der Kombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungen festgestellt werden. Die Nichtsignifikanz fiel teilweise sehr deutlich aus ($p = 1{,}000$ beim Vergleich von DLC-F und DLC-O bei 15 und 150 Minuten).

Es sind also auch mit dem t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beschichtungen feststellbar.

3.3.3.2 Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für eine Stunde in einer Mischung aus neun Teilen Dioxan und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen. Die Ethacridinlactat-Konzentration der Quelllösung betrug also 0,1%.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

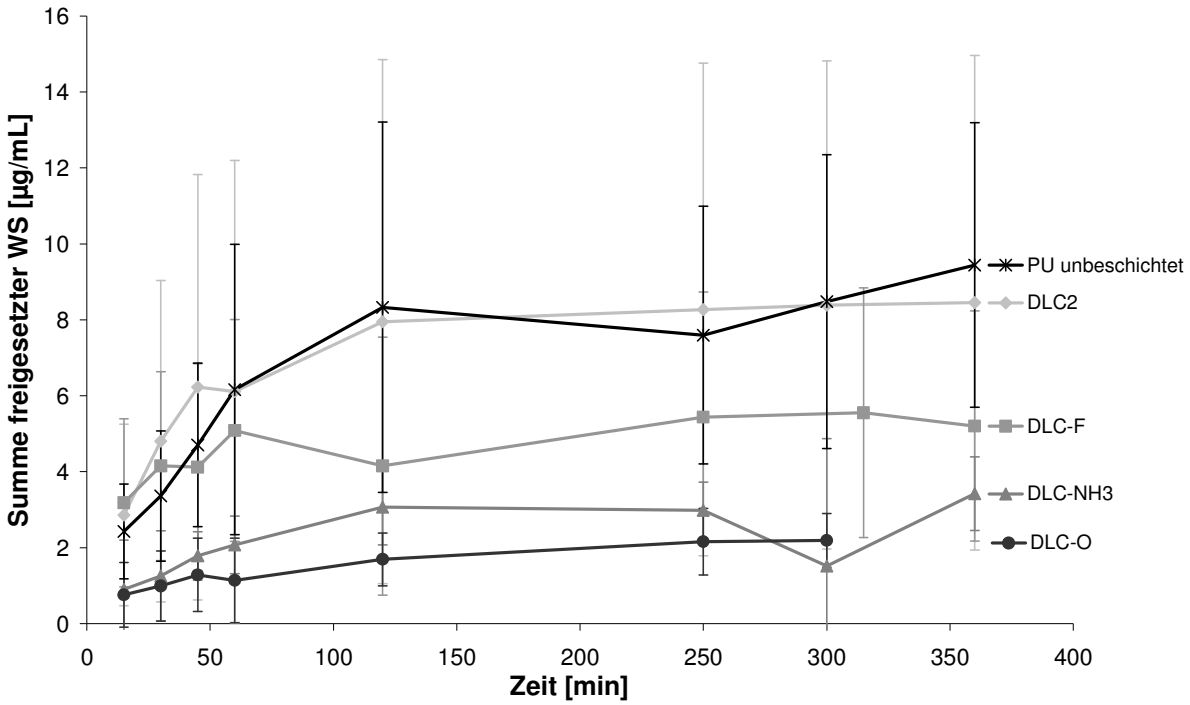


Abbildung 74: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Dioxan-Lösung 0,1% für 1 Stunde gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Die höchsten Freisetzungskurven können bei der unfunktionalisierten DLC2-Beschichtung und bei den unbeschichteten Schläuchen beobachtet werden (10 bzw. 11 µg/mL nach 6 Stunden). Allerdings sind hier auch die Standardabweichungen mit bis zu 6,5 µg/mL bzw. 4 µg/mL besonders hoch. Sehr viel niedriger ist die freigesetzte Wirkstoffmenge bei der DLC-NH3- und bei der DLC-O-Beschichtung mit 5 µg/mL nach 6 Stunden bzw. 3,5 µg/mL nach 5 Stunden.

Die Gleichwertigkeit aller Beschichtungen im Hinblick auf die Freisetzungseigenschaften kann bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen nicht so eindeutig bestätigt werden wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen, auch wenn die Überschneidungen der Fehlerbalken der Messreihen „PU unbeschichtet“ und „DLC2“ mit den anderen Freisetzungskurven eine solche Gleichwertigkeit vermuten lassen.

Der t-Test soll auch hier wieder für mehr Klarheit sorgen:

Tabelle 11: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
15	0,873 n.s.	0,298 n.s.	0,263 n.s.	0,796 n.s.	0,215 n.s.	0,189 n.s.	0,639 n.s.	0,217 n.s.	0,217 n.s.	0,138 n.s.
30	0,830 n.s.	0,280 n.s.	0,256 n.s.	0,626 n.s.	0,171 n.s.	0,148 n.s.	0,677 n.s.	0,164 n.s.	0,164 n.s.	0,123 n.s.
45	0,601 n.s.	0,303 n.s.	0,265 n.s.	0,695 n.s.	0,273 n.s.	0,206 n.s.	0,786 n.s.	0,134 n.s.	0,134 n.s.	0,094 n.s.
60	0,811 n.s.	0,370 n.s.	0,291 n.s.	0,990 n.s.	0,211 n.s.	0,131 n.s.	0,718 n.s.	0,201 n.s.	0,201 n.s.	0,142 n.s.
120	0,457 n.s.	0,345 n.s.	0,256 n.s.	0,942 n.s.	0,643 n.s.	0,337 n.s.	0,297 n.s.	0,198 n.s.	0,198 n.s.	0,140 n.s.
250	0,548 n.s.	0,292 n.s.	0,243 n.s.	0,884 n.s.	0,325 n.s.	0,222 n.s.	0,472 n.s.	0,136 n.s.	0,136 n.s.	0,101 n.s.
300		0,199 n.s.	0,236 n.s.	0,985 n.s.				0,079 n.s.	0,079 n.s.	0,102 n.s.
360	0,494 n.s.	0,312 n.s.		0,833 n.s.	0,418 n.s.		0,205 n.s.		0,100 n.s.	

Bei keiner der untersuchten Kombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Messpunkten der paarweise verglichenen Beschichtungen festgestellt werden. Allerdings sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten nicht bei allen Kombinationen so hoch wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen.

3.3.3.3 Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

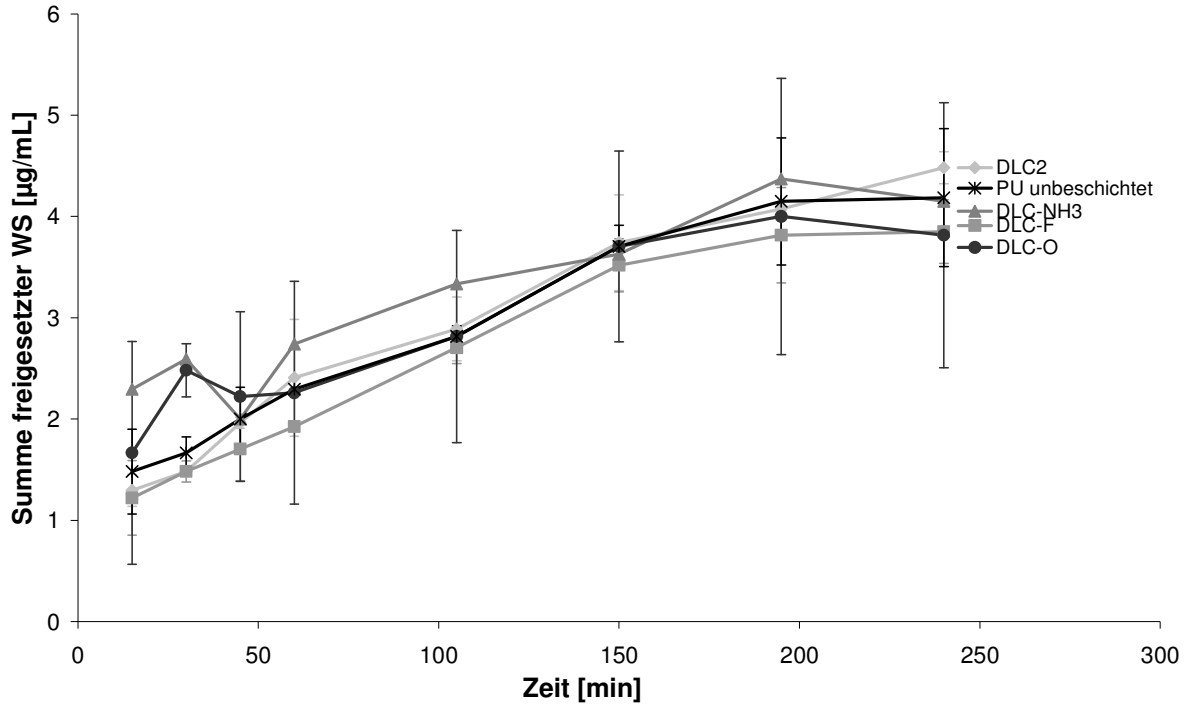


Abbildung 75: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Ethanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Hier ist man schon auf den ersten Blick versucht, zu sagen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den fünf Messreihen geben kann. Sie verlaufen so dicht nebeneinander, dass man sie kaum zu unterscheiden sind. Auch kommt es zu mehrfachen Überschneidungen einiger Freisetzungskurven miteinander und einige der Fehlerbalken schneiden sämtliche Kurven.

Die nach 6 Stunden freigesetzten Wirkstoffmengen liegen zwischen 3,8 und 4,5 µg/mL, der Freisetzungsverlauf ist linear.

Tabelle 12: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
15	0,827 n.s.	0,347 n.s.	0,717 n.s.	0,645 n.s.	0,334 n.s.	0,670 n.s.	0,579 n.s.	0,372 n.s.	0,363 n.s.	0,854 n.s.
30	1,000 n.s.	0,353 n.s.	0,117 n.s.	0,344 n.s.	0,353 n.s.	0,082 n.s.	0,316 n.s.	0,480 n.s.	0,372 n.s.	0,086 n.s.
45	0,448 n.s.	0,494 n.s.	0,737 n.s.	0,895 n.s.	0,455 n.s.	0,538 n.s.		0,532 n.s.	0,499 n.s.	0,775 n.s.
60	0,447 n.s.	0,438 n.s.	0,886 n.s.	0,830 n.s.	0,381 n.s.	0,742 n.s.		0,406 n.s.	0,428 n.s.	0,970 n.s.
105	0,557 n.s.	0,419 n.s.	0,937 n.s.	0,797 n.s.	0,395 n.s.	0,905 n.s.	0,504 n.s.	0,393 n.s.	0,411 n.s.	1,000 n.s.
150	0,633 n.s.	0,519 n.s.	0,966 n.s.	0,932 n.s.	0,478 n.s.	0,829 n.s.	0,520 n.s.	0,508 n.s.	0,514 n.s.	1,000 n.s.
195	0,579 n.s.	0,445 n.s.	0,951 n.s.	0,895 n.s.	0,397 n.s.	0,881 n.s.	0,614 n.s.	0,421 n.s.	0,449 n.s.	0,906 n.s.
240	0,170 n.s.	0,565 n.s.	0,602 n.s.	0,648 n.s.	0,449 n.s.	0,975 n.s.	0,616 n.s.	0,432 n.s.	0,501 n.s.	0,766 n.s.

Der t-Test bestätigt den Eindruck, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beschichtungen gibt.

3.3.3.4 Freisetzung aus in Methanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer methanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

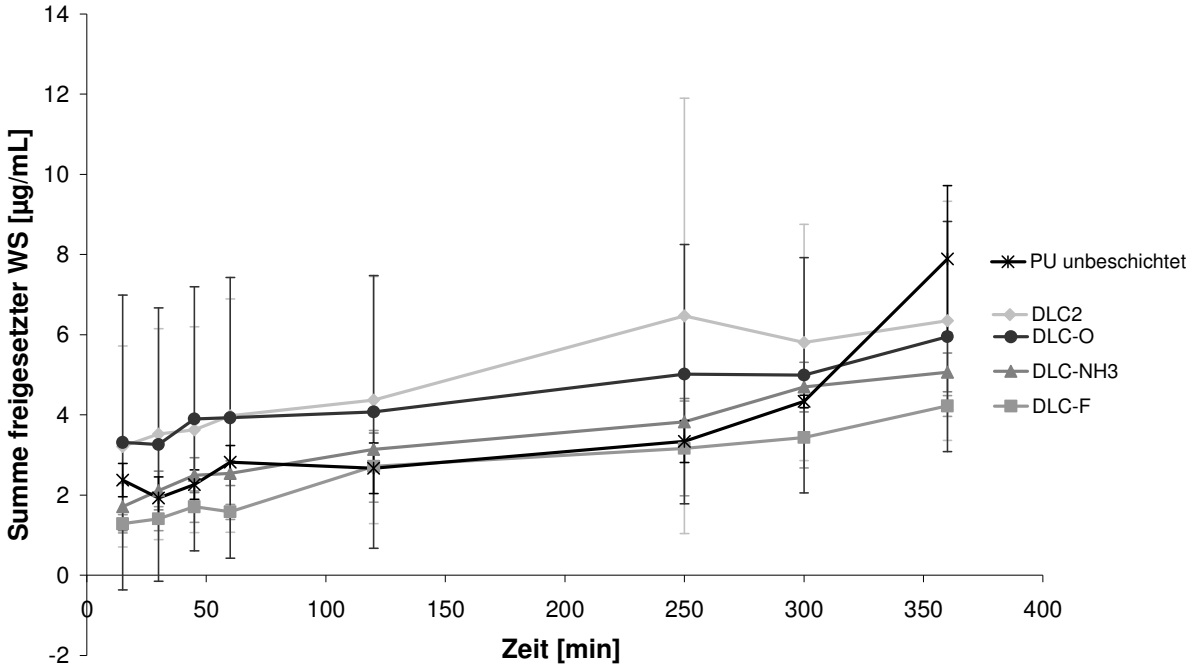


Abbildung 76: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Methanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen zeigen die Messpunkte der beiden Messreihen mit der höchsten Freisetzung („DLC2“ und „DLC-O“) auch die größten Standardabweichungen.

Die Messreihe „PU unbeschichtet“ verläuft anfangs im unteren Freisetzungsbereich, springt aber in der letzten Stunde auf den insgesamt höchsten Wert.

Lässt man diesen letzten Wert außer Acht, so erreichen die Differenzen zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Messreihen maximal einen Wert von 2 µg/mL, während

einige Standardabweichungen schon fast 4 µg/mL betragen. Daher ist auch hier zu vermuten, dass sich die Beschichtungen untereinander nicht signifikant unterscheiden.

Dies ist nun auch wieder durch einen t-Test zu bestätigen:

Tabelle 13: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
15	0,315 n.s.	0,409 n.s.	0,971 n.s.	0,623 n.s.	0,347 n.s.	0,441 n.s.	0,125 n.s.	0,530 n.s.	0,241 n.s.	0,703 n.s.
30	0,298 n.s.	0,453 n.s.	0,922 n.s.	0,406 n.s.	0,113 n.s.	0,446 n.s.	0,371 n.s.	0,620 n.s.	0,726 n.s.	0,570 n.s.
45	0,323 n.s.	0,525 n.s.	0,916 n.s.	0,454 n.s.	0,080 n.s.	0,367 n.s.	0,227 n.s.	0,537 n.s.	0,568 n.s.	0,480 n.s.
60	0,290 n.s.	0,484 n.s.	0,986 n.s.	0,563 n.s.	0,015 *	0,366 n.s.	0,117 n.s.	0,565 n.s.	0,525 n.s.	0,639 n.s.
120	0,454 n.s.	0,560 n.s.	0,916 n.s.	0,442 n.s.	0,515 n.s.	0,565 n.s.	0,947 n.s.	0,681 n.s.	0,471 n.s.	0,551 n.s.
250	0,403 n.s.	0,489 n.s.	0,714 n.s.	0,423 n.s.	0,446 n.s.	0,431 n.s.	0,839 n.s.	0,592 n.s.	0,408 n.s.	0,465 n.s.
300	0,297 n.s.	0,584 n.s.	0,752 n.s.	0,479 n.s.	0,092 n.s.	0,458 n.s.	0,169 n.s.	0,879 n.s.	0,425 n.s.	0,737 n.s.
360	0,343 n.s.	0,535 n.s.	0,877 n.s.	0,526 n.s.	0,075 n.s.	0,406 n.s.	0,212 n.s.	0,647 n.s.	0,262 n.s.	0,425 n.s.

Der aus der obigen Abbildung gewonnene Eindruck bestätigt sich weitestgehend, die meisten Tests ergeben eine nicht signifikante Abweichung der Messwerte voneinander.

Nur beim Vergleich der Beschichtungen DLC-F und DLC-NH3 ergibt sich beim Messpunkt „60 Minuten" ein signifikanter Unterschied. Da bei der deutlichen Überzahl der Vergleiche jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden, kann man davon ausgehen, dass die Beschichtungen gleichwertig sind, was die Beeinflussung der Freisetzungseigenschaften betrifft.

3.3.3.5 Freisetzung aus in Wasser gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer wässrigen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

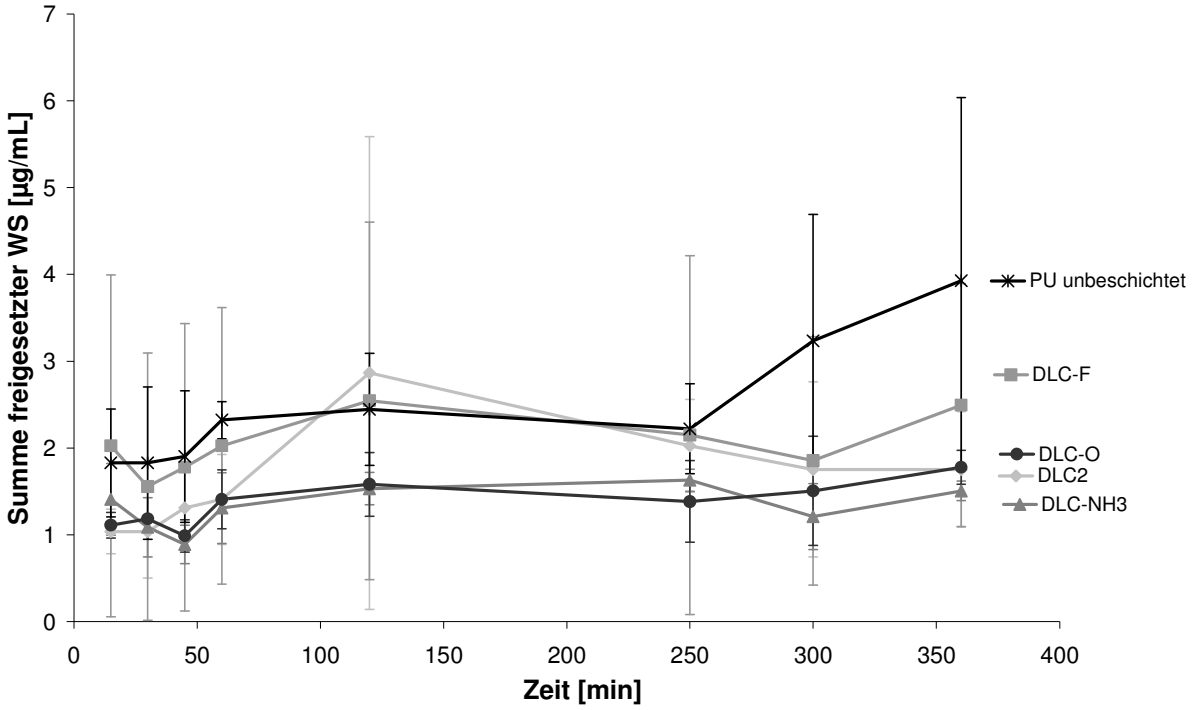


Abbildung 77: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Wasser-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Wie schon eingangs bei der Untersuchung der DLC-K-Beschichtung (Abschnitt 3.3.1.6) kann man bei diesen Kurven nicht wirklich von Freisetzungskurven sprechen, da praktisch kein Anstieg der Kurven zu erkennen ist. Sieht man von den beiden letzten Punkten der Messreihe „PU unbeschichtet“ ab, so unterscheiden sich die Mittelwerte der Messreihen um etwa 1,4 µg/mL, der Anstieg, der insgesamt zu verzeichnen ist, beträgt höchstens 0,75 µg/mL. Die Standardabweichungen – insbesondere die der Messreihen mit etwas höheren gemessenen Wirkstoffmengen – sind im Vergleich hierzu relativ hoch.

Einige der Kurven überschneiden sich; es ist keine Messreihe zu identifizieren, die sich von den anderen abhebt. Der Anschein der Nichtsignifikanz der Unterschiede zwischen den Beschichtungen soll wiederum durch einen t-Test bestätigt werden:

Tabelle 14: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
15	0,477 n.s.	0,270 n.s.	0,693 n.s.	0,146 n.s.	0,644 n.s.	0,506 n.s.	0,881 n.s.	0,341 n.s.	0,392 n.s.	0,179 n.s.
30	0,627 n.s.	0,900 n.s.	0,678 n.s.	0,267 n.s.	0,654 n.s.	0,717 n.s.	0,807 n.s.	0,667 n.s.	0,279 n.s.	0,333 n.s.
45	0,678 n.s.	0,270 n.s.	0,372 n.s.	0,327 n.s.	0,451 n.s.	0,496 n.s.	0,914 n.s.	0,588 n.s.	0,137 n.s.	0,165 n.s.
60	0,578 n.s.	0,809 n.s.	1,000 n.s.	0,077 n.s.	0,521 n.s.	0,574 n.s.	0,779 n.s.	0,764 n.s.	0,031 *	0,023 *
120	0,879 n.s.	0,486 n.s.	0,501 n.s.	0,817 n.s.	0,484 n.s.	0,504 n.s.	0,943 n.s.	0,848 n.s.	0,125 n.s.	0,132 n.s.
250	0,928 n.s.	0,329 n.s.	0,195 n.s.	0,670 n.s.	0,706 n.s.	0,590 n.s.	0,957 n.s.	0,462 n.s.	0,181 n.s.	0,107 n.s.
300	0,927 n.s.	0,457 n.s.	0,741 n.s.	0,229 n.s.	0,522 n.s.	0,729 n.s.	0,306 n.s.	0,532 n.s.	0,130 n.s.	0,164 n.s.
360	0,471 n.s.	0,587 n.s.	0,956 n.s.	0,210 n.s.	0,346 n.s.	0,470 n.s.	0,391 n.s.	0,123 n.s.	0,185 n.s.	0,219 n.s.

Nur bei zwei Vergleichen (PU mit DLC-NH3 bzw. mit DLC-O, jeweils bei 60 Minuten) ergaben sich signifikante Unterschiede. Die meisten anderen Werte sprechen recht deutlich für die Gleichwertigkeit der Beschichtungen; sie liegen größtenteils recht weit vom Grenzwert p = 0,05 entfernt.

Auch beim letzten der fünf getesteten Lösungsmittel konnte also kein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungen hinsichtlich der Beeinflussung der Freisetzungseigenschaften aus den Schläuchen festgestellt werden.

Die Tatsache, dass sich auch kein Unterschied zu den unbeschichteten Schläuchen ergibt, belegt, dass die Beschichtung nicht an der Freisetzung beteiligt ist. Der Ansatzpunkt mit den „Nanolöchern" muss also verworfen werden. Trotzdem sind die Freisetzungseigenschaften der Schläuche viel versprechend, sie sind aber eben auf die Polyurethan-Matrix zurückzuführen, nicht auf die Kohlenstoff-Beschichtung.

3.3.3.6 Vergleich aller fünf Lösungsmittel

Analog zu Abschnitt 3.3.1.7 sollen hier noch einmal die verschiedenen Lösungsmittel einander gegenübergestellt werden. Dazu wurde aus allen Messwerten aus den oberen Abschnitten (3.3.3.1 bis 3.3.3.5) für jeweils eines der Lösungsmittel der Mittelwert über alle Beschichtungen ermittelt. Da die Beschichtungen als gleichwertig angesehen werden, ist dies legitim.

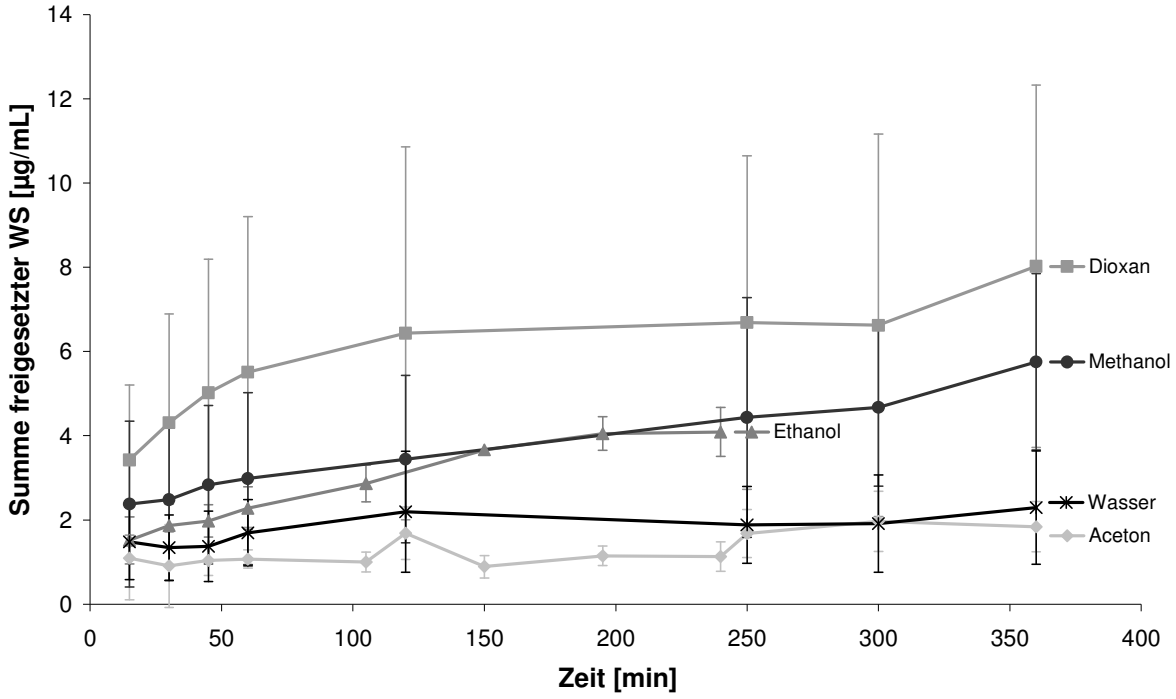


Abbildung 78: Freisetzungskurven für die fünf verwendeten Quellmittel. Es wurde der Mittelwert aus allen Messungen aus dem Vergleich der Beschichtungen gebildet.

Die freigesetzten Wirkstoffmengen unterscheiden sich teilweise stark von den in Abschnitt 3.3.1 bestimmten. Allerdings ist hier noch anzumerken, dass bei den Versuchen in Abschnitt 3.3.1 Schlauchstücke von 1 cm Länge verwendet wurden, während die beim Vergleich der Beschichtungen verwendeten Schlauchstücke nur 5 mm lang waren, da hier nicht soviel Schlauchmaterial vorhanden war. Doch auch, wenn man diesen Umstand beachtet, ergeben sich noch Unterschiede.

Die Freisetzungskurve der in Dioxan gequollenen Schläuche beispielsweise liegt jetzt niedriger als zuvor, nämlich am Ende bei etwa 7,5 µg/mL statt bei 8,5 µg/mL und am Anfang bei 3,5 µg/mL statt bei 6 µg/mL. (Die Längenunterschiede wurden bei der Angabe der Vergleichswerte berücksichtigt, die in Abschnitt 3.3.1 bestimmten Wirkstoffmengen wurden

also halbiert.) Trotzdem zeigen die in Dioxan gequollenen Schläuche auch hier die höchste Freisetzung.

Die Schläuche, die in Methanol bzw. in Ethanol gequollen wurden, zeigen jetzt praktisch keinen Unterschied mehr in ihren Freisetzungseigenschaften. In Abschnitt 3.3.1 lag die Freisetzungskurve der in Ethanol gequollenen Schläuche noch deutlich oberhalb der Freisetzungskurve der in Methanol gequollenen Schläuche. Zu der Angleichung haben beide Messreihen beigetragen: die von Ethanol liegt hier niedriger als zuvor (1 µg/mL statt 3 µg/mL am Anfang, 4,5 µg/mL statt 5,5 µg/mL am Ende der Freisetzung), die von Methanol höher (1,5 µg/mL statt 0,15 µg/mL am Anfang und 5 µg/mL statt 3 µg/mL am Ende).

Bei den in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuchen ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zu der älteren Messung: Bei den in Aceton gequollenen Schläuchen lag der erste Messwert bei der ersten Messung bei 0,2 µg/mL, der letzte bei 0,9 µg/mL. Bei der neuen Messung verläuft die Freisetzungskurve von 0,4 µg/mL nach 1,1 µg/mL. Auch bei den in Wasser gequollenen Schläuchen sind die Unterschiede nicht sehr groß. Bei der ersten Messung wurde am ersten Messpunkt eine Wirkstoffmenge von 1,4 µg/mL bestimmt, am letzten Messpunkt waren es 1,9 µg/mL. Bei der neuen Messung sind es nun 0,8 µg/mL bzw. 1,6 µg/mL.

Die Zahlenwerte variieren also zwischen den beiden Messgruppen, die Kernaussage ändert sich aber nicht: die in Dioxan gequollenen Schläuche zeigen die höchste Freisetzung, darauf folgen die in Ethanol bzw. in Methanol gequollenen Schläuche. In Aceton bzw. in Wasser gequollene Schläuche zeigen praktisch überhaupt keine Freisetzung.

Die Variation der Zahlenwerte könnte ggf. dadurch zustande kommen, dass die kürzeren Schläuche gründlicher gespült werden können. Bei einem Schlauch von 1 cm Länge besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass das Spülmittel Wirkstoffreste in der Mitte des Schlauches nicht erreicht.

In einem t-Test soll nun noch einmal überprüft werden, ob Unterschiede zwischen den Quellmitteln statistisch nachweisbar sind:

Tabelle 15: t- Test um Vergleich der verschiedenen Quellmittel miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Lösungsmittel dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Quellmedien als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [min]	Aceton und Dioxan	Aceton und Ethanol	Aceton und Methanol	Aceton und Wasser	Dioxan und Ethanol	Dioxan und Methanol	Dioxan und Wasser	Ethanol und Methanol	Ethanol und Wasser	Methanol und Wasser
15	0,000 *	0,122 n.s.	0,041 *	0,275 n.s.	0,024 *	0,146 n.s.	0,001 *	0,492 n.s.	0,396 n.s.	0,137 n.s.
30	0,000 *	0,019 *	0,013 *	0,202 n.s.	0,022 *	0,039 *	0,001 *	0,799 n.s.	0,078 n.s.	0,053 n.s.
45	0,000 *	0,011 *	0,003 *	0,154 n.s.	0,010 *	0,033 *	0,001 *	0,500 n.s.	0,053 n.s.	0,015 *
60	0,000 *	0,004 *	0,004 *	0,011 *	0,014 *	0,031 *	0,001 *	0,663 n.s.	0,056 n.s.	0,042 *
105		0,001 *								
120	0,000 *		0,030 *	0,030 *		0,028 *	0,003 *			0,065 n.s.
150		0,000 *								
195		0,000 *								
240		0,000 *								
250	0,000 *		0,004 *	0,563 n.s.		0,089 n.s.	0,000 *			0,006 *
300	0,001 *		0,000 *	0,901 n.s.		0,143 n.s.	0,001 *			0,000 *
360	0,000 *		0,000 *	0,319 n.s.		0,116 n.s.	0,001 *			0,000 *

Bei den meisten Messpunkten der Vergleiche von Aceton mit Dioxan, Ethanol und Methanol ergeben sich signifikante Unterschiede. Nur bei 15 Minuten war der Unterschied zur Messreihe „Ethanol" nicht signifikant. Beim ersten Messpunkt (15 Minuten) liegen alle Messkurven noch relativ dicht beieinander, dies ist vermutlich der Grund für die Nichtsignifikanz. Zum Großteil konnte also ein signifikanter Unterschied zwischen dem Quellmittel Aceton zu den Quellmitteln Dioxan, Ethanol und Methanol nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Quellmittel Aceton und Wasser liefert in der Regel keine signifikanten Unterschiede, nur beim den Messwerten von 60 und 120 Minuten wird das Signifikanzniveau unterschritten. Der Grund hierfür dürfte sein, dass an dieser Stelle die Standardabweichung der Messreihe „Aceton" besonders klein ist. Insgesamt konnte aber ein Unterschied zwischen den Quellmitteln Aceton und Wasser nicht nachgewiesen werden.

Der Vergleich von Dioxan mit den anderen Quellmitteln liefert erwartungsgemäß signifikante Unterschiede in fast allen Messpunkten. Nur beim Vergleich mit den in Methanol gequollenen Schläuchen bei 15 Minuten war der Unterscheid nicht signifikant. Allerdings liegen beim ersten Messpunkt die Messreihen auch noch sehr dicht beisammen. Insgesamt sollte die Schlussfolgerung aber so lauten, dass Dioxan signifikant höhere Freisetzungsergebnisse hervorruft als die übrigen vier untersuchten Lösungsmittel.

Interessant ist nun vor allem noch der Vergleich der Quellmittel Ethanol und Methanol. Entsprechend des Eindruckes bei Betrachten von Abbildung 78 ergeben sich auch beim t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Messreihen.

Der Vergleich des Quellmittels Wasser mit Ethanol ergibt bei allen Messpunkten signifikante Unterschiede. Beim Vergleich von Wasser mit Methanol ergeben sich immerhin bei drei von

acht Vergleichen nicht signifikante Unterschiede. Dieser Umstand dürfte den relativ hohen Standardabweichungen geschuldet sein, die bei der Messreihe „Wasser“ auftreten. Der Vergleich mit Ethanol findet nur in den ersten 60 Minuten statt, die Kurven verlaufen in diesem Bereich relativ dicht nebeneinander. Auch beim Vergleich mit Methanol handelt es sich bei zwei von drei fraglichen Werten um die beiden ersten Messpunkte, beim dritten Wert ist das Signifikanzniveau nur knapp überschritten. Der Kurvenverlauf lässt vermuten, dass der t-Test bei Vergleichen zu späteren Zeitpunkten auch beim Vergleich von Ethanol und Wasser signifikante Unterschiede anzeigen würde, wenn es hier gemeinsame Messzeitpunkte gäbe.

Daher kann man davon ausgehen, dass auch zwischen Wasser und Ethanol bzw. Methanol ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Quell- und Freisetzungseigenschaften besteht.

3.3.4 Vergleich der Plasmabeschichtungen in einer Freisetzung über 7 Tage

Da Harnleiterschienen nicht für 6 Stunden implantiert werden, sondern für mehrere Monate, ist es von Interesse zu untersuchen, wie sich die Freisetzung über einen längeren Zeitraum verhält. Als Zwischenschritt wurde ein Freisetzungsversuch über eine Woche durchgeführt, in dem noch einmal die Beschichtungen und auch die fünf Lösungsmittel miteinander verglichen werden sollten.

3.3.4.1 Freisetzung über 7 Tage aus in Aceton gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer Mischung aus einem Teil Aceton und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen. Die Ethacridinlactat-Konzentration der Quelllösung betrug also 0,5%.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

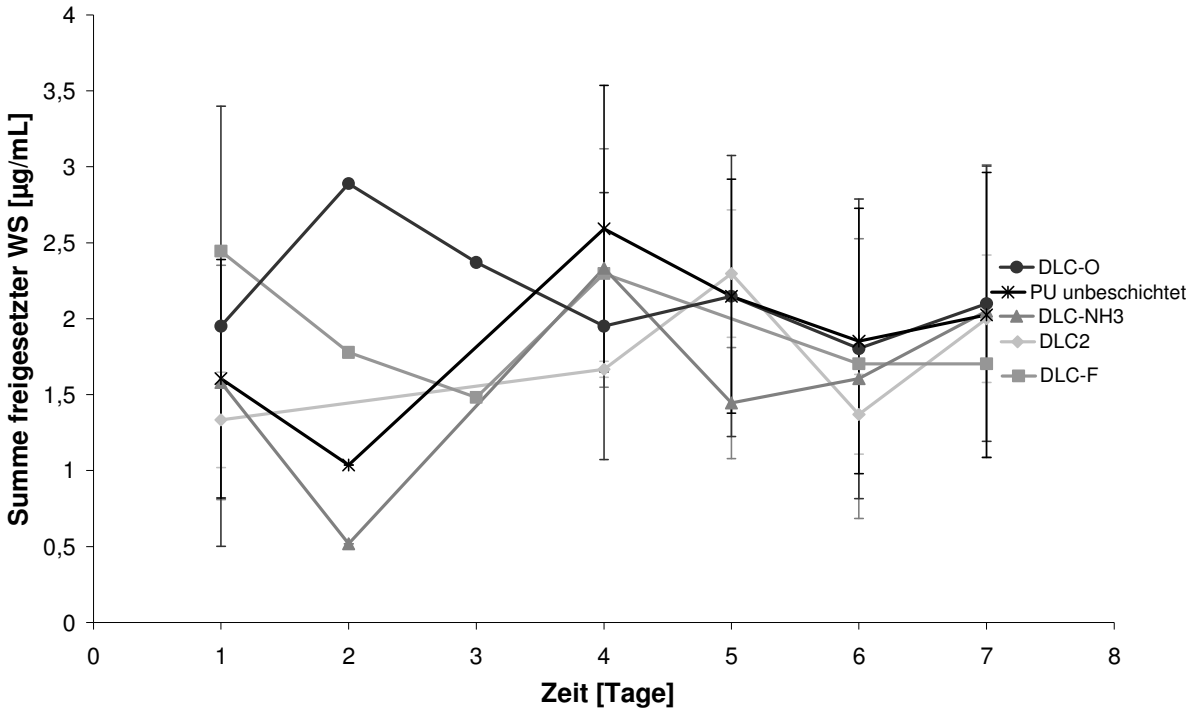


Abbildung 79: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Aceton-Lösung 0,5% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Wie schon bei der Freisetzung über 6 Stunden lässt sich kein Unterschied zwischen den Beschichtungen erkennen. Die Freisetzungskurven der verschiedenen Beschichtungen überschneiden sich mehrfach, die relativ hohen Standardabweichungen schneiden die Nachbarkurven ebenfalls. Die größten Abstände zwischen den Kurven ergeben sich am zweiten Tag der Freisetzung, wo jeweils nur ein einziger (oder kein) Messwert vorliegt. Vermutlich würde sich diese Abweichung bei Vorliegen mehrerer Messwerte relativieren.

Tabelle 16: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,542 n.s.	0,431 n.s.	0,444 n.s.	0,432 n.s.	0,375 n.s.	0,410 n.s.	0,378 n.s.	0,722 n.s.	0,971 n.s.	0,740 n.s.
4	0,420 n.s.	0,442 n.s.	0,632 n.s.	0,397 n.s.	0,500 n.s.	0,447 n.s.	0,542 n.s.	0,652 n.s.	0,794 n.s.	0,519 n.s.
5	0,965 n.s.	0,417 n.s.	0,417 n.s.	0,417 n.s.	0,317 n.s.	0,319 n.s.	0,320 n.s.	1,000 n.s.	1,000 n.s.	1,000 n.s.
6	0,529 n.s.	0,431 n.s.	0,438 n.s.	0,440 n.s.	0,481 n.s.	0,509 n.s.	0,518 n.s.	0,812 n.s.	0,753 n.s.	0,951 n.s.
7	0,517 n.s.	0,425 n.s.	0,427 n.s.	0,424 n.s.	0,545 n.s.	0,553 n.s.	0,542 n.s.	0,952 n.s.	0,976 n.s.	0,926 n.s.

Der t-Test bestätigt den aus der Graphik gewonnen ersten Eindruck. Bei keinem der Vergleiche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungen nachgewiesen werden.

3.3.4.2 Freisetzung über 7 Tage aus in Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für eine Stunde in einer Mischung aus neun Teilen Dioxan und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen. Die Ethacridinlactat-Konzentration der Quelllösung betrug also 0,1%.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

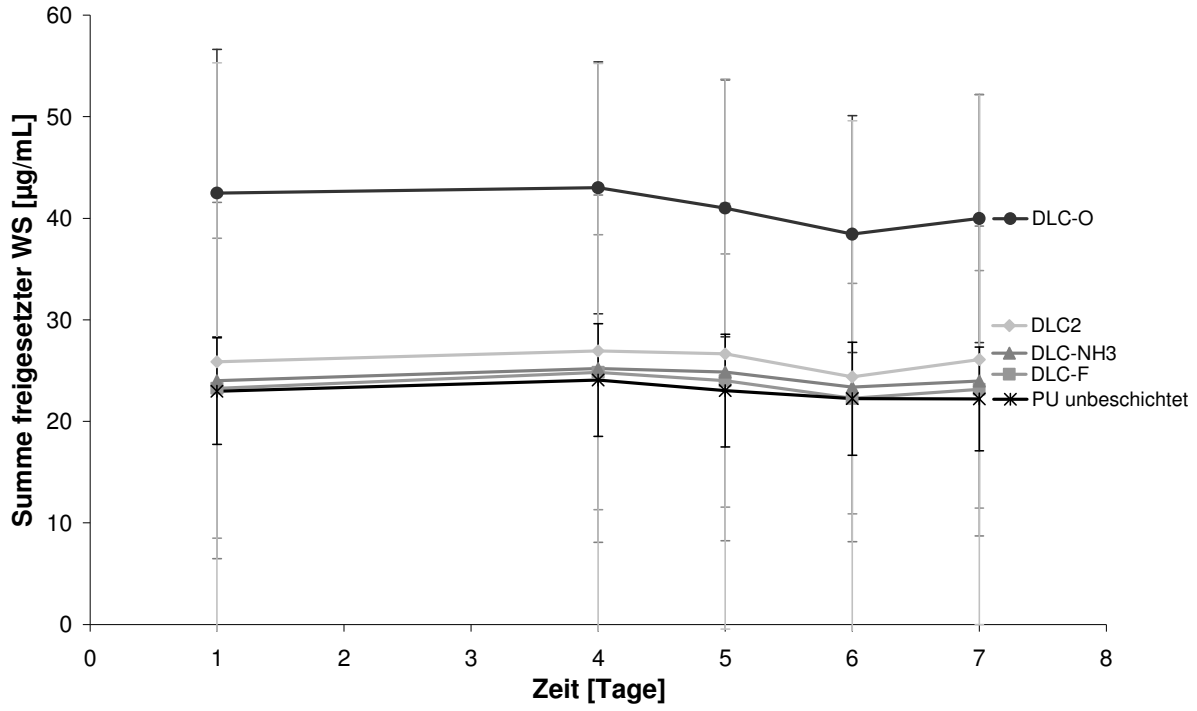


Abbildung 80: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Dioxan-Lösung 0,1% für 1 Stunde gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Vier der fünf Freisetzungskurven verlaufen praktisch deckungsgleich. Die Messreihe „DLC-O“ verläuft deutlich oberhalb der anderen Messkurven. Die Standardabweichung der Reihe „DLC-O“ erreicht die anderen Messkurven nicht ganz, die Standardabweichung der Messreihe „DLC2“ jedoch überschneidet die Messkurve „DLC-O“. Man könnte nun annehmen, dass die Sauerstoff-funktionalisierte Beschichtung den anderen überlegen sei. Allerdings ist dies das erste Mal, dass dieser Hinweis auftaucht, bei keiner der bisherigen Messungen ist diese Beschichtung besonders aufgefallen. Daher soll diese Auffälligkeit hier zur Kenntnis genommen, aber nicht voreilig interpretiert werden.

Tabelle 17: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,924 n.s.	0,948 n.s.	0,571 n.s.	0,913 n.s.	0,967 n.s.	0,315 n.s.	0,983 n.s.	0,371 n.s.	0,947 n.s.	0,276 n.s.
4	0,935 n.s.	0,948 n.s.	0,567 n.s.	0,909 n.s.	0,983 n.s.	0,298 n.s.	0,951 n.s.	0,366 n.s.	0,942 n.s.	0,241 n.s.
5	0,916 n.s.	0,945 n.s.	0,591 n.s.	0,882 n.s.	0,960 n.s.	0,309 n.s.	0,932 n.s.	0,395 n.s.	0,903 n.s.	0,262 n.s.
6	0,927 n.s.	0,967 n.s.	0,574 n.s.	0,925 n.s.	0,942 n.s.	0,295 n.s.	0,998 n.s.	0,389 n.s.	0,934 n.s.	0,265 n.s.
7	0,904 n.s.	0,933 n.s.	0,589 n.s.	0,869 n.s.	0,958 n.s.	0,295 n.s.	0,929 n.s.	0,371 n.s.	0,898 n.s.	0,257 n.s.

Der t-Test belegt dann auch, dass der visuell recht deutlich erscheinende Unterschied zwischen der Messreihe „DLC-O" und den anderen Messreihen nicht signifikant ist. Zwar fällt die Nichtsignifikanz mit knapp 0,3 im Vergleich mit den unbeschichteten („PU") Schläuchen bis knapp 0,6 bei den beschichteten, jedoch unfunktionalisierten („DLC2") Schläuchen nicht so deutlich aus wie bei den Vergleichen, an denen die Messreihe DLC-O nicht beteiligt ist (alle über 0,9), doch ein signifikanter Unterschied ist nicht nachweisbar.

3.3.4.3 Freisetzung über 7 Tage aus in Ethanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

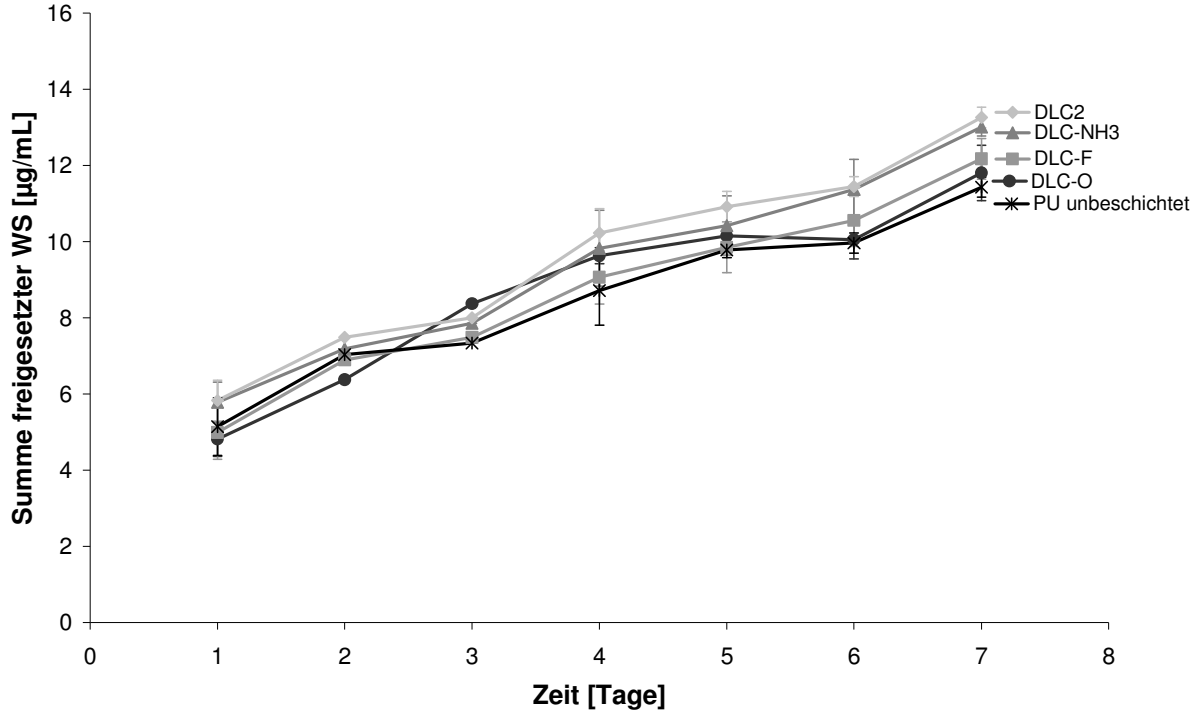


Abbildung 81: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Ethanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Die Freisetzungskurven der unterschiedlich beschichteten Schläuche verlaufen der Form und Höhe annähernd gleich und überschneiden sich mehrfach gegenseitig, so dass auch hier wieder nicht zu erkennen ist, dass sich eine Beschichtung von den anderen wesentlich unterscheidet. Die Standardabweichungen sind relativ gering, so dass nicht alle Fehlerbalken alle Nachbarkurven überdecken, obwohl die Kurven sehr dicht beieinander liegen.

Tabelle 18: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,085 n.s.	0,937 n.s.	0,051 n.s.	0,063 n.s.	0,200 n.s.	0,861 n.s.	0,614 n.s.	0,203 n.s.	0,240 n.s.	0,445 n.s.
4	0,181 n.s.	0,685 n.s.	0,055 n.s.	0,098 n.s.	0,275 n.s.	0,657 n.s.	0,726 n.s.	0,368 n.s.	0,216 n.s.	0,334 n.s.
5	0,208 n.s.	0,533 n.s.	0,078 n.s.	0,074 n.s.	0,335 n.s.	0,932 n.s.	0,391 n.s.	0,297 n.s.	0,165 n.s.	0,064 n.s.
6	0,290 n.s.	0,917 n.s.	0,053 n.s.	0,030 *	0,385 n.s.	0,725 n.s.	0,421 n.s.	0,304 n.s.	0,213 n.s.	0,819 n.s.
7	0,170 n.s.	0,823 n.s.	0,161 n.s.	0,040 *	0,233 n.s.	0,705 n.s.	0,416 n.s.	0,025 *	0,091 n.s.	0,478 n.s.

Bei den meisten Vergleichen traten keine signifikanten Unterschiede auf, nur bei drei Messpunkten wurden Unterschiede gefunden. Allerdings waren die p-Werte bei vielen Vergleichen nicht weit vom Signifikanzniveau entfernt. Dieses Ergebnis dürfte den niedrigen Standardabweichungen geschuldet sein, ein klarer Unterschied zwischen den Beschichtungen ist nicht zu ermitteln, auch wenn diese Aussage nicht mit so großer Sicherheit getroffen werden kann wie an anderer Stelle.

3.3.4.4 Freisetzung über 7 Tage aus in Methanol gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer methanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

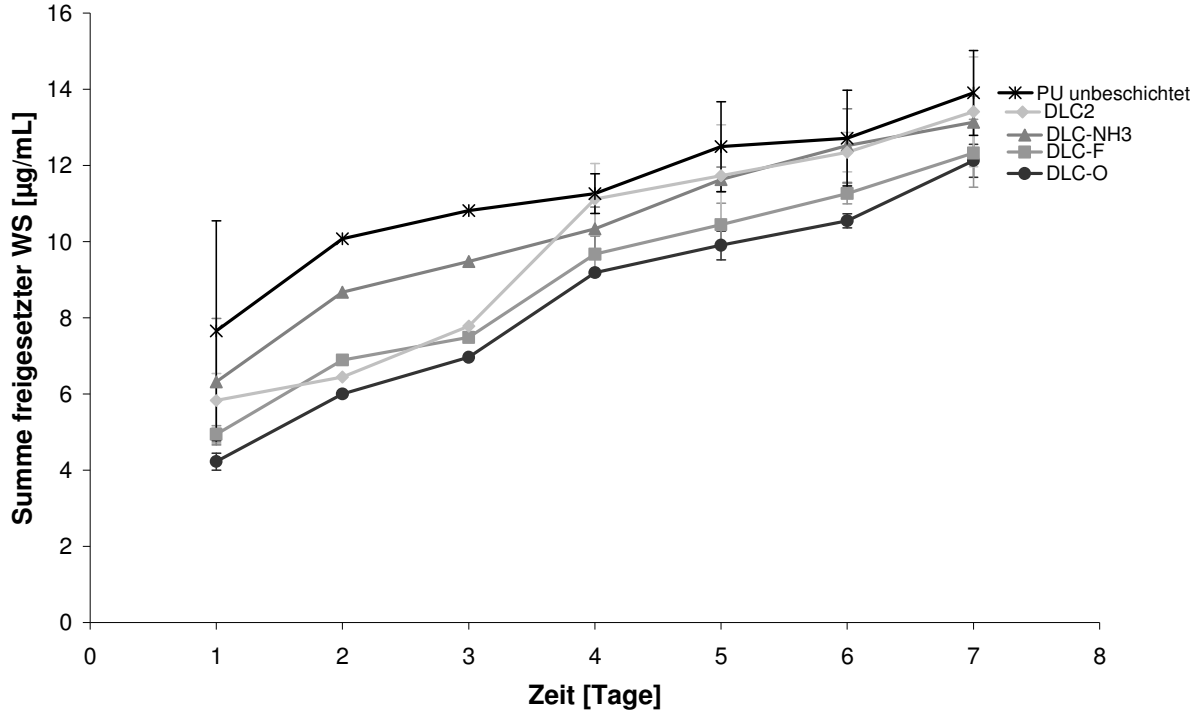


Abbildung 82: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Methanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Der Kurvenverlauf ist der Form nach bei allen fünf Beschichtungen gleich, die Höhe des Freisetzungsniveaus differiert jedoch um etwa 3-4 µg/mL zwischen der höchsten („PU unbeschichtet“) und der niedrigsten („DLC-O“) Freisetzungskurve.

Die Standardabweichungen bei der Messreihe „PU unbeschichtet“ sind sehr hoch, so dass man das Niveau der tatsächlich freigesetzten Wirkstoffmenge ggf. auch niedriger ansetzen kann, unter der Annahme, das die hohen Standardabweichungen dadurch zustande kommen, dass der anhaftende Wirkstoff durch das Spülen nicht immer vollständig entfernt werden konnte.

Die Unterschiede zwischen den Messreihen sind nicht eindeutig, aber auch eine Gleichartigkeit ist hier nicht mit Sicherheit zu erkennen.

Tabelle 19: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,154 n.s.	0,671 n.s.	0,049 *	0,389 n.s.	0,284 n.s.	0,017 *	0,245 n.s.	0,157 n.s.	0,535 n.s.	0,175 n.s.
4	0,236 n.s.	0,442 n.s.	0,212 n.s.	0,868 n.s.	0,337 n.s.	0,386 n.s.	0,087 n.s.	0,217 n.s.	0,236 n.s.	0,112 n.s.
5	0,232 n.s.	0,911 n.s.	0,132 n.s.	0,499 n.s.	0,046 *	0,246 n.s.	0,077 n.s.	0,004 *	0,332 n.s.	0,052 n.s.
6	0,049 *	0,803 n.s.	0,018 *	0,672 n.s.	0,145 n.s.	0,023 *	0,177 n.s.	0,067 n.s.	0,840 n.s.	0,092 n.s.
7	0,341 n.s.	0,789 n.s.	0,260 n.s.	0,665 n.s.	0,281 n.s.	0,753 n.s.	0,130 n.s.	0,109 n.s.	0,378 n.s.	0,095 n.s.

Der t-Test bestätigt die Uneindeutigkeit. Es finden sich unter den Vergleichen vereinzelt signifikante Unterschiede, aber nicht bei allen Messpunkten und Messreihen-Kombinationen. Bei den nichtsignifikanten Unterschieden liegen die Werte häufig noch relativ dicht bei der Signifikanzgrenze von 0,05, nur sehr wenige p-Werte liegen überhaupt über 0,5.

Die Datenlage reicht allerdings nicht aus, um eine bestimmte Beschichtung als überlegen zu identifizieren, insbesondere deshalb, weil sich beim Vergleich mit den unbeschichteten Schläuchen, die die höchste Freisetzung zeigten kein einziger signifikanter Unterschied ergab.

3.3.4.5 Freisetzung über 7 Tage aus in Wasser gequollenen Schläuchen

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer wässrigen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M.

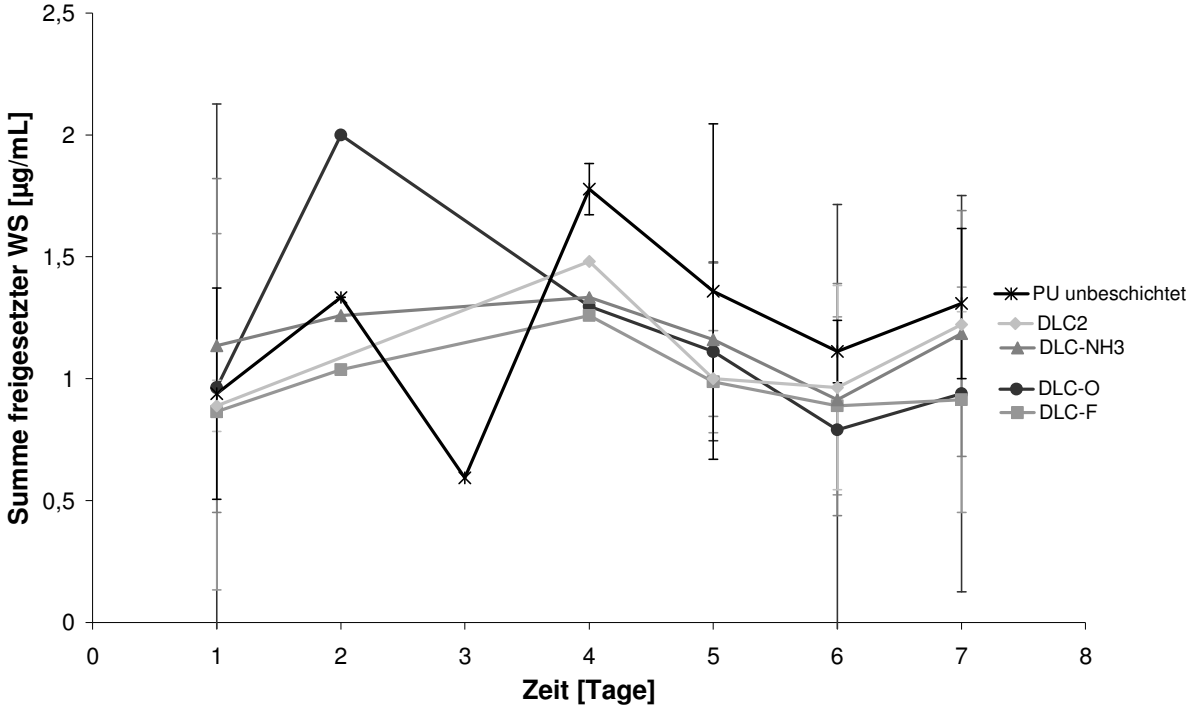


Abbildung 83: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Wasser-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült.

Zwischen den Beschichtungen zeigen sich auch hier keine augenfälligen Unterschiede. Die einzelnen Messkurven verlaufen auf einem ähnlichen und gleich bleibenden Niveau und schneiden sich dabei mehrfach. In der Regel schneiden auch die Fehlerbalken die benachbarten Messkurven, so dass man hier eine Gleichwertigkeit der Beschichtungen vermuten kann.

Tabelle 20: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,422 n.s.	0,429 n.s.	0,425 n.s.	0,424 n.s.	0,663 n.s.	0,908 n.s.	0,889 n.s.	0,838 n.s.	0,698 n.s.	0,975 n.s.
4	0,592 n.s.	0,730 n.s.	0,685 n.s.	0,495 n.s.	0,811 n.s.	0,915 n.s.	0,129 n.s.	0,924 n.s.	0,273 n.s.	0,298 n.s.
5	0,422 n.s.	0,427 n.s.	0,426 n.s.	0,432 n.s.	0,646 n.s.	0,845 n.s.	0,470 n.s.	0,940 n.s.	0,706 n.s.	0,731 n.s.
6	0,421 n.s.	0,421 n.s.	0,418 n.s.	0,427 n.s.	0,953 n.s.	0,866 n.s.	0,497 n.s.	0,836 n.s.	0,572 n.s.	0,566 n.s.
7	0,414 n.s.	0,422 n.s.	0,415 n.s.	0,425 n.s.	0,010 *	0,885 n.s.	0,154 n.s.	0,237 n.s.	0,563 n.s.	0,189 n.s.

Der t-Test bestätigt weitgehend, dass keine Unterschiede zwischen den Beschichtungen feststellbar sind. Nur bei einem einzigen Vergleich (DLC-F und DLC-NH3 nach 7 Tagen) ergibt sich ein signifikanter Unterschied.

3.3.4.6 Vergleich der fünf Lösungsmittel

Wie schon in den Abschnitten 3.3.1.7 und 3.3.2.6 sollen zum Abschluss dieses Abschnitts auch die Lösungsmittel einander gegenübergestellt werden. Dazu wurde für jedes Lösungsmittel der Mittelwert über alle Beschichtungen ermittelt. Die hierfür verwendeten Werte entstammen den letzten fünf Abschnitten 3.3.4.1 bis 3.3.4.5.

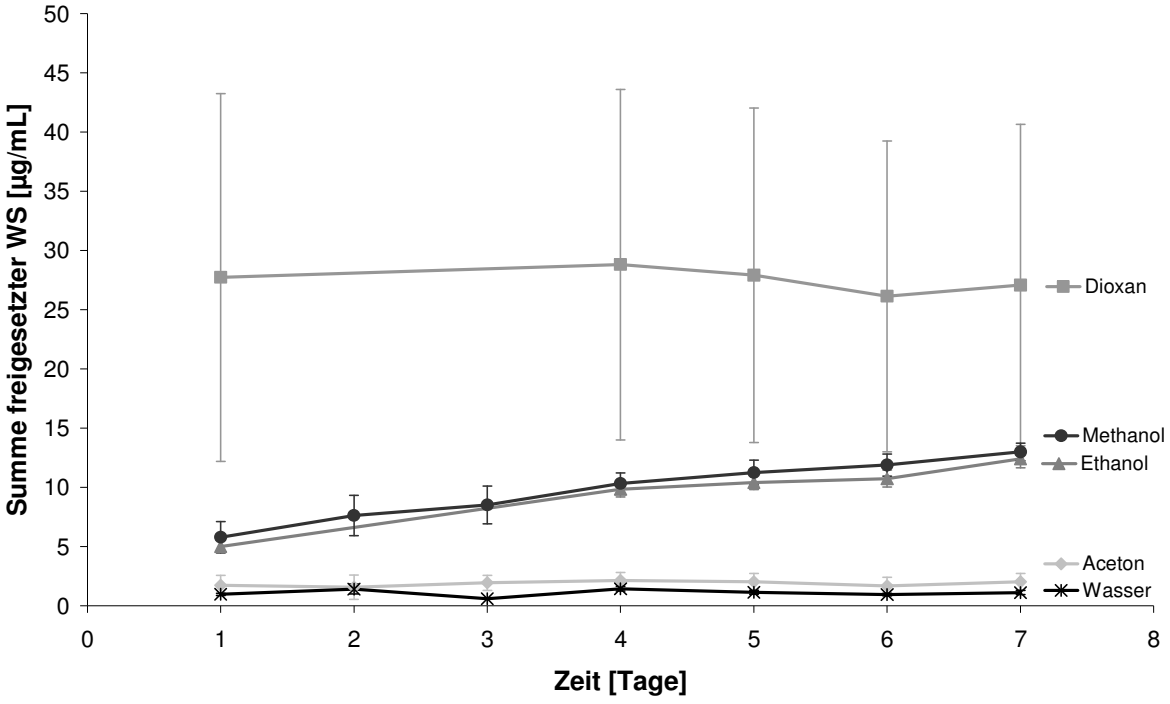


Abbildung 84: Freisetzungskurven für die fünf verwendeten Quellmittel. Es wurde der Mittelwert aus allen Messungen der Abschnitte 3.3.4.1 bis 3.3.4.5 gebildet.

Bei der Freisetzung über eine Woche wird der Eindruck aus der Freisetzung über 6 Stunden bestärkt.

Die Freisetzungskurven der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche stagnieren knapp oberhalb der Nulllinie. Hier ist also praktisch überhaupt keine Freisetzung zu verzeichnen. Außerdem unterscheiden sich die Kurven kaum voneinander.

Auch die Freisetzungskurve der in Dioxan gequollenen Schläuche stagniert, wenn auch auf einem deutlich höheren Niveau. Anscheinend wird hier der gesamte Wirkstoff – oder doch zumindest der größte Teil – schon zu Beginn freigesetzt.

Der kontinuierlich steigende Verlauf der Freisetzungskurven der in Ethanol bzw. in Methanol gequollenen Schläuche setzt sich auch in der Freisetzung über einen längeren Zeitraum fort. Ein Unterschied zwischen den beiden Messreihen ist in dieser Darstellung nicht zu erkennen.

Diese Beobachtung deckt sich mit der aus Abschnitt 3.3.3.6, nicht jedoch mit denen aus Abschnitt 3.3.1.7, wo deutliche Unterschiede zwischen den Freisetzungskurven auftraten, die zu den in Ethanol und Methanol gequollenen Schläuchen gehörten.

Tabelle 21: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Quellmittel miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Lösungsmittel dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	Aceton und Dioxan	Aceton und Ethanol	Aceton und Methanol	Aceton und Wasser	Dioxan und Ethanol	Dioxan und Methanol	Dioxan und Wasser	Ethanol und Methanol	Ethanol und Wasser	Methanol und Wasser
1	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,020 *	0,001 *	0,002 *	0,000 *	0,116 n.s.	0,000 *	0,000 *
2			0,000 *	0,803 n.s.						0,001 *
3			0,001 *							
4	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,011 *	0,003 *	0,003 *	0,000 *	0,212 n.s.	0,000 *	0,000 *
5	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,003 *	0,004 *	0,005 *	0,000 *	0,033 *	0,000 *	0,000 *
6	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,005 *	0,005 *	0,007 *	0,000 *	0,004 *	0,000 *	0,000 *
7	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,001 *	0,008 *	0,009 *	0,000 *	0,137 n.s.	0,000 *	0,000 *

Mit Hilfe des t-Tests kann bestätigt werden, dass die Unterschiede zwischen den Messreihen der in Ethanol bzw. in Methanol gequollenen Schläuche nicht signifikant sind, auch wenn diese Bestätigung nicht sehr eindeutig ist, da die Nichtsignifikanz nur bei drei von fünf Vergleichen auftritt. Allerdings sind die Standardabweichungen der Messreihe „Ethanol" sehr gering, ein signifikanter Unterschied wird in einem solchen Fall durch den t-Test schnell angezeigt.

Zwischen allen anderen Messreihen wurden im Wesentlichen signifikante Unterschiede festgestellt, auch zwischen den Messreihen der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche, die bei rein visueller Betrachtung gleichwertig zu sein scheinen. Dies ist auch ein Widerspruch zu Abschnitt 3.3.3.6. Dort wurden die Unterschiede zwischen den Messreihen Aceton und Wasser klar als nicht signifikant eingestuft. Auch hier sind aber die Standardabweichungen beider Messreihen ausgesprochen gering.

3.3.5 Wechsel auf Fluorimetrie

UV/Vis-Spektroskopie ist eine gängige Methode zur Konzentrationsbestimmung von gelösten Stoffen, die ein π-Elektronensystem, also Doppelbindungen besitzen. Allerdings liegt laut Literatur [Rücker et al., 2001] nur in einem kleinen Fenster ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration vor; man sollte die zu vermessenden Lösungen so verdünnen, dass sich Absorptionen von 0,25 bis 0,75 AU ergeben. Zwar konnte tatsächlich auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen ein linearer Zusammenhang gefunden werden, die Quantifizierungsgrenze liegt jedoch bei 0,012 AU (2 µg/mL). Bei niedriger konzentrierten Lösungen sind die ermittelten Konzentrationen möglicherweise fehlerhaft. Da solche Fälle durchaus auftraten – insbesondere bei der Freisetzung aus in Aceton bzw. Wasser gequollenen Schläuchen – ist die UV/Vis-Spektroskopie als Bestimmungsmethode in diesem Fall nicht optimal; sie ist nicht empfindlich genug.

Glücklicherweise besitzt Ethacridinlactat eine weitere Eigenschaft, die man für die Gehaltsbestimmung heranziehen kann. Aufgrund seiner starren, planaren Molekülstruktur zeigt Ethacridinlactat Fluoreszenz. Diese kann man mit der Methode der Fluoreszenzspektroskopie oder Fluorimetrie quantifizieren. Die Fluorimetrie ist eine sehr viel empfindlichere Methode als die UV/Vis-Spektroskopie und somit für die Bestimmung der geringen Konzentrationen, die sich bei den Freisetzungen ergeben, sehr viel besser geeignet. Eine Quantifizierung ist auch bei Konzentrationen von 0,2 µg/mL noch gut möglich.

3.3.5.1 Versuchswiederholung zur Etablierung der Methode

Um die Methode der Fluorimetrie zur Gehaltsbestimmung zu etablieren, wurden einige der Messungen, die zuvor mit der UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt worden waren, wiederholt; diesmal erfolgte Gehaltsbestimmung jedoch fluorimetrisch.

Gewählt wurde für die Methodenetablierung der Vergleich der Beschichtungen miteinander. Ein Grund hierfür ist, dass der Stand der Arbeiten sich zur Zeit der Umstellung gerade an diesem Punkt befand. Andererseits war die Entscheidung über die Gleichartigkeit oder Nichtgleichartigkeit der Beschichtungen im Hinblick auf die Freisetzungseigenschaften ein wichtiger Aspekt im Rahmen der Projektarbeit, da eine Entscheidung darüber fallen musste, mit welcher Beschichtung die Arbeiten fortgeführt werden sollten. Mit einer empfindlicheren Methode kann man möglicherweise Unterschiede zwischen den Beschichtungen aufdecken, die durch die Gehaltsbestimmung mit der UV/Vis-Spektroskopie nicht gefunden werden konnten.

Die Fluorimetrie ist eine sehr empfindliche Methode, die starken Schwankungen unterliegt, welche von einer Vielzahl von Faktoren abhängen. Deshalb wurde an jedem Tag eine neue Kalibriergerade erstellt und die Kalibrierlösungen zusammen mit den Proben vermessen. Sämtliche Kalibriergeraden hier anzugeben, würde den Rahmen bei weitem sprengen.

Exemplarisch ist hier jedoch eine Kalibriergerade wiedergegeben, nämlich die, die für die Wiederholung des Freisetzungsversuches über sechs Stunden mit den in Ethacridinlactat/Dioxan gequollenen Schläuchen verwendet wurde:

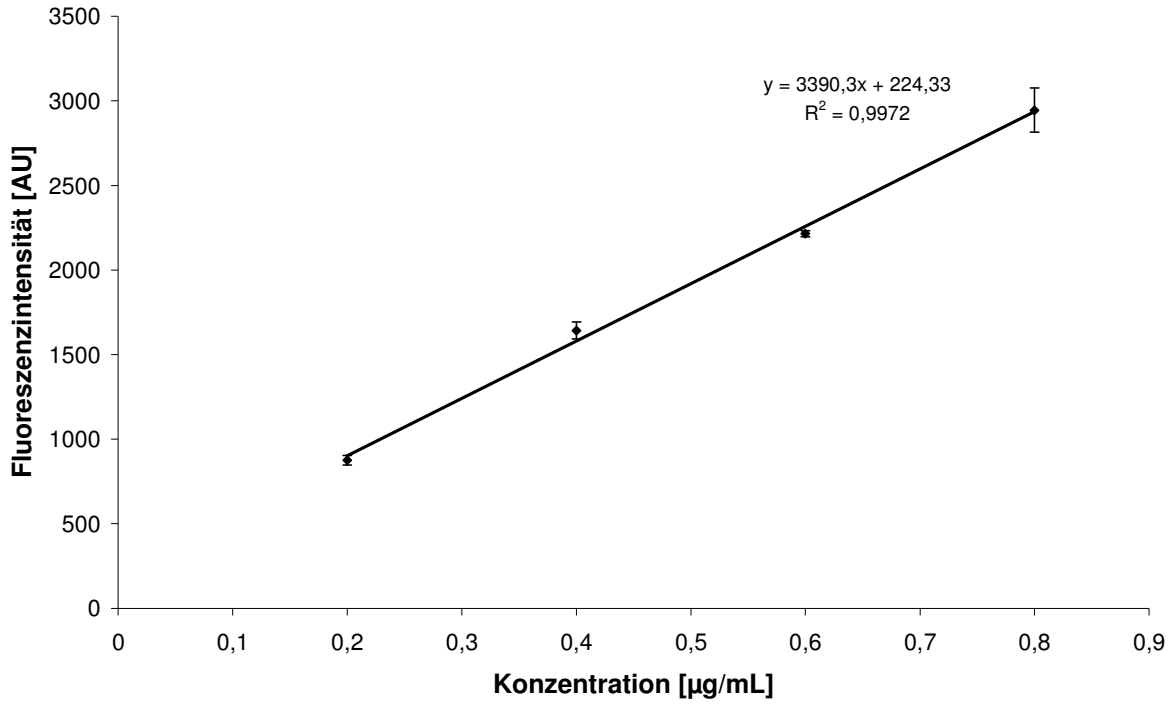


Abbildung 85: Eine der verwendeten Kalibriergeraden als Beispiel. Für jeden Tag wurde eine neue Kalibriergerade ermittelt.

3.3.5.1.1 Vergleich der Beschichtungen für in Aceton gequollene Schläuche

Die Schläuche wurden genauso vorbehandelt wie bei dem Freisetzungsexperiment, bei dem die Gehalte mit UV/Vis bestimmt wurden.

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden also alle für 3,5 Stunden in einer Mischung aus einem Teil Aceton und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen (0,5% Ethacridinlactat).

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, die Vermessung der Wirkstoffmengen entsprechend der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

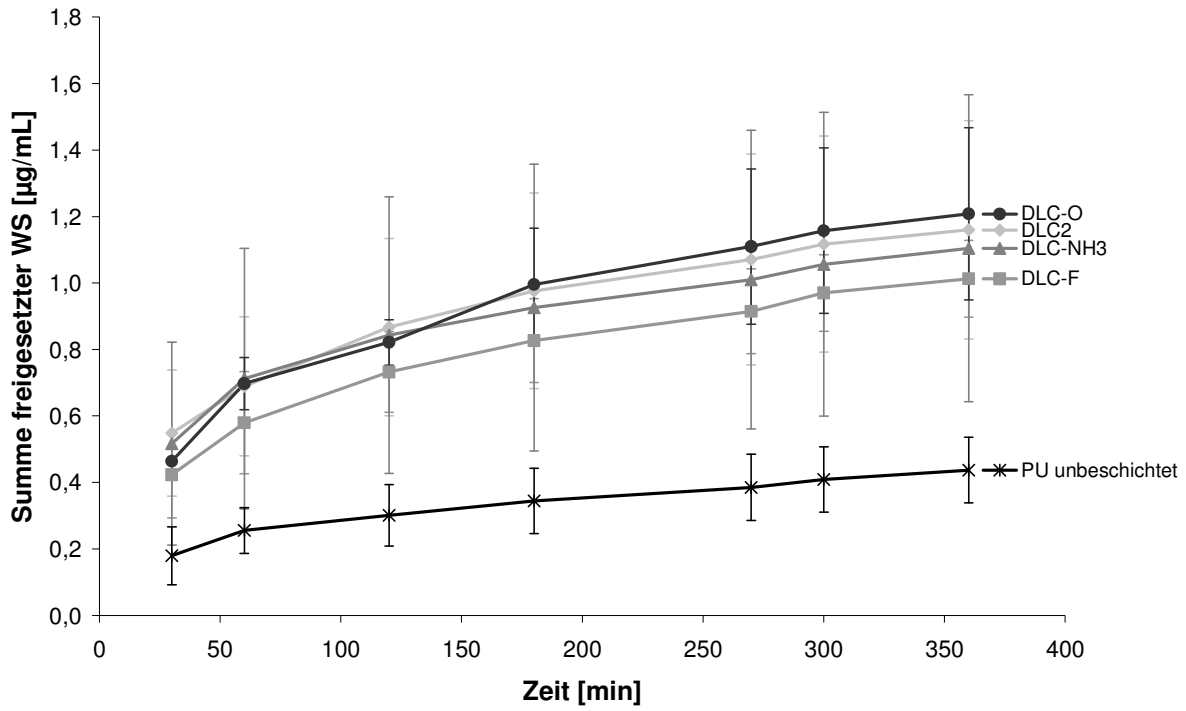


Abbildung 86: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Aceton-Lösung 0,5% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Dem Diagramm nach scheinen die vier Beschichtungen einander ebenbürtig zu sein, während die unbeschichteten Schläuche unterlegen scheinen. Die Schwankungen sind allerdings bei allen Messreihen sehr groß. Bei allen Messreihen bis auf „PU unbeschichtet“ waren ein bis zwei Messwerte am Anfang sehr hoch, so dass die gesamte Messreihe nach oben verschoben wurde. Die Messwerte der Reihe „PU unbeschichtet“ waren jedoch fast durchweg die

geringsten. Die hohen Messwerte bei den anderen Messreihen sind vermutlich nicht auf eine hohe initiale Freisetzung zurückzuführen, sondern eher darauf, dass beim Spülen nicht der gesamte anhaftende Wirkstoff entfernt werden konnte. Es kann Zufall sein, dass der Wirkstoff von den unbeschichteten Schläuchen besser abgewaschen wurde; vielleicht besteht aber auch tatsächlich ein Zusammenhang, der dann allerdings bei der UV/Vis-Messung nicht aufgefallen ist.

Was den Vergleich zur Messmethode der UV/Vis-Spektroskopie betrifft, so stellt man fest, dass mit der Fluorimetrie sehr viel höhere Freisetzungsmengen ermittelt werden. Bei der Gehaltsbestimmung mittels UV/Vis ergaben sich noch negative Gehalte; hier zeigt sich bei den unbeschichteten Schläuchen zu Beginn der Freisetzung eine Wirkstoffmenge von 0,2 µg/mL, nach 6 Stunden wurden insgesamt 0,45 µg/mL freigesetzt. Der Kurvenverlauf stellt sich ebenfalls völlig anders dar als bei den mit der UV/Vis-Spektroskopie vermessenen Proben. Dort verliefen die Kurven parallel zur Zeitachse, hier ist ein permanent ansteigender Verlauf zu erkennen, auch wenn dieser Anstieg weder sehr ausgeprägt ist noch konstant ist. Abgesehen von den unbeschichteten Schläuchen beträgt die geringste Menge am Anfang der Freisetzung 0,4 µg/mL bei den Schläuchen mit der DLC-F-Beschichtung, die höchste 0,55 g/mL bei den unfunktionalisierten DLC2-Schläuchen. Am Ende der Freisetzung nach 6 Stunden beträgt der höchste Wert 1,2 µg/mL bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen, der niedrigste 1,0 µg/mL bei der DLC-F-Beschichtung. Der Kurvenverlauf lässt sich möglicherweise ebenfalls auf das allmähliche Auswaschen zuvor nicht entfernter Wirkstoffkristalle zurückführen; vielleicht findet hier aber auch tatsächlich eine Freisetzung statt, auch wenn dies nach den bisherigen Messergebnissen mit UV/Vis-Spektroskopie nicht zu vermuten war.

Tabelle 22: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,404 n.s.	0,886 n.s.	0,519 n.s.	0,060 n.s.	0,663 n.s.	0,642 n.s.	0,062 n.s.	0,793 n.s.	0,189 n.s.	0,030 *
60	0,510 n.s.	0,934 n.s.	0,952 n.s.	0,058 n.s.	0,630 n.s.	0,323 n.s.	0,050 *	0,955 n.s.	0,178 n.s.	0,002 *
120	0,486 n.s.	0,938 n.s.	0,798 n.s.	0,054 n.s.	0,695 n.s.	0,343 n.s.	0,010 *	0,937 n.s.	0,147 n.s.	0,002 *
180	0,483 n.s.	0,876 n.s.	0,928 n.s.	0,053 n.s.	0,734 n.s.	0,244 n.s.	0,008 *	0,814 n.s.	0,138 n.s.	0,009 *
270	0,494 n.s.	0,858 n.s.	0,874 n.s.	0,054 n.s.	0,754 n.s.	0,291 n.s.	0,006 *	0,755 n.s.	0,132 n.s.	0,020 *
300	0,524 n.s.	0,861 n.s.	0,872 n.s.	0,053 n.s.	0,779 n.s.	0,327 n.s.	0,003 *	0,757 n.s.	0,128 n.s.	0,023 *
360	0,528 n.s.	0,875 n.s.	0,852 n.s.	0,053 n.s.	0,768 n.s.	0,326 n.s.	0,003 *	0,756 n.s.	0,124 n.s.	0,024 *

Bei den Vergleichen der unbeschichteten Schläuche mit den Schläuchen mit DLC-F-Beschichtung und DLC-O-Beschichtung ergaben sich fast durchweg signifikante

Unterschiede. Beim Vergleich mit den DLC2-beschichteten Schläuchen wird das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt; die Unterschiede zwischen den unbeschichteten Schläuchen und den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen waren mit p-Werten um die 0,15 etwas deutlicher nicht signifikant. Allerdings ist die Messreihe dieser aminofunktionalisierten Schläuche auch die Messreihe mit den höchsten Standardabweichungen, was die Empfindlichkeit des t-Tests abschwächt.

Beim Vergleich der anderen Beschichtungen miteinander ergaben sich mehr oder weniger deutlich keine signifikanten Unterschiede.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der geringen Freisetzung aus den unbeschichteten Schläuchen um einen Messzufall handelte, oder ob hier tatsächlich ein Zusammenhang bestehen konnte, wurde der Versuch wiederholt. Die Schläuche wurden diesmal besonders gründlich gespült, nämlich fünfmal mit je 1 mL Wasser bei 2500 rpm. Zu diesem Zeitpunkt waren keine Schläuche mit DLC-O-Beschichtung mehr vorhanden; stattdessen wurden Folienstücke mit der gleichen Materialdicke und einer Fläche von etwa $1\ \text{cm} \times 1\ \text{cm}$ verwendet, und zwar sowohl mit DLC-O-Beschichtung als auch mit DLC-NH3-Beschichtung. Da auch Schläuche mit DLC-NH3-Beschichtung untersucht wurden, konnte aus den Messreihen „DLC-NH3“, „DLC-NH3 (Folie)“ und „DLC-O (Folie)“durch Dreisatz ein theoretischer Wert für die Freisetzung aus DLC-O-beschichteten Schläuchen ermittelt werden.

Um Schwankungen der Messwerte aufgrund von Unterschieden in der Masse der Proben auszuschließen, wurden alle Proben ausgewogen und die freigesetzte Wirkstoffmenge durch Multiplikation mit einem aus dieser Masse ermittelten Faktor auf 20 mg normiert.

In der folgenden Abbildung 87: sind die tatsächlich gemessenen Freisetzungskurven dargestellt, Abbildung 88: enthält statt der Freisetzungskurven aus den Folien die theoretische Freisetzungskurve aus den DLC-O-beschichteten Schläuchen.

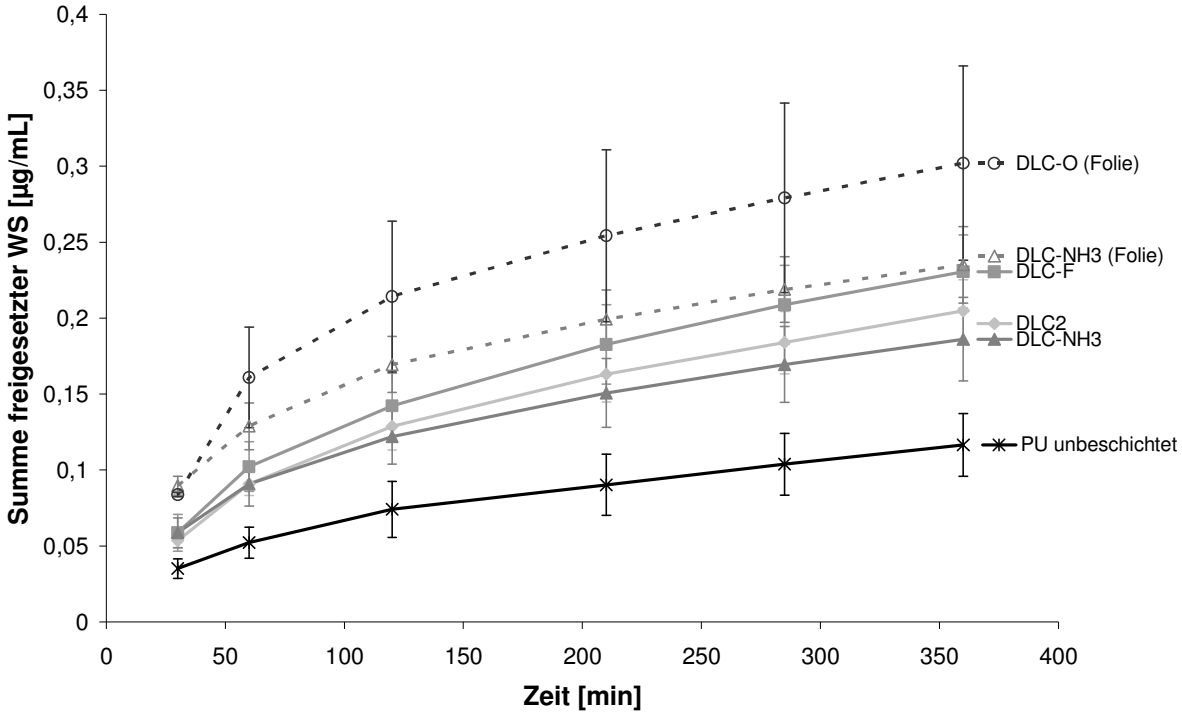


Abbildung 87: Wiederholung der Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten Schläuchen und Folien, sowie aus unbeschichteten Schläuchen, die jeweils 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Aceton 0,5% gequollen wurden.

Obwohl die ermittelten freigesetzten Wirkstoffmengen aller Proben rechnerisch auf ein Probengewicht von 20 mg normiert wurden, zeigten sich bei den beiden zu den Folien gehörenden Messkurven die höchsten freigesetzten Wirkstoffmengen. Anscheinend kann durch die offene Form der Probe der Wirkstoff besser freigesetzt werden.

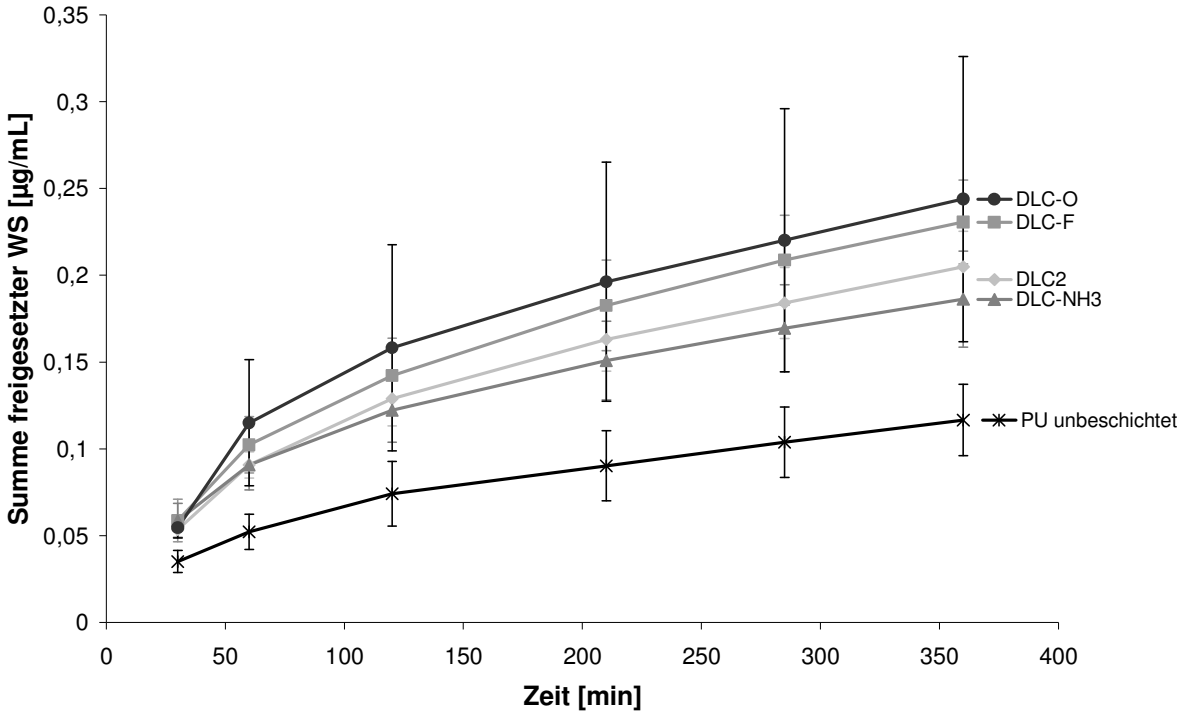


Abbildung 88: Wiederholung des Freisetzungsversuches aus unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Schläuchen, die 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Aceton 0,5% gequollen wurden. Die Messreihe „DLC-O“ wurde rechnerisch aus den in Abbildung 87 dargestellten Messungen bestimmt.

Durch Umrechnen der Freisetzungskurve von DLC-O-beschichteten Folien in die theoretische Freisetzungskurve aus DLC-O-beschichteten Schläuchen unter Heranziehen der Werte der DLC-NH3-beschichteten Schläuche und Folien erhält man tatsächlich eine Freisetzungskurve, die im Bereich der anderen Beschichtungen liegt.

Auch bei der Wiederholung des Versuches zeigten sich bei den unbeschichteten Schläuchen die deutlich geringsten Freisetzungsmengen. Möglicherweise kann Aceton die Beschichtungen besser benetzen als das unbeschichtete Polyurethan, so dass in die beschichteten Schläuche tatsächlich etwas mehr Wirkstoff eingebracht werden kann.

Tabelle 23: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,736 n.s.	0,740 n.s.	0,015 *	0,009 *	0,905 n.s.	0,125 n.s.	0,056 n.s.	0,044 *	0,014 *	0,007 *
60	0,526 n.s.	0,524 n.s.	0,093 n.s.	0,005 *	0,332 n.s.	0,111 n.s.	0,015 *	0,072 n.s.	0,010 *	0,025 *
120	0,638 n.s.	0,299 n.s.	0,136 n.s.	0,011 *	0,232 n.s.	0,167 n.s.	0,014 *	0,096 n.s.	0,023 *	0,031 *
210	0,540 n.s.	0,200 n.s.	0,164 n.s.	0,006 *	0,149 n.s.	0,229 n.s.	0,009 *	0,100 n.s.	0,016 *	0,030 *
295	0,431 n.s.	0,186 n.s.	0,185 n.s.	0,005 *	0,096 n.s.	0,283 n.s.	0,006 *	0,108 n.s.	0,013 *	0,034 *
360	0,411 n.s.	0,138 n.s.	0,196 n.s.	0,004 *	0,066 n.s.	0,296 n.s.	0,003 *	0,103 n.s.	0,013 *	0,032 *

Der t-Test zeigt signifikante Unterschiede beim Vergleich der unbeschichteten Schläuche mit allen beschichteten Schläuchen.

Beim Vergleich der Beschichtungen miteinander ergaben sich nur bei zwei einzelnen Messpunkten signifikante Abweichungen, so dass man hier von einer Gleichwertigkeit der Beschichtungen ausgehen kann.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass durch die Messung mit der Fluoreszenzspektroskopie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen eine Unterlegenheit der unbeschichteten Schläuche festgestellt wurde, die bei den Messungen mit der UV/Vis-Spektroskopie nicht aufgefallen war.

3.3.5.1.2 Vergleich der Beschichtungen für in Dioxan gequollene Schläuche

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für eine Stunde in einer Mischung aus neun Teilen Dioxan und einem Teil wässriger Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen. Die resultierende Ethacridinlactat-Konzentration betrug also 0,1%.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, die Vermessung der Wirkstoffmengen entsprechend der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

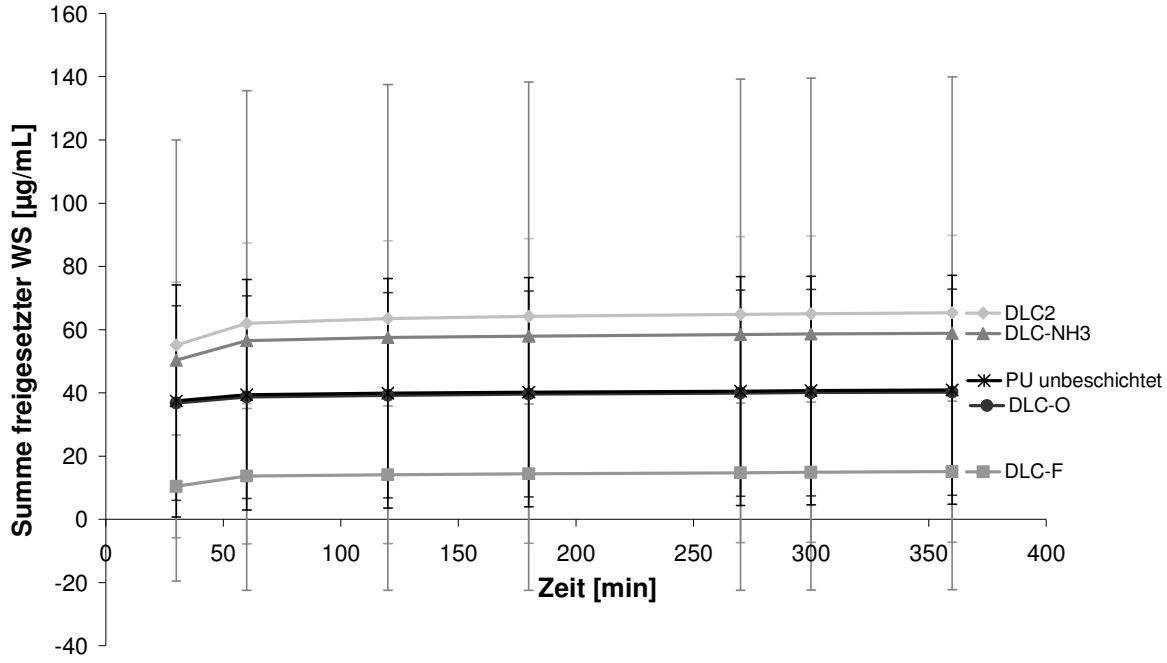


Abbildung 89: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Dioxan-Lösung 0,1% für 1 Stunde gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Es sieht so aus, als wäre schon nach 30 Minuten war der größte Teil des Wirkstoffes freigesetzt worden, ab 60 Minuten steigen die Kurven kaum noch an. Die Kurven liegen alle relativ weit auseinander und die Standardabweichungen sind sehr hoch, und auch die ermittelten Wirkstoffmengen liegen mit 15 bis 65 µg/mL deutlich höher als die mit der UV/Vis-Spektroskopie ermittelten Werte von bis zu 9,5 µg/mL.

Alle diese Mängel haben dieselbe Ursache: Einige der Schläuche enthielten noch Rückstände von Ethacridinlactat, die beim Spülen nicht entfernt worden waren. Bei den DLC-F-beschichteten Schläuchen war dies am wenigsten ausgeprägt, bei den Schläuchen mit DLC2-Beschichtung und DLC-NH3-Beschichtung am stärksten.

Tabelle 24: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,035 *	0,467 n.s.	0,256 n.s.	0,164 n.s.	0,241 n.s.	0,217 n.s.	0,203 n.s.	0,366 n.s.	0,418 n.s.	0,490 n.s.
60	0,058 n.s.	0,467 n.s.	0,218 n.s.	0,078 n.s.	0,255 n.s.	0,251 n.s.	0,225 n.s.	0,345 n.s.	0,401 n.s.	0,488 n.s.
120	0,055 n.s.	0,464 n.s.	0,209 n.s.	0,073 n.s.	0,255 n.s.	0,253 n.s.	0,225 n.s.	0,345 n.s.	0,399 n.s.	0,490 n.s.
180	0,055 n.s.	0,462 n.s.	0,205 n.s.	0,070 n.s.	0,256 n.s.	0,254 n.s.	0,226 n.s.	0,345 n.s.	0,399 n.s.	0,490 n.s.
270	0,054 n.s.	0,462 n.s.	0,203 n.s.	0,068 n.s.	0,256 n.s.	0,254 n.s.	0,225 n.s.	0,345 n.s.	0,399 n.s.	0,490 n.s.
300	0,054 n.s.	0,462 n.s.	0,202 n.s.	0,067 n.s.	0,256 n.s.	0,255 n.s.	0,225 n.s.	0,345 n.s.	0,399 n.s.	0,489 n.s.
360	0,055 n.s.	0,462 n.s.	0,202 n.s.	0,067 n.s.	0,256 n.s.	0,255 n.s.	0,225 n.s.	0,345 n.s.	0,399 n.s.	0,489 n.s.

Der t-Test findet bei keinem Vergleich signifikante Unterschiede zwischen den Beschichtungen, außer beim Vergleich der DLC2-Beschichtung mit der DLC-F-Beschichtung bei 30 Minuten. Dies liegt offensichtlich an den hohen Standardabweichungen; das erzielte Ergebnis ist so aber nicht akzeptabel. Daher wurde auch die Freisetzung aus in Dioxan gequollenen Schläuchen mit fluorimetrischer Gehaltsbestimmung wiederholt.

Analog der Versuchswiederholung in Abschnitt 3.3.5.1.1 wurde auch hier die Spültechnik variiert und die Messreihe „DLC-O-beschichtete Schläuche" rechnerisch aus den Messreihen „DLC-O-beschichtete Folien", „DLC-NH3-beschichtete Folien" und „DLC-NH3-beschichtete Schläuche" durch Dreisatz bestimmt.

Die erste Abbildung 90 zeigt die tatsächlich gemessenen Freisetzungen, Abbildung 91 enthält die rechnerisch ermittelte theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche anstelle der beschichteten Polyurethan-Folien:

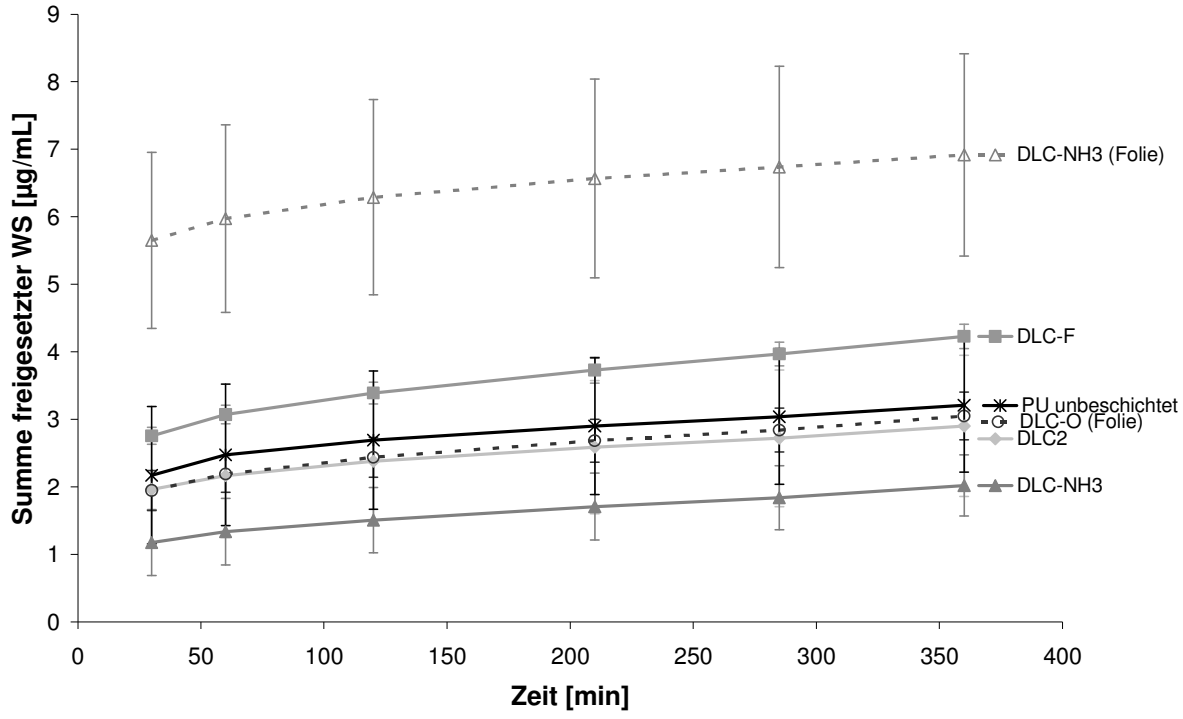


Abbildung 90: Wiederholung der Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten Schläuchen und Folien, sowie aus unbeschichteten Schläuchen, die jeweils 1 Stunde in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollen wurden.

Die im Wiederholungsversuch ermittelten Freisetzungsmengen liegen deutlich niedriger als beim ersten Versuch (bis zu 65 µg/mL). Die geringste Freisetzung zeigten die DLC-NH3-beschichteten Schläuche mit 2 µg/mL nach 6 Stunden, die höchste die DLC-NH3-beschichteten Folien mit 7 µg/mL. Das zeigt schon, dass die Unterschiede hier nicht der Beschichtung zuzuschreiben sind.

Die Schläuche mit der höchsten Freisetzung sind hier die DLC-F-beschichteten (4,25 µg/mL), also diejenigen Schläuche, die im ersten Versuch die geringste Freisetzung zeigten.

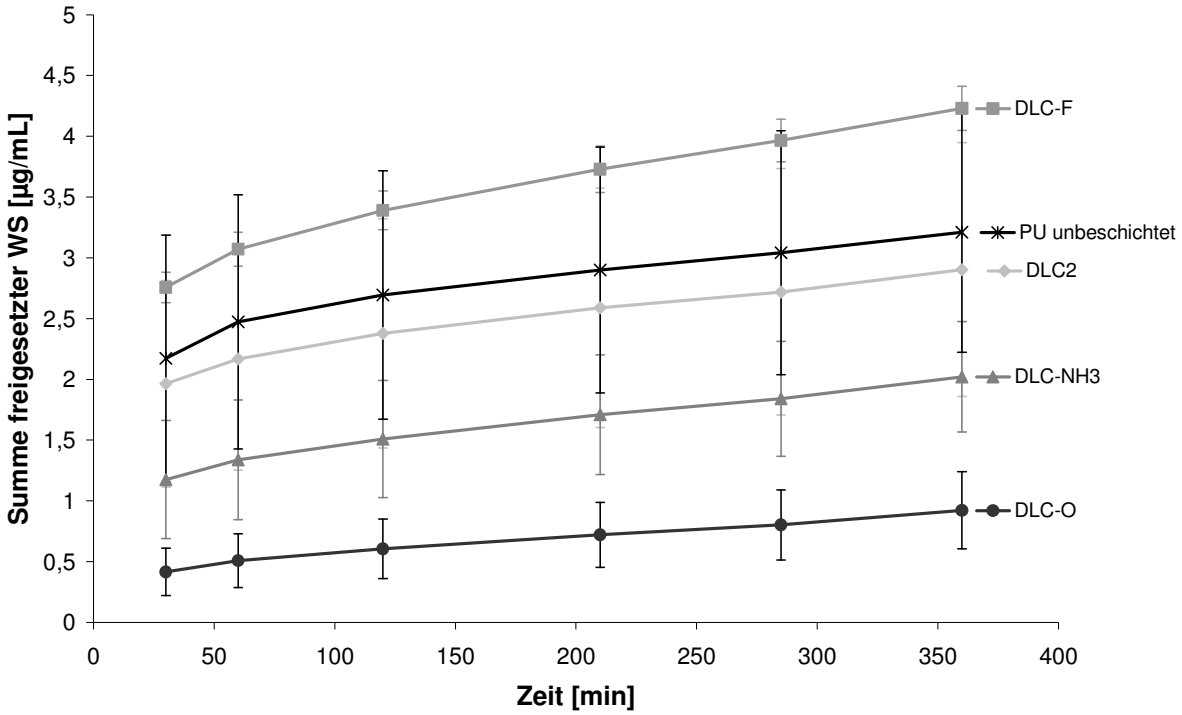


Abbildung 91: Wiederholung des Freisetzungsversuches aus unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Schläuchen, die 1 Stunde in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollen wurden. Die Messreihe „DLC-O" wurde rechnerisch aus den in Abbildung 90 dargestellten Messungen bestimmt.

Die theoretisch berechnete Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche zeigt dann insgesamt mit 1 µg/mL die niedrigste Freisetzung, was nicht überraschend ist, da sie durch Multiplikation einer mittleren Messreihe („DLC-O-beschichtete Folien") mit der niedrigsten Messreihe („DLC-NH3-beschichtete Schläuche") und Division durch die höchste Messreihe („DLC-NH3-beschichtete Folien") erhalten wurde.

Tabelle 25: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,246 n.s.	0,252 n.s.	0,080 n.s.	0,799 n.s.	0,024 *	0,000 *	0,424 n.s.	0,099 n.s.	0,227 n.s.	0,091 n.s.
60	0,227 n.s.	0,259 n.s.	0,081 n.s.	0,722 n.s.	0,020 *	0,000 *	0,426 n.s.	0,083 n.s.	0,193 n.s.	0,077 n.s.
120	0,202 n.s.	0,251 n.s.	0,075 n.s.	0,714 n.s.	0,014 *	0,000 *	0,360 n.s.	0,064 n.s.	0,172 n.s.	0,064 n.s.
210	0,179 n.s.	0,263 n.s.	0,073 n.s.	0,722 n.s.	0,011 *	0,000 *	0,290 n.s.	0,054 n.s.	0,167 n.s.	0,057 n.s.
285	0,164 n.s.	0,271 n.s.	0,072 n.s.	0,716 n.s.	0,009 *	0,000 *	0,250 n.s.	0,041 *	0,162 n.s.	0,052 n.s.
360	0,155 n.s.	0,280 n.s.	0,071 n.s.	0,731 n.s.	0,007 *	0,000 *	0,213 n.s.	0,031 *	0,161 n.s.	0,046 *

Signifikante Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der höchsten Messkurve „DLC-F" mit den beiden niedrigsten Messkurven „DLC-NH3" und „DLC-O". Da letztere nur eine theoretische Messreihe ist, sollten signifikante Unterschiede, die sich in Vergleichen mit diesen Proben ergeben, nicht zu stark bewertet werden.

Bisher gab es keinerlei Hinweise darauf, dass die DLC-NH3-Beschichtung bei in Dioxan gequollenen Schläuchen schlechtere Freisetzungseigenschaften zeigen könnte als die anderen Beschichtungen. Man könnte dieses Ergebnis zur Kenntnis nehmen und abwarten, ob es sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen bestätigt. Da sich jedoch bei der ersten Versuchsdurchführung der Sachverhalt genau umgekehrt darstellte, nämlich die DLC-NH3-beschichteten Schläuche die höchste Freisetzung aufwiesen und die DLC-F-beschichteten die niedrigste, dürfte das schlechte Abschneiden der DLC-NH3-beschichteten Schläuche Zufall sein. Außerdem zeigten die gleichermaßen beschichteten Folien im Wiederholungsversuch die höchste Freisetzung von allen Proben.

Den Abschnitt zusammenfassend, kann also festgestellt werden, dass auch mit der Fluoreszenzspektroskopie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beschichtungen festgestellt wurden, wenn das Material in Ethacridinlactat-haltigem Dioxan gequollen wurde.

3.3.5.1.3 Vergleich der Beschichtungen für in Ethanol gequollene Schläuche

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, die Vermessung der Wirkstoffmengen entsprechend der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

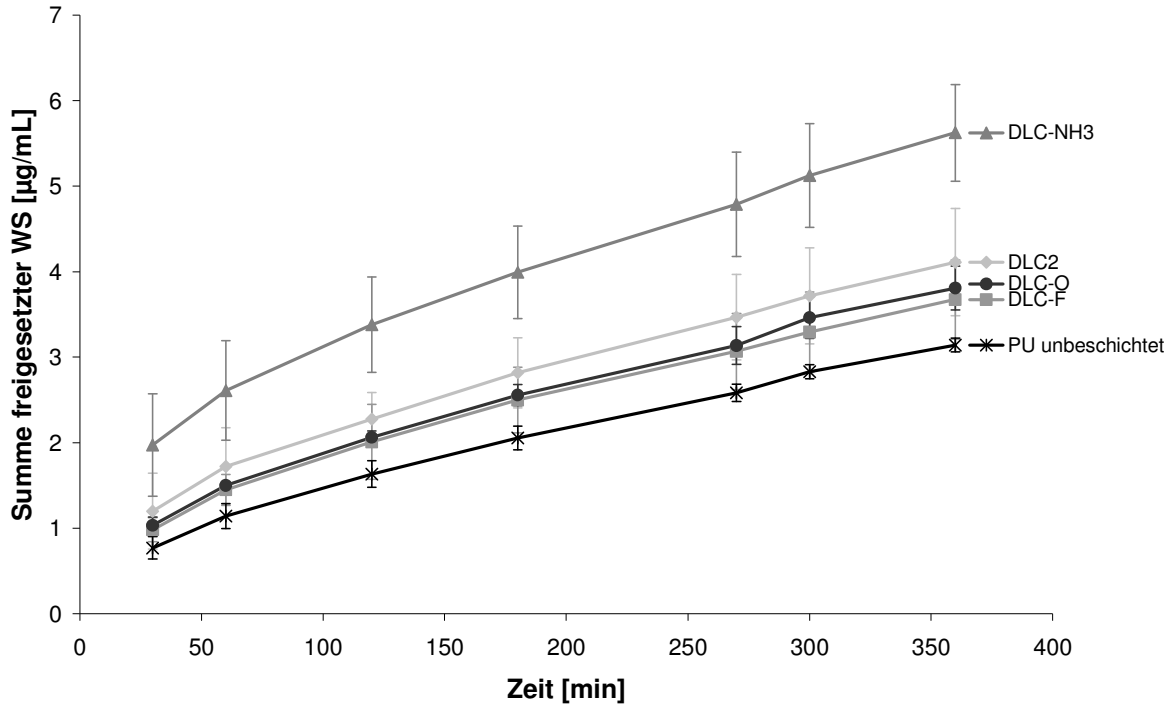


Abbildung 92: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Ethanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Vom Verlauf her ähneln die Freisetzungskurven denen, die mit der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt wurden: alle Kurven verlaufen weitgehend linear.

Auch untereinander unterscheiden sich die Kurven anscheinend nur wenig. Allerdings weicht die Messreihe „DLC-NH3“ um etwa 1-2 µg/mL nach oben von den drei mittleren Messkurven ab, die Messreihe „PU unbeschichtet“ am Ende um etwa 0,5 µg/mL nach unten. Die anderen drei Messkurven aber verlaufen fast identisch. Nach 30 Minuten ist etwa 1 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, nach 6 Stunden insgesamt ungefähr 3 µg/mL.

Mit der UV/Vis-Spektroskopie wurde nach 6 Stunden eine freigesetzte Wirkstoffmenge von 1-2 µg/mL bestimmt.

Die Standardabweichungen sind bei allen Messungen relativ gering, die höchste liegt bei etwa 0,5 µg/mL.

Tabelle 26: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,492 n.s.	0,153 n.s.	0,589 n.s.	0,231 n.s.	0,097 n.s.	0,628 n.s.	0,130 n.s.	0,110 n.s.	0,068 n.s.	0,054 n.s.
60	0,417 n.s.	0,110 n.s.	0,491 n.s.	0,149 n.s.	0,064 n.s.	0,673 n.s.	0,084 n.s.	0,080 n.s.	0,042 *	0,039 *
120	0,442 n.s.	0,055 n.s.	0,354 n.s.	0,050 n.s.	0,031 *	0,856 n.s.	0,272 n.s.	0,053 n.s.	0,026 *	0,024 *
180	0,380 n.s.	0,044 *	0,385 n.s.	0,071 n.s.	0,021 *	0,826 n.s.	0,174 n.s.	0,038 *	0,020 *	0,010 *
270	0,359 n.s.	0,046 *	0,377 n.s.	0,086 n.s.	0,020 *	0,825 n.s.	0,195 n.s.	0,031 *	0,022 *	0,032 *
300	0,376 n.s.	0,042 *	0,530 n.s.	0,109 n.s.	0,016 *	0,618 n.s.	0,226 n.s.	0,028 *	0,021 *	0,035 *
360	0,391 n.s.	0,037 *	0,504 n.s.	0,114 n.s.	0,011 *	0,688 n.s.	0,182 n.s.	0,018 *	0,015 *	0,037 *

Die niedrigen Standardabweichungen sind auch der Grund dafür, dass der t-Test signifikante Abweichungen für die Messreihe „DLC-NH3" von den anderen Messreihen anzeigt. Auch zwischen den unbeschichteten Schläuchen und den DLC-O-beschichteten Schläuchen wurden signifikante Unterschiede nachgewiesen.

Bei der Bestimmung mit UV/Vis-Spektroskopie wurden mit dem t-Test keine Unterschiede zwischen den Beschichtungen festgestellt. Dass mit einer empfindlicheren Methode solche Unterschiede gefunden werden konnten, führte zu der Entscheidung, auch den Versuch der Freisetzung aus in Ethanol gequollenen Schläuchen noch einmal zu wiederholen.

Analog der Versuchswiederholung in den Abschnitten 3.3.5.1.1 und 3.3.5.1.2 wurde auch hier die Spültechnik variiert und die Messreihe „DLC-O-beschichtete Schläuche" rechnerisch aus den Messreihen „DLC-O-beschichtete Folien", „DLC-NH3-beschichtete Folien" und „DLC-NH3-beschichtete Schläuche" durch Dreisatz bestimmt.

Die erste Abbildung 93 zeigt die tatsächlich gemessenen Freisetzungen, Abbildung 94 enthält die rechnerisch ermittelte theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche anstelle der beschichteten Polyurethan-Folien:

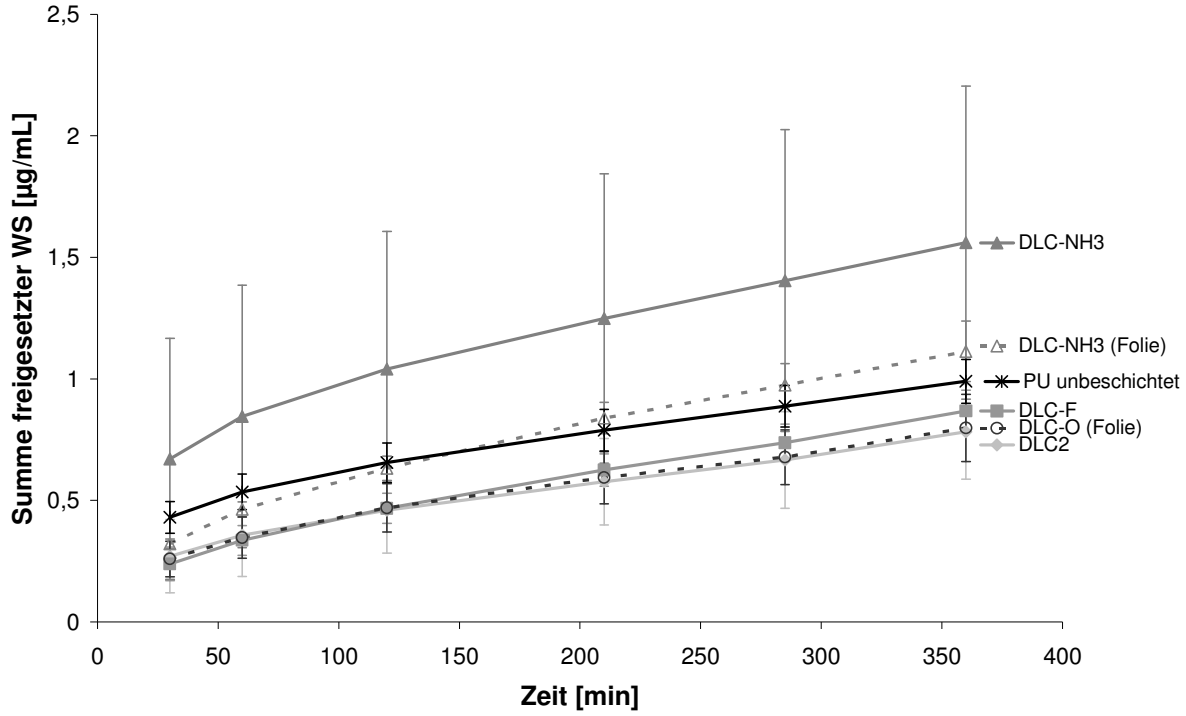


Abbildung 93: Wiederholung der Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten Schläuchen und Folien, sowie aus unbeschichteten Schläuchen, die jeweils 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen wurden.

Auch bei der Wiederholung des Versuches weisen die DLC-NH3-beschichteten Schläuche mit 1,5 µg/mL die höchste Freisetzung auf. Die niedrigste Freisetzung zeigte sich bei den Schläuchen mit DLC2-beschichteten Schläuchen (0,8 µg/mL). Die Freisetzung aus den Folien war bei diesem Versuch im Gegensatz zu der Freisetzung aus den in Aceton gequollenen Folien (Abschnitt 3.3.5.1.1) nicht erhöht.

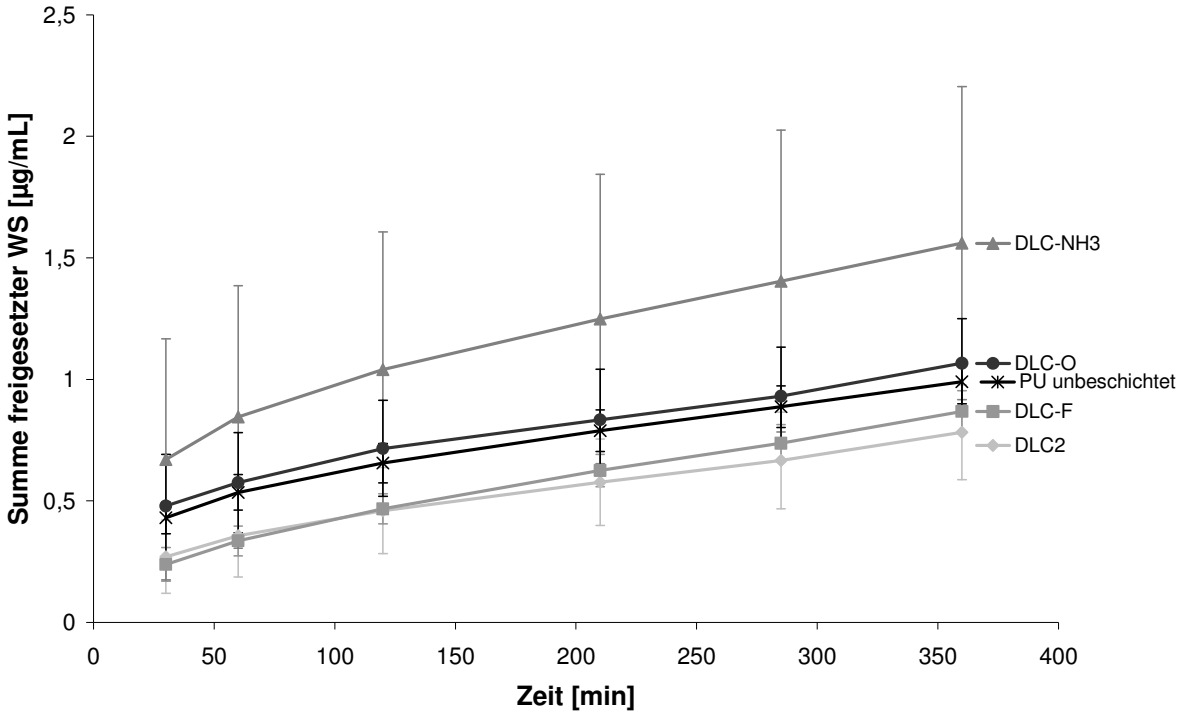


Abbildung 94: Wiederholung des Freisetzungsversuches aus unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Schläuchen, die 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen wurden. Die Messreihe „DLC-O“ wurde rechnerisch aus den in Abbildung 90 dargestellten Messungen bestimmt.

Die theoretische Messkurve der DLC-O-beschichteten Schläuche gliedert sich gut in die Messkurven der anderen Beschichtungen ein.

Tabelle 27: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“, „*“ für „signifikant“.

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,761 n.s.	0,295 n.s.	0,246 n.s.	0,200 n.s.	0,269 n.s.	0,181 n.s.	0,025 *	0,585 n.s.	0,490 n.s.	0,737 n.s.
60	0,851 n.s.	0,254 n.s.	0,233 n.s.	0,205 n.s.	0,242 n.s.	0,174 n.s.	0,023 *	0,486 n.s.	0,424 n.s.	0,776 n.s.
120	0,953 n.s.	0,212 n.s.	0,171 n.s.	0,188 n.s.	0,221 n.s.	0,152 n.s.	0,036 *	0,431 n.s.	0,360 n.s.	0,660 n.s.
210	0,693 n.s.	0,182 n.s.	0,179 n.s.	0,162 n.s.	0,210 n.s.	0,217 n.s.	0,062 n.s.	0,353 n.s.	0,312 n.s.	0,754 n.s.
285	0,611 n.s.	0,167 n.s.	0,182 n.s.	0,184 n.s.	0,202 n.s.	0,234 n.s.	0,087 n.s.	0,316 n.s.	0,285 n.s.	0,760 n.s.
360	0,539 n.s.	0,163 n.s.	0,139 n.s.	0,198 n.s.	0,202 n.s.	0,192 n.s.	0,166 n.s.	0,314 n.s.	0,263 n.s.	0,563 n.s.

Obwohl in Abbildung 93 und Abbildung 94 die Freisetzung aus den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen deutlich erhöht zu sein scheint, werden durch den t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen dieser und den anderen Beschichtungen bestätigt.

Dagegen werden Unterschiede zwischen den unbeschichteten und den DLC-F-beschichteten Schläuchen zu den ersten drei Messzeitpunkten gefunden. Auch bei den letzten drei Messzeitpunkten entfernen sich die p-Werte nicht weit vom Signifikanzniveau 0,05. Im ersten

Versuch war jedoch die Freisetzung aus den DLC-F-beschichteten Schläuchen höher als aus den unbeschichteten Schläuchen, also genau umgekehrt wie bei der Wiederholung des Versuches. Daher besteht vermutlich trotzdem kein Unterschied bezüglich der Freisetzungseigenschaften zwischen den Schläuchen.

3.3.5.1.4 Vergleich der Beschichtungen für in Methanol gequollene Schläuche

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer methanolischen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, die Vermessung der Wirkstoffmengen entsprechend der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

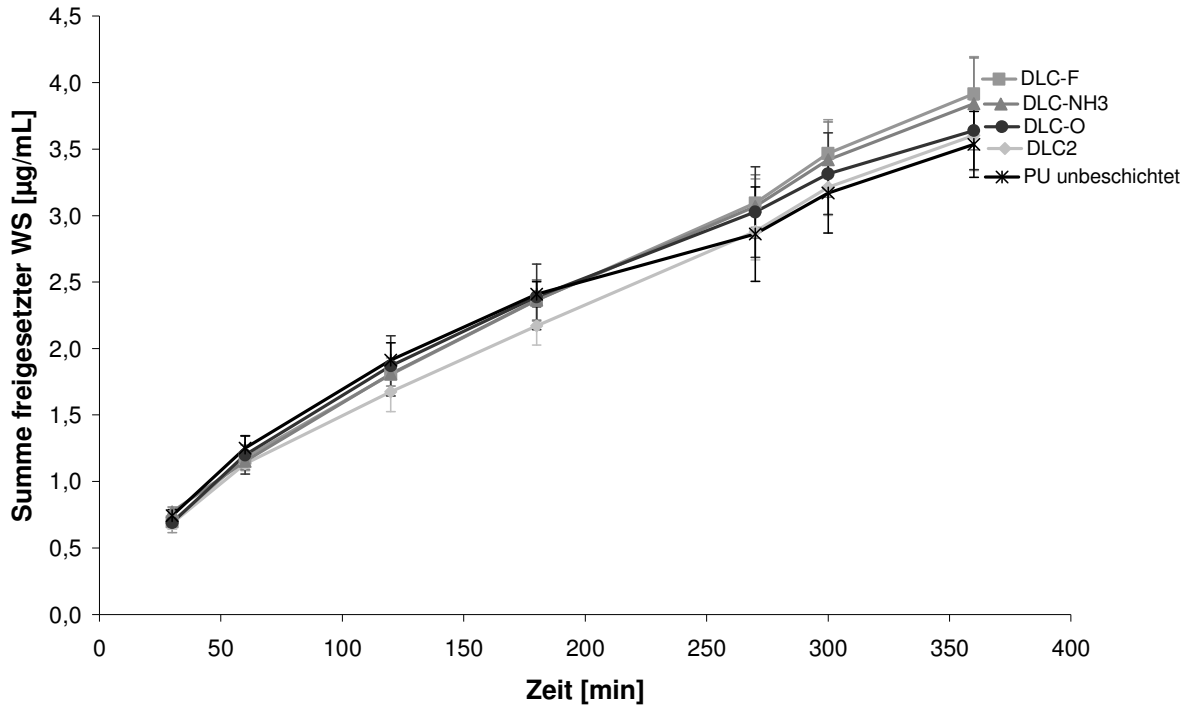


Abbildung 95: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Methanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Die fünf Messkurven verlaufen praktisch übereinander, so dass hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den Beschichtungen zu vermuten ist. Alle Kurven verlaufen linear steigend, was sich mit den Beobachtungen aus der UV/Vis-Bestimmung deckt.

Die Steigung der Kurven unterscheidet sich jedoch. Bei der UV/Vis-Bestimmung lag der erste bestimmte Wert nach 15 Minuten bei -2 bis 1 µg/mL, nach 6 Stunden waren 2-6 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden. Hier liegt der niedrigste Wert nach 30 Minuten bei 0,7-0,8 µg/mL, nach 6 Stunden wurde insgesamt eine freigesetzte Wirkstoffmenge von 3,5-4 µg/mL erreicht. Die Steilheit der Geraden ist also hier geringer.

Tabelle 28: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,838 n.s.	0,058 n.s.	0,854 n.s.	0,192 n.s.	0,259 n.s.	0,908 n.s.	0,469 n.s.	0,044 *	0,448 n.s.	0,187 n.s.
60	0,513 n.s.	0,666 n.s.	0,505 n.s.	0,136 n.s.	0,723 n.s.	0,835 n.s.	0,391 n.s.	0,638 n.s.	0,202 n.s.	0,637 n.s.
120	0,312 n.s.	0,270 n.s.	0,292 n.s.	0,109 n.s.	0,969 n.s.	0,693 n.s.	0,361 n.s.	0,699 n.s.	0,330 n.s.	0,795 n.s.
180	0,194 n.s.	0,183 n.s.	0,274 n.s.	0,087 n.s.	0,988 n.s.	0,887 n.s.	0,690 n.s.	0,895 n.s.	0,695 n.s.	0,905 n.s.
270	0,264 n.s.	0,372 n.s.	0,574 n.s.	0,931 n.s.	0,890 n.s.	0,779 n.s.	0,383 n.s.	0,869 n.s.	0,451 n.s.	0,589 n.s.
300	0,259 n.s.	0,373 n.s.	0,671 n.s.	0,848 n.s.	0,843 n.s.	0,543 n.s.	0,264 n.s.	0,680 n.s.	0,353 n.s.	0,594 n.s.
360	0,232 n.s.	0,401 n.s.	0,880 n.s.	0,764 n.s.	0,783 n.s.	0,303 n.s.	0,154 n.s.	0,487 n.s.	0,289 n.s.	0,664 n.s.

Auch der t-Test findet keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beschichtungen. Der p-Wert von 0,044 beim Vergleich der Messpunkte „DLC-NH3" und „DLC-O" bei 30 Minuten ist wahrscheinlich ein Resultat der ausgesprochen geringen Standardabweichungen in diesem Versuch. (Die höchste liegt bei 0,35 µg/mL.)

Der Sachverhalt bei den in Methanol gequollenen Schläuchen stellt sich zwar recht klar dar, da jedoch der Versuch für die anderen Lösungsmittel wiederholt wurde, wurde auch der Freisetzungsversuch aus in Methanol gequollenen Schläuchen erneut durchgeführt.

Die Spültechnik wurde auch hier variiert und die Messreihe „DLC-O-beschichtete Schläuche" rechnerisch aus den Messreihen „DLC-O-beschichtete Folien", „DLC-NH3-beschichtete Folien" und „DLC-NH3-beschichtete Schläuche" durch Dreisatz bestimmt.

Die erste Abbildung 96 zeigt die tatsächlich gemessenen Freisetzungen, Abbildung 97 enthält die rechnerisch ermittelte theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche anstelle der beschichteten Polyurethan-Folien:

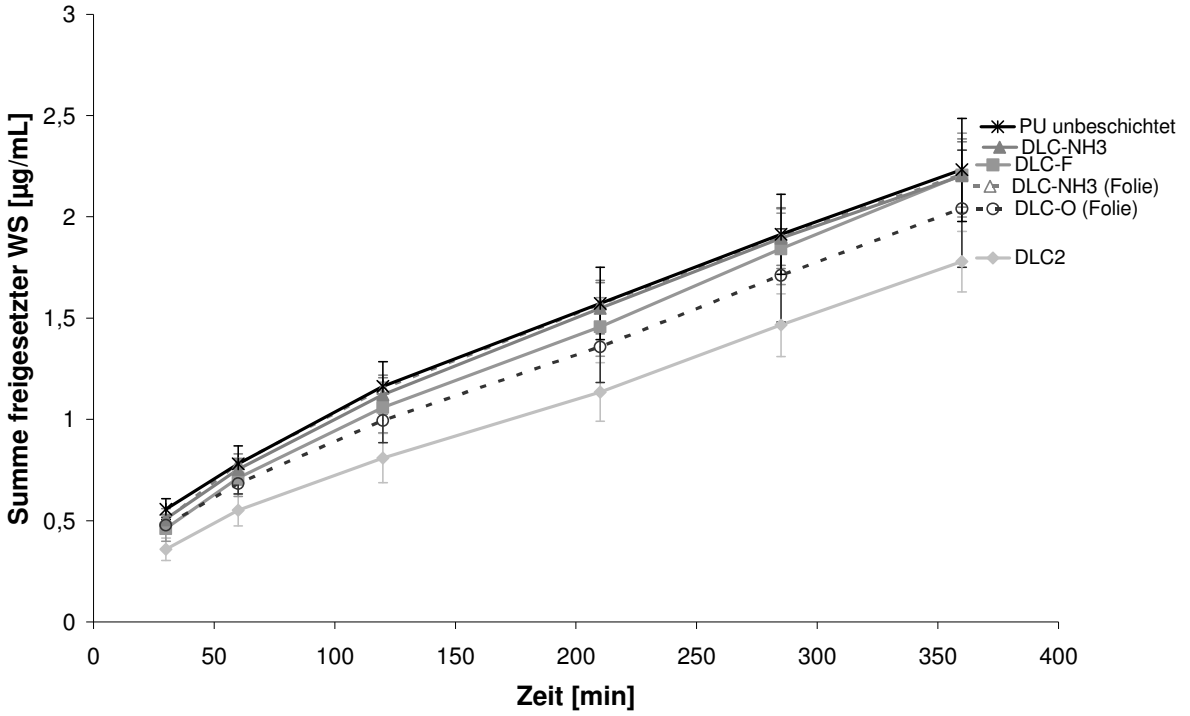


Abbildung 96: Wiederholung der Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten Schläuchen und Folien, sowie aus unbeschichteten Schläuchen, die jeweils 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Methanol 1% gequollen wurden.

Auch beim Wiederholungsversuch verlaufen die meisten Messkurven übereinander, nur die Schläuche mit der DLC2-Beschichtung zeigen eine etwas geringere Freisetzung als die anderen Schläuche. Nach 6 Stunden waren hier nur 1,8 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, während bei den anderen Proben nach 6 Stunden zwischen 2 µg/mL (Folien) und 2,2 µg/mL (Schläuche) Ethacridinlactat freigesetzt worden waren.

Im Vergleich zu der ersten Messung waren die freigesetzten Wirkstoffmengen also deutlich geringer, nämlich etwa nur halb so hoch. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies auf das gründlichere Spülen zurückzuführen ist. Möglicherweise lässt sich der Unterschied aber auch darauf zurückführen, dass die Proben für den Wiederholungsversuch vor der Verwendung länger gelagert worden waren.

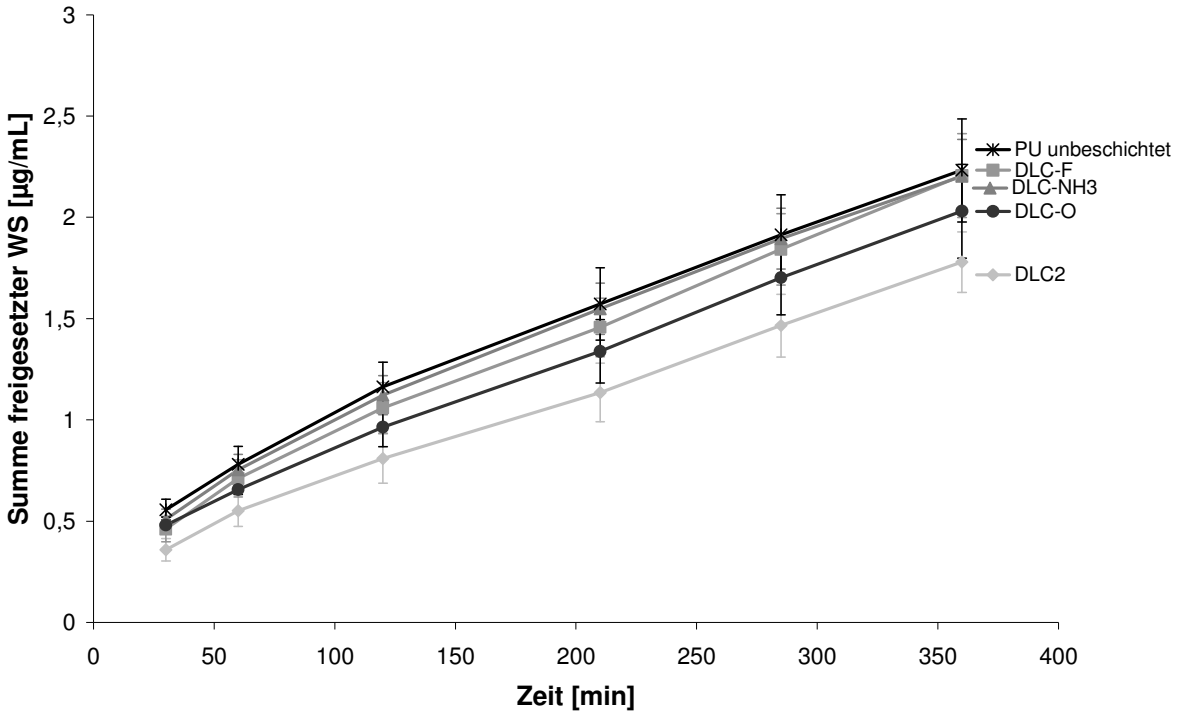


Abbildung 97: Wiederholung des Freisetzungsversuches aus unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Schläuchen, die 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Methanol 1% gequollen wurden. Die Messreihe „DLC-O" wurde rechnerisch aus den in Abbildung 96 dargestellten Messungen bestimmt.

Die theoretische Messreihe „DLC-O" passt sich gut in die anderen Messkurven ein: sie liegt zwischen der Messreihe „DLC2" und den anderen Kurven. Nach 6 Stunden wurden theoretisch 2 µg/mL Wirkstoff freigesetzt.

Tabelle 29: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,104 n.s.	0,026 *	0,042 *	0,011 *	0,358 n.s.	0,666 n.s.	0,110 n.s.	0,486 n.s.	0,309 n.s.	0,113 n.s.
60	0,086 n.s.	0,033 *	0,139 n.s.	0,027 *	0,572 n.s.	0,405 n.s.	0,387 n.s.	0,149 n.s.	0,697 n.s.	0,119 n.s.
120	0,069 n.s.	0,028 *	0,164 n.s.	0,024 *	0,532 n.s.	0,366 n.s.	0,358 n.s.	0,119 n.s.	0,665 n.s.	0,095 n.s.
210	0,053 n.s.	0,021 *	0,174 n.s.	0,032 *	0,453 n.s.	0,393 n.s.	0,436 n.s.	0,149 n.s.	0,865 n.s.	0,166 n.s.
285	0,051 n.s.	0,026 *	0,164 n.s.	0,040 *	0,711 n.s.	0,396 n.s.	0,665 n.s.	0,234 n.s.	0,904 n.s.	0,247 n.s.
360	0,049 *	0,038 *	0,202 n.s.	0,070 n.s.	0,987 n.s.	0,383 n.s.	0,898 n.s.	0,370 n.s.	0,882 n.s.	0,367 n.s.

Der t-Test zeigt beim Vergleich der DLC2-Beschichtung mit den unbeschichteten und den DL-NH3-beschichteten Schläuchen signifikante Unterschiede an. Beim Vergleich mit der DLC-F-Beschichtung und der DLC-O-Beschichtung sind die Unterschiede zwar nicht signifikant, verfehlen aber das Signifikanzniveau v.a. beim Vergleich mit der DLC-F-Beschichtung nur relativ knapp.

Bei den anderen Vergleichen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, allerdings sind die p-Werte auch hier oft nicht besonders hoch.

Die Gründe für die Unterschiede oder die nicht so deutliche Gleichartigkeiten liegt natürlich einerseits in den niedrigen Werten bei der Freisetzung aus den DLC2-beschichteten Schläuchen, andererseits aber auch in den niedrigen Standardabweichungen der Messreihen.

Da im ersten Versuch kein Hinweis auf eine Unterlegenheit der DLC2-Beschichtung hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften zu erkennen war, kann weiter davon ausgegangen werden, dass die Beschichtungen einander ebenbürtig sind.

3.3.5.1.5 Vergleich der Beschichtungen für in Wasser gequollene Schläuche

Die Schläuche mit den vier Beschichtungen DLC2, DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O, sowie die unbeschichteten Schläuche („PU“) wurden alle für 3,5 Stunden in einer wässrigen Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen.

Danach wurden die Schläuche zunächst getrocknet, später mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, die Vermessung der Wirkstoffmengen entsprechend der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode.

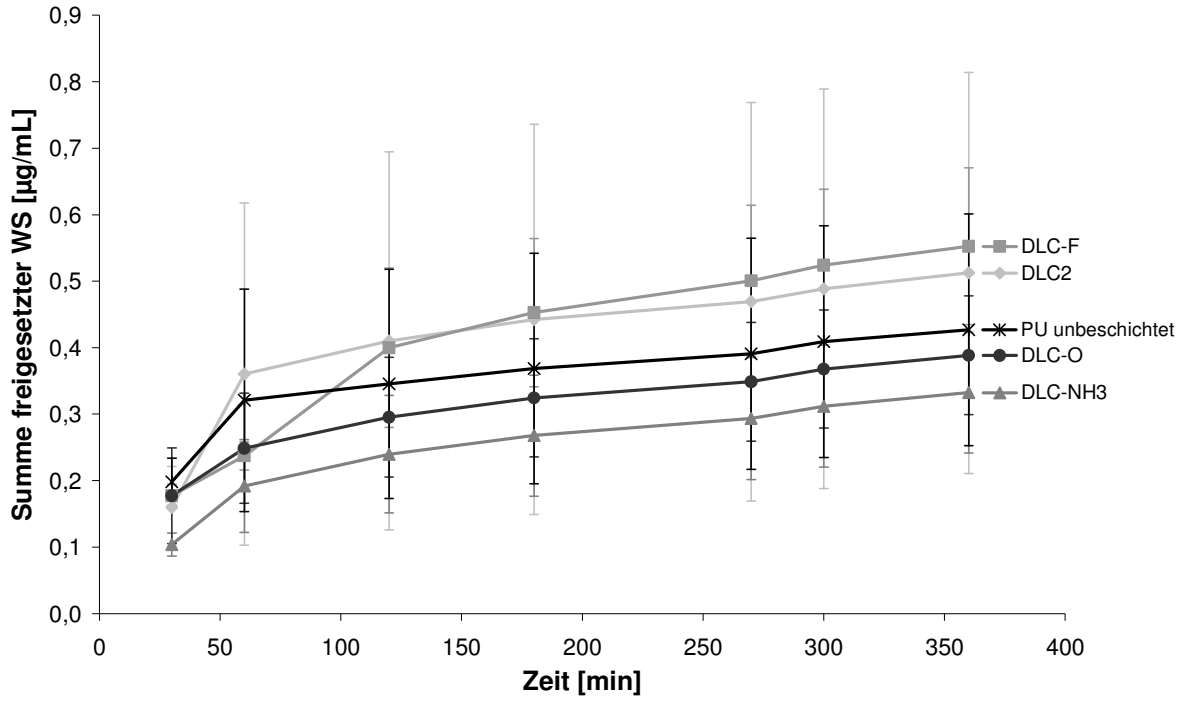


Abbildung 98: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Wasser-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Anders als bei der Bestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie ist hier keine Stagnation der Freisetzungskurven zu erkennen. Ähnlich wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen erkennt man am Anfang einen stärkeren Anstieg der Kurven, die dann zunehmend flacher werden.

Die freigesetzten Wirkstoffmengen schwanken zwischen 0,1 und 0,2 µg/mL nach 30 Minuten Freisetzung, und zwischen 0,3 und 0,6 µg/mL nach 6 Stunden. Wegen der Skalierung wirken die Standardabweichungen relativ hoch; die höchste liegt aber nur bei 0,3 g/mL (Messreihe

„DLC2“), die der Messreihe „PU unbeschichtet“ betragen bis zu 0,17 µg/mL, bei den anderen Messreihen liegen sie um 0,1 µg/mL.

Ebenfalls auf die Skalierung zurückzuführen ist, dass die Messreihen aussehen, als wären sie deutlich voneinander getrennt. Die Abstände betragen aber kaum mehr als 0,2 µg/mL. Bei einer anderen Skalierung könnte man die Messkurven nicht besser unterscheiden als die der in Methanol gequollenen Schläuche aus dem vorangehenden Abschnitt 3.3.5.1.4. Die Beschichtungen scheinen also wieder gleichwertig zu sein, was die Freisetzungseigenschaften betrifft.

Tabelle 30: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“, „*“ für „signifikant“.

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,675 n.s.	0,255 n.s.	0,762 n.s.	0,412 n.s.	0,007 *	0,998 n.s.	0,426 n.s.	0,214 n.s.	0,027 *	0,682 n.s.
60	0,495 n.s.	0,376 n.s.	0,538 n.s.	0,837 n.s.	0,380 n.s.	0,835 n.s.	0,478 n.s.	0,417 n.s.	0,316 n.s.	0,553 n.s.
120	0,957 n.s.	0,411 n.s.	0,563 n.s.	0,757 n.s.	0,142 n.s.	0,298 n.s.	0,681 n.s.	0,488 n.s.	0,414 n.s.	0,684 n.s.
180	0,959 n.s.	0,413 n.s.	0,564 n.s.	0,731 n.s.	0,092 n.s.	0,197 n.s.	0,525 n.s.	0,482 n.s.	0,436 n.s.	0,720 n.s.
270	0,876 n.s.	0,420 n.s.	0,565 n.s.	0,721 n.s.	0,072 n.s.	0,146 n.s.	0,419 n.s.	0,495 n.s.	0,452 n.s.	0,734 n.s.
300	0,862 n.s.	0,419 n.s.	0,564 n.s.	0,716 n.s.	0,069 n.s.	0,139 n.s.	0,401 n.s.	0,491 n.s.	0,456 n.s.	0,740 n.s.
360	0,846 n.s.	0,412 n.s.	0,557 n.s.	0,698 n.s.	0,067 n.s.	0,133 n.s.	0,367 n.s.	0,486 n.s.	0,464 n.s.	0,756 n.s.

Der t-Test zeigt, dass Unterschiede zwischen den Beschichtungen auch statistisch nicht zu erkennen sind. Die signifikanten Unterschiede, die sich beim Vergleich der Messreihe „DLC-NH3“ mit den Messreihen „DLC-F“ und „PU“ beim Messpunkt von 30 Minuten ergeben, sind zu vernachlässigen, auch wenn zwischen den beiden am weitesten voneinander entfernt verlaufenden Messreihen „DLC-F“ und „DLC-NH3“ auch die anderen p-Werte nicht sehr hoch sind.

Zur Sicherheit wurde aber auch hier der Versuch noch einmal wiederholt.

Die Spültechnik wurde auch hier variiert und die Messreihe „DLC-O-beschichtete Schläuche“ rechnerisch aus den Messreihen „DLC-O-beschichtete Folien“, „DLC-NH3-beschichtete Folien“ und „DLC-NH3-beschichtete Schläuche“ durch Dreisatz bestimmt.

Die erste Abbildung 99 zeigt die tatsächlich gemessenen Freisetzungen, Abbildung 100 enthält die rechnerisch ermittelte theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche anstelle der beschichteten Polyurethan-Folien:

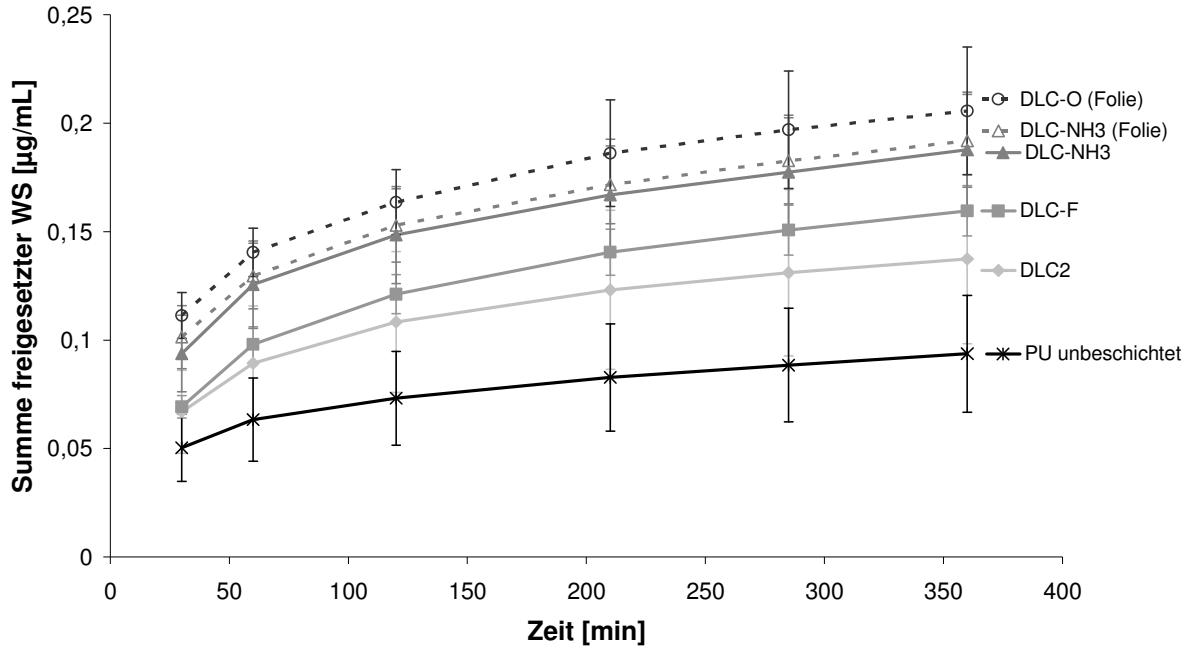


Abbildung 99: Wiederholung der Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten Schläuchen und Folien, sowie aus unbeschichteten Schläuchen, die jeweils 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Wasser 1% gequollen wurden.

Wie bei den in Aceton gequollenen Schläuchen zeigt sich auch hier die höchste Freisetzung bei den beschichteten Folien (0,2 µg/mL nach 6 Stunden). Von den Schläuchen zeigen die mit der DLC-NH3-Beschichtung die höchste Freisetzung (ebenfalls gerundet 0,2 µg/mL nach 6 Stunden), aus den unbeschichteten Schläuchen ergibt sich die niedrigste Messkurve (0,1 µg/mL nach 6 Stunden).

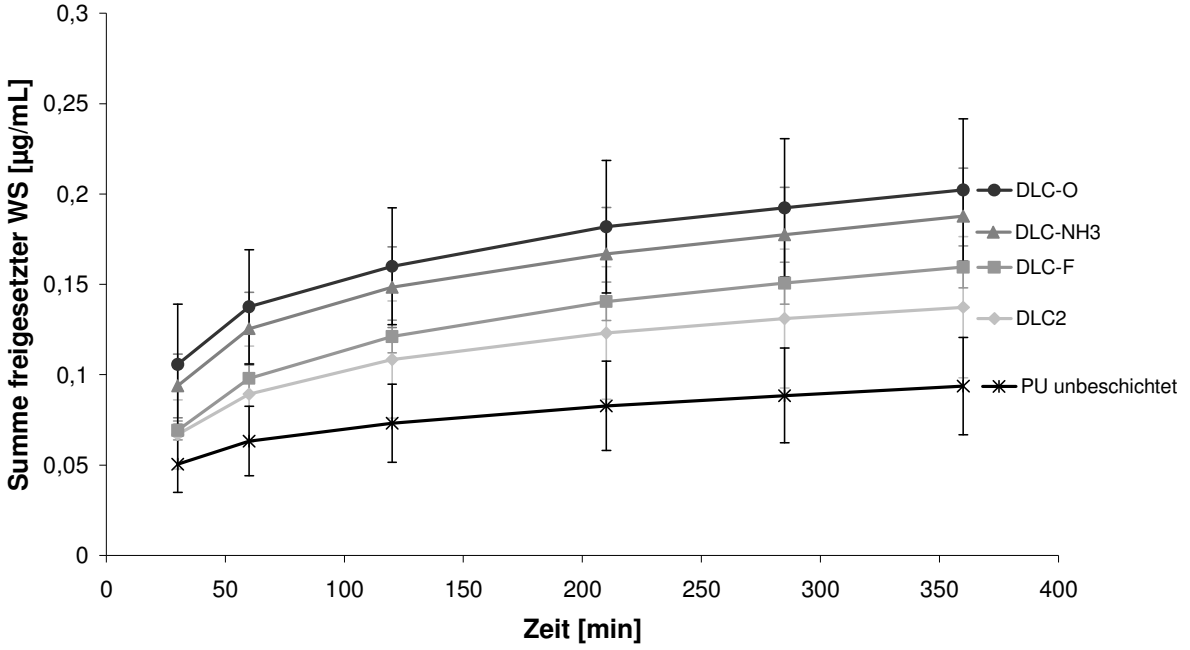


Abbildung 100: Wiederholung des Freisetzungsversuches aus unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Schläuchen, die 3,5 Stunden in Ethacridinlactat/Methanol 1% gequollen wurden. Die Messreihe „DLC-O" wurde rechnerisch aus den in Abbildung 99 dargestellten Messungen bestimmt.

Die theoretische Messreihe „DLC-O" verläuft von allen am höchsten. Nach 6 Stunden wurden hier 0,2 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt.

Tabelle 31: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
30	0,858 n.s.	0,148 n.s.	0,173 n.s.	0,313 n.s.	0,127 n.s.	0,196 n.s.	0,162 n.s.	0,622 n.s.	0,034 *	0,085 n.s.
60	0,632 n.s.	0,137 n.s.	0,115 n.s.	0,247 n.s.	0,128 n.s.	0,156 n.s.	0,072 n.s.	0,611 n.s.	0,018 *	0,035 *
120	0,570 n.s.	0,161 n.s.	0,122 n.s.	0,203 n.s.	0,157 n.s.	0,165 n.s.	0,046 *	0,639 n.s.	0,014 *	0,023 *
210	0,500 n.s.	0,174 n.s.	0,121 n.s.	0,199 n.s.	0,210 n.s.	0,183 n.s.	0,040 *	0,596 n.s.	0,015 *	0,023 *
285	0,474 n.s.	0,168 n.s.	0,122 n.s.	0,197 n.s.	0,211 n.s.	0,193 n.s.	0,038 *	0,613 n.s.	0,014 *	0,022 *
360	0,431 n.s.	0,148 n.s.	0,113 n.s.	0,194 n.s.	0,202 n.s.	0,196 n.s.	0,036 *	0,630 n.s.	0,013 *	0,022 *

Der t-Test zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich der unbeschichteten Schläuche mit einigen der beschichteten Schläuche (DLC-F, DLC-NH3 und DLC-O) an. Es handelt sich hier um die Messreihen, die am weitesten voneinander entfernt sind. Durch die erneut sehr geringen Standardabweichungen hat der t-Test einen Unterschied gefunden. Im ersten Versuch ist aber keine Unterlegenheit der unbeschichteten Schläuche aufgefallen.

Der Vergleich Messreihen DLC-F und DLC-NH3, bei denen der t-Test im ersten Versuch das Signifikanzniveau nur knapp verfehlte, fällt hier nicht besonders auf. Zwar sind die p-Werte wieder sehr niedrig, das ist jedoch auch bei den meisten anderen Vergleichen der Fall.

Vermutlich besteht also zwischen unterschiedlich beschichteten Schläuchen, die in Wasser gequollen wurden, kein Unterschied hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften.

3.3.5.1.6 Vergleich der Lösungsmittel

Um die Lösungsmittel miteinander zu vergleichen, wurde für jedes Lösungsmittel der Mittelwert aller in den Abschnitten 3.3.5.1.1 bis 3.3.5.1.5 vorgestellten Ergebnisse gebildet:

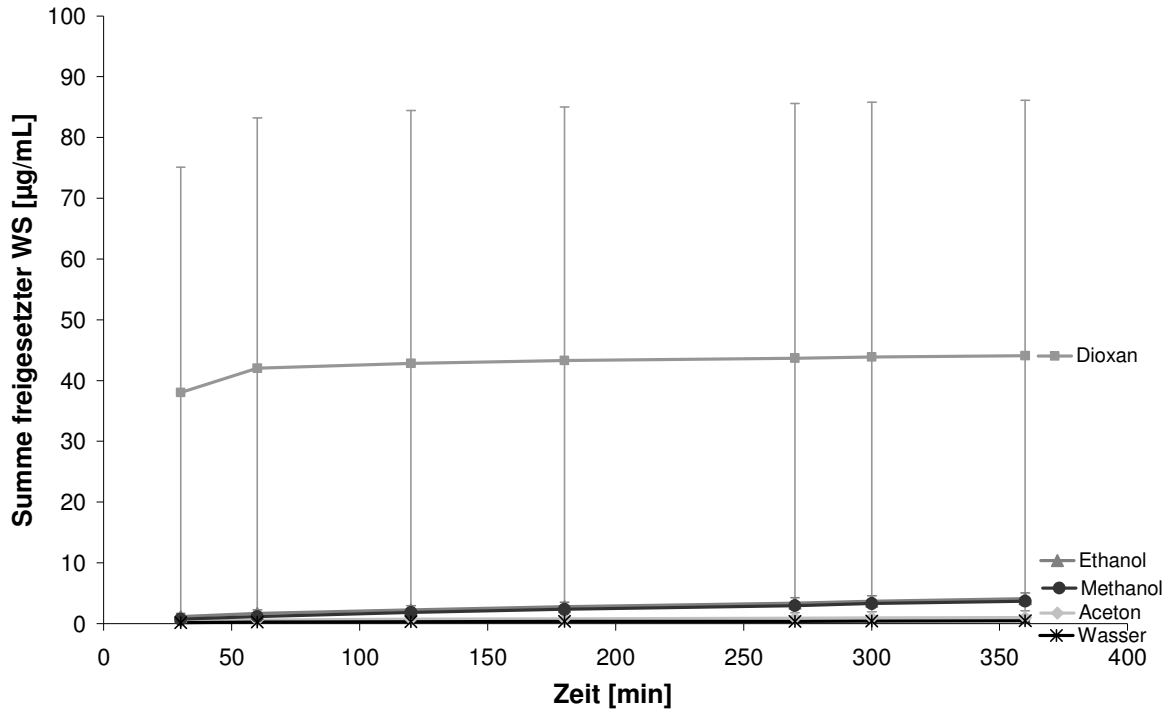


Abbildung 101: Freisetzungskurven für die fünf verwendeten Quellmittel. Es wurde der Mittelwert aus allen Messungen aus dem Vergleich der Beschichtungen gebildet.

Bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen waren nach 6 Stunden 44 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, davon in den ersten 60 Minuten bereits 42 µg/mL. Anfangs steigt die Kurve also extrem stark an, im späteren Verlauf wirkt es dadurch, als würde sie stagnieren. Tatsächlich werden jedoch in den letzten 5 Stunden noch 2 µg/mL Wirkstoff freigesetzt. Das entspricht einer Freisetzungsrate von 1,6 µg/(mL·h) unter der Annahme, dass die Freisetzung in den letzten 5 Stunden linear verläuft.

Wie bereits in Abschnitt 3.3.5.1.2 erwähnt, steht diese Wirkstoffmenge in einem deutlichen Widerspruch zu den mit UV/Vis-Spektroskopie erzielten Ergebnissen (Abschnitte 3.3.1.2 und 3.3.3.2). Der Grund ist, dass beim Spülen Wirkstoffreste nicht vollständig entfernt wurden.

Da die Skalierung durch die hohe Freisetzung der in Dioxan gequollenen Schläuche für die Freisetzungen aus den in den anderen Lösungsmittel gequollenen Schläuche ungeeignet ist, sind in der folgenden nur die in Aceton, Ethanol, Methanol und Wasser gequollenen Proben dargestellt:

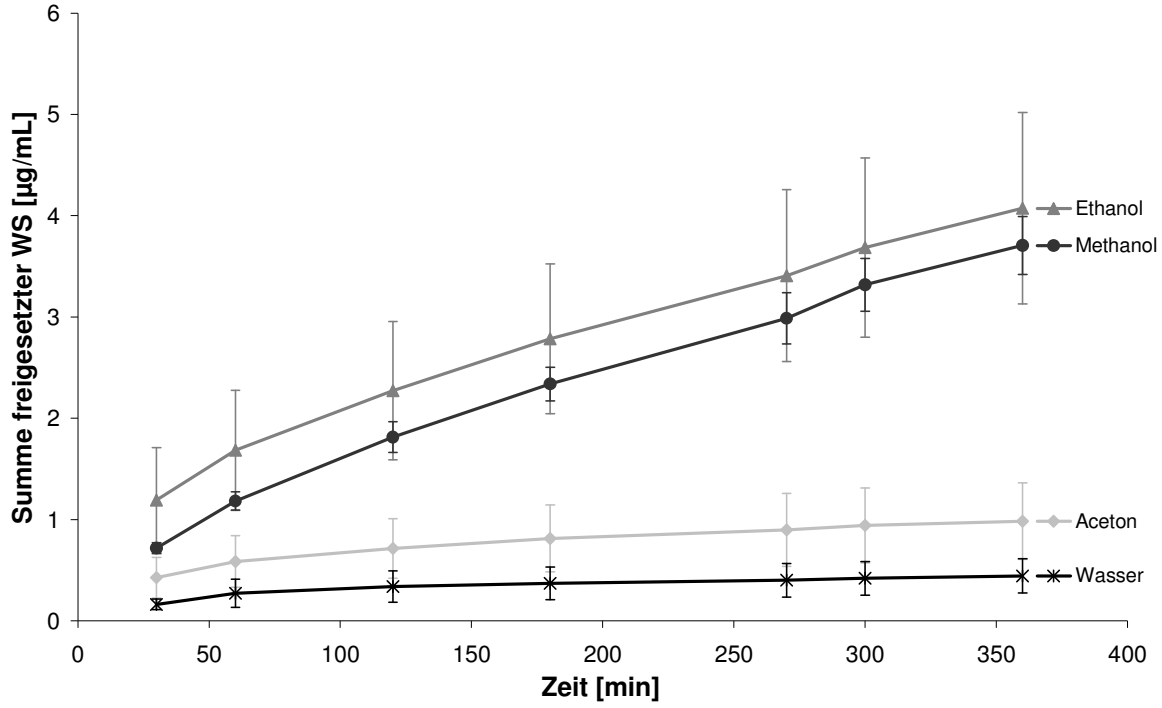


Abbildung 102: Gegenüberstellung der vier Quellmittel Aceton, Ethanol, Methanol und Wasser. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die in Dioxan gequollenen Schläuche nicht dargestellt.

Nach Entfernung der Messreihe „Dioxan“ erkennt man deutlich den gleichmäßig linearen Verlauf der Freisetzungskurven der in Ethanol bzw. Methanol gequollenen Schläuche.

Bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen wurden nach 6 Stunden 4,1 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt, nach 30 Minuten waren es 1,2 µg/mL. Das ergibt eine Freisetzungsrate von 0,53 µg/(mL·h).

Bei Methanol waren nach 30 Minuten 0,7 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, nach 6 Stunden 3,7 µg/mL. Daraus ergibt sich eine Freisetzungsrate von 0,55 µg/(mL·h).

Bei den in Aceton gequollenen Schläuchen wurde nach 30 Minuten eine freigesetzte Wirkstoffmenge von 0,4 µg/mL gemessen, nach 6 Stunden war es 1 µg/mL. Daraus ergibt

sich eine Freisetzungsrate von 0,11 µg/(mL·h). Allerdings erscheint der Kurvenverlauf nicht linear, sondern eher stagnierend zu sein.

Bei den in Wasser gequollenen Schläuchen sieht der Kurvenverlauf ähnlich aus, allerdings ist das Niveau noch etwas niedriger als bei den in Aceton gequollenen Schläuchen. Nach 30 Minuten wurden 0,15 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt, nach 6 Stunden 0,45 µg/mL. Das entspricht einer Freisetzungsrate von 0,05 µg/(mL·h).

Tabelle 32: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Quellmittel miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Lösungsmittel dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	Aceton und Dioxan	Aceton und Ethanol	Aceton und Methanol	Aceton und Wasser	Dioxan und Ethanol	Dioxan und Methanol	Dioxan und Wasser	Ethanol und Methanol	Ethanol und Wasser	Methanol und Wasser
30	0,002 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,003 *	0,000 *	0,000 *
60	0,002 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,002 *	0,006 *	0,000 *	0,000 *
120	0,002 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,022 *	0,000 *	0,000 *
180	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,038 *	0,000 *	0,000 *
270	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,083 n.s.	0,000 *	0,000 *
300	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,141 n.s.	0,000 *	0,000 *
360	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,002 *	0,001 *	0,170 n.s.	0,000 *	0,000 *

Der t-Test zeigt nun signifikante Unterschiede zwischen allen Messreihen an, außer beim Vergleich der Quellmittel Ethanol und Methanol, wo zu den letzten drei Messzeitpunkten kein Unterschied nachgewiesen werden konnte. Allerdings war auch hier die Nichtsignifikanz nicht sehr ausgeprägt, so dass die Gefahr, einen β-Fehler zu begehen, relativ hoch ist. Zudem sind bei vier von sieben Messpunkten signifikante Unterschiede aufgetreten.

Somit ist zu vermuten, dass durch die empfindlichere Messmethode der Fluoreszenzspektroskopie zwar keine Unterschiede zwischen den Beschichtungen aufgedeckt werden konnten, wohl aber Unterschiede zwischen den verschiedenen Quellmitteln, die nach der Bestimmung mit UV/Vis-Spektroskopie noch als absolut gleichwertig eingestuft worden waren.

Da die Messergebnisse dafür vorhanden sind, sollen auch die Ergebnisse der Versuchswiederholung zu einer Gegenüberstellung der Lösungsmittel herangezogen werden. Sinnvoll ist dies insbesondere deshalb, weil die in Dioxan gespülten Schläuche zuvor offenbar nicht akkurat genug gespült worden waren.

Der Mittelwert wurde aus den Freisetzungskurven der Schläuche ermittelt, die Freisetzung aus den Folien ist also nicht mit eingeflossen, dafür aber die theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche.

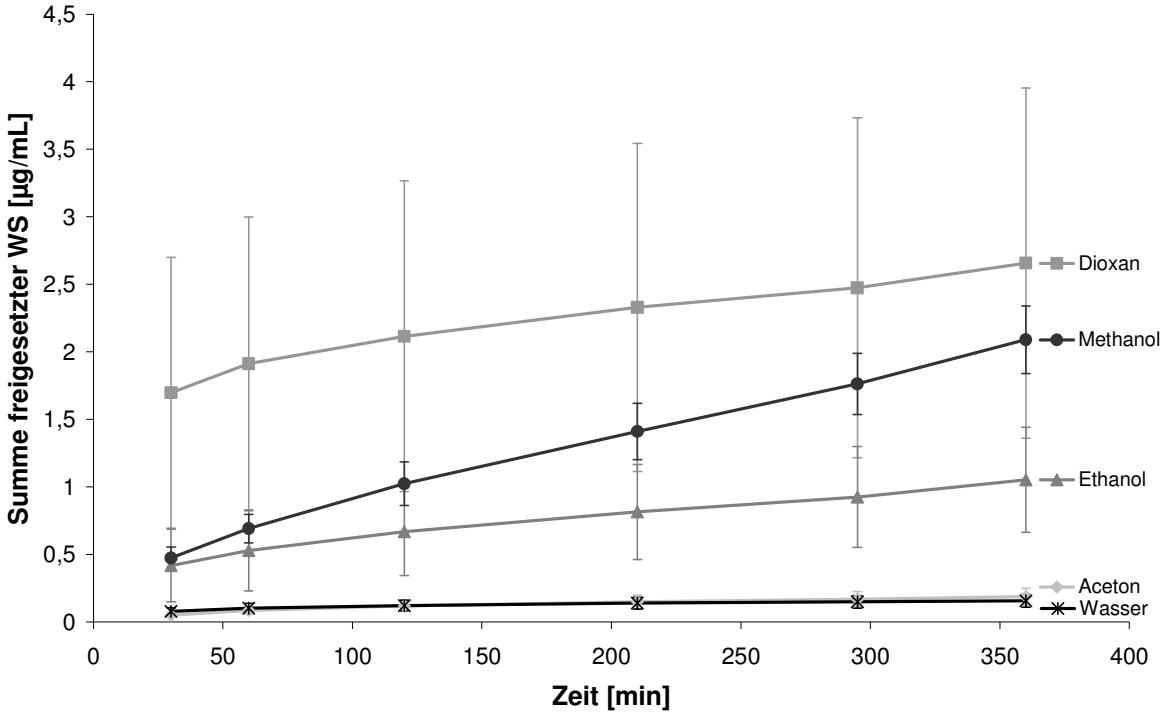


Abbildung 103: Vergleich der Lösungsmittel miteinander. Die für die Mittelwertbildung verwendeten Werte entstammen dem Wiederholungsversuch aus den Abschnitten 3.3.5.1.1 bis 3.3.5.1.5. Dabei wurden nur die Freisetzungen aus Schlauchmaterial berücksichtigt.

Die Freisetzungskurve der in Dioxan gequollenen Schläuche befindet sich nun wieder auf einem Niveau, das es ermöglicht, alle Freisetzungskurven in einem Diagramm darzustellen. Der Kurvenverlauf ist auch – abgesehen von der ersten Stunde – einigermaßen linear. Nach 6 Stunden sind hier 2,7 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, nach 30 Minuten waren es 1,7 µg/mL, nach 60 Minuten 1,9 µg/mL. In den letzten 5 Stunden ergibt sich also eine Freisetzungsrate von 0,36 µg/(mL·h).

Die Freisetzungskurven von Methanol und Ethanol verlaufen wieder beide gleichmäßig linear, allerdings nicht mehr gleich hoch. Methanol zeigt nun eine doppelt so hohe Freisetzung nach 6 Stunden (2,1 µg/mL) wie Ethanol (1,05 µg/mL). Nach 30 Minuten waren die freigesetzten Wirkstoffmengen noch fast gleich (0,47 µg/mL bei Methanol und 0,42 µg/mL bei Ethanol). Entsprechend ist auch die Freisetzungsrate bei den in Methanol gequollenen Schläuchen mit 0,3 µg/(mL) deutlich höher als die der in Ethanol gequollenen Schläuche (0,11 µg/(mL·h)). Die freigesetzten Wirkstoffmengen im Vergleich zum ersten

Versuch sind deutlich geringer. Bei den in Methanol gequollenen Schläuchen sind sie gut halb so hoch, bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen betragen sie nur etwa ein Viertel dessen, was bei der ersten Messung mit der Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wurde.

In diesem Diagramm sind die Freisetzungskurven der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche wieder kaum voneinander zu unterscheiden. Bei den in Aceton gequollenen Schläuchen sind nach 6 Stunden 0,19 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, bei den in Wasser gequollenen waren es 0,16 µg/mL. Nach 30 Minuten wurde bei den in Aceton gequollenen Schläuchen im Schnitt eine Wirkstoffmenge von 0,05 µg/mL bestimmt, bei den in Wasser gequollenen Schläuchen 0,08 µg/mL. Die Unterschiede sind also marginal und die Wirkstoffmengen insgesamt auch deutlich niedriger als bei dem ersten Versuch.

Tabelle 33: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Quellmittel miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Lösungsmittel dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [min]	Aceton und Dioxan	Aceton und Ethanol	Aceton und Methanol	Aceton und Wasser	Dioxan und Ethanol	Dioxan und Methanol	Dioxan und Wasser	Ethanol und Methanol	Ethanol und Wasser	Methanol und Wasser
30	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,456 n.s.	0,000 *	0,000 *
60	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,149 n.s.	0,000 *	0,001 *	0,000 *	0,065 n.s.	0,000 *	0,000 *
120	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,839 n.s.	0,000 *	0,003 *	0,000 *	0,001 *	0,000 *	0,000 *
210	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,556 n.s.	0,000 *	0,011 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *
295	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,271 n.s.	0,000 *	0,048 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *
360	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,130 n.s.	0,000 *	0,117 n.s.	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *

Beim t-Test werden wieder mit einer Ausnahme bei allen Vergleichen signifikante Unterschiede festgestellt. Allerdings handelt es sich diesmal um den Vergleich der Quellmittel Aceton und Wasser, nicht um den Vergleich von Ethanol und Methanol. Entsprechend Abbildung 103 wird der Unterschied zwischen den beiden Messreihen im Zeitablauf immer signifikanter.

Insgesamt ist es also keineswegs sicher, ob die Quellmittel Aceton und Wasser bzw. Ethanol und Methanol nun unterschiedliche Freisetzungseigenschaften hervorrufen, da sich zwar teilweise signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Messreihen ergeben, aber keineswegs immer, und die Überlegenheit geht auch nicht immer in die selbe Richtung: Einmal scheint Ethanol als Quellmittel überlegen, einmal Methanol. Beim Vergleich von Aceton und Wasser scheint eher Aceton überlegen zu sein; diese Überlegenheit wäre dann aber auch nicht sehr deutlich.

3.3.5.2 Wiederholung der Freisetzung über 7 Tage

Auch die Freisetzung über den längeren Zeitraum von einer Woche wurde noch einmal wiederholt und die freigesetzten Wirkstoffmengen fluorimetrisch bestimmt. Die in Abschnitt 3.3.5.1 für die Versuchswiederholung verwendeten Proben wurden für diese Freisetzung weiterverwendet; die Wirkstoffmenge, die nach 6 Stunden freigesetzt worden war, wurde zu der freigesetzten Wirkstoffmenge des ersten Tages addiert.

Es wurden also Proben verwendet, die nach dem Quellen getrocknet und anschließend mit fünfmal 1 mL Wasser bei 2500 rpm gespült worden waren, und mit denen bereits ein Freisetzungsversuch über 6 Stunden stattgefunden hatte.

Es handelte sich um vier Schlauchproben (unbeschichtete Schläuche und Schläuche mit den Beschichtungen DLC2, DLC-F und DLC-NH3), sowie um zwei Folienproben mit DLC-NH3-Beschichtung bzw. mit DLC-O-Beschichtung. Die Freisetzung aus den Folien wird in den folgenden Diagrammen nicht dargestellt, es ist stattdessen die theoretische Messreihe der DLC-O-beschichteten Schläuche enthalten.

3.3.5.2.1 Freisetzung über 7 Tage aus in Aceton gequollenen Schläuchen

Für die in Ethacridinlactat/Aceton 0,5% gequollenen Schläuche ergibt sich das folgende Bild:

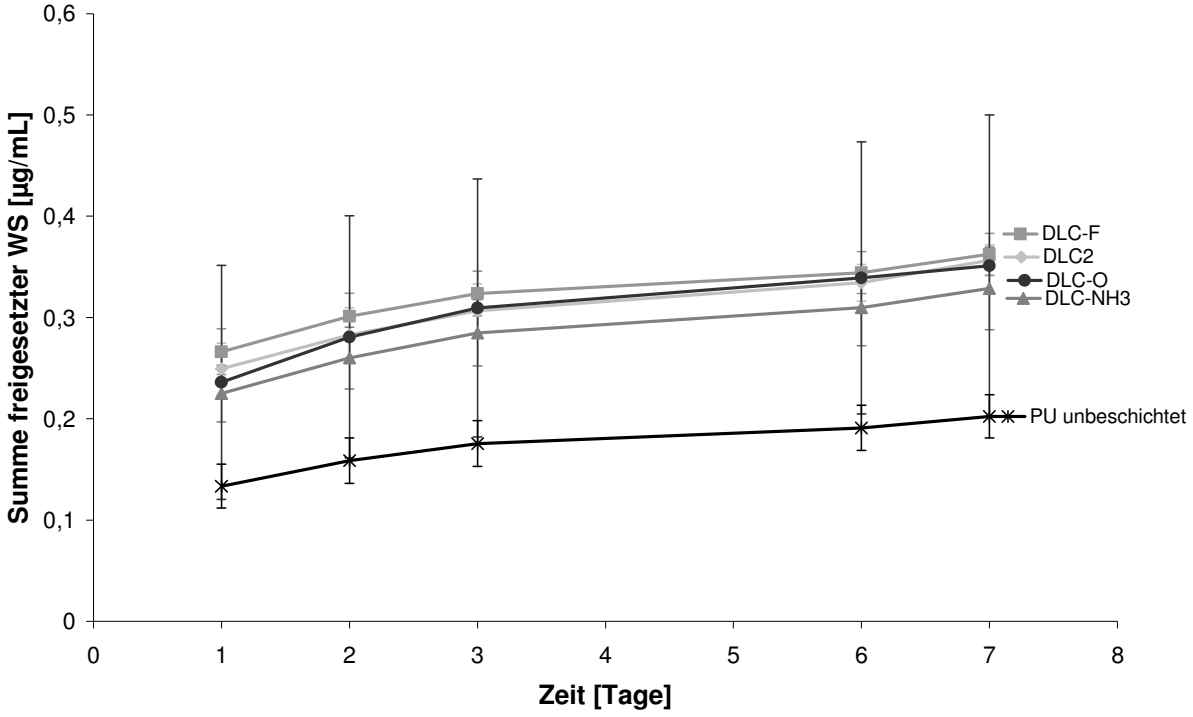


Abbildung 104: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Aceton-Lösung 0,5% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Wie schon bei der Freisetzung über 6 Stunden verläuft die Messkurve der unbeschichteten Schläuche deutlich unterhalb der Messkurven der beschichteten Schläuche. Da es sich um dieselben Proben handelt, die freigesetzte Wirkstoffmenge nach 6 Stunden jeweils addiert wurde und die freigesetzten Wirkstoffmengen nicht sonderlich hoch sind, ist dies nicht verwunderlich.

Um Unterschiede zwischen den Beschichtungen aufzudecken, wurde auch für diesen Vergleich ein t-Test durchgeführt:

Tabelle 34: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,441 n.s.	0,326 n.s.	0,859 n.s.	0,004 *	0,121 n.s.	0,696 n.s.	0,002 *	0,889 n.s.	0,013 *	0,265 n.s.
2	0,415 n.s.	0,384 n.s.	0,972 n.s.	0,004 *	0,138 n.s.	0,792 n.s.	0,002 *	0,805 n.s.	0,012 *	0,222 n.s.
3	0,441 n.s.	0,420 n.s.	0,982 n.s.	0,003 *	0,173 n.s.	0,863 n.s.	0,001 *	0,788 n.s.	0,012 *	0,221 n.s.
6	0,561 n.s.	0,382 n.s.	0,824 n.s.	0,001 *	0,250 n.s.	0,738 n.s.	0,001 *	0,951 n.s.	0,015 *	0,244 n.s.
7	0,713 n.s.	0,363 n.s.	0,991 n.s.	0,001 *	0,294 n.s.	0,001 *	0,001 *	0,813 n.s.	0,018 *	0,255 n.s.

Wie erwartet ergeben sich beim Vergleich der unbeschichteten Schläuche mit den beschichteten Schläuchen signifikante Unterschiede. Eine Ausnahme bildet der Vergleich mit den DLC-O-beschichteten Schläuchen (theoretische Messreihe), allerdings sind die Standardabweichung dieser Messreihe auch mit Abstand die höchsten.

Zwischen den anderen Beschichtungen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

3.3.5.2.2 Freisetzung über 7 Tage aus in Dioxan gequollenen Schläuchen

Die Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Dioxan 0,1% gequollenen Schläuchen stellt sich folgendermaßen dar:

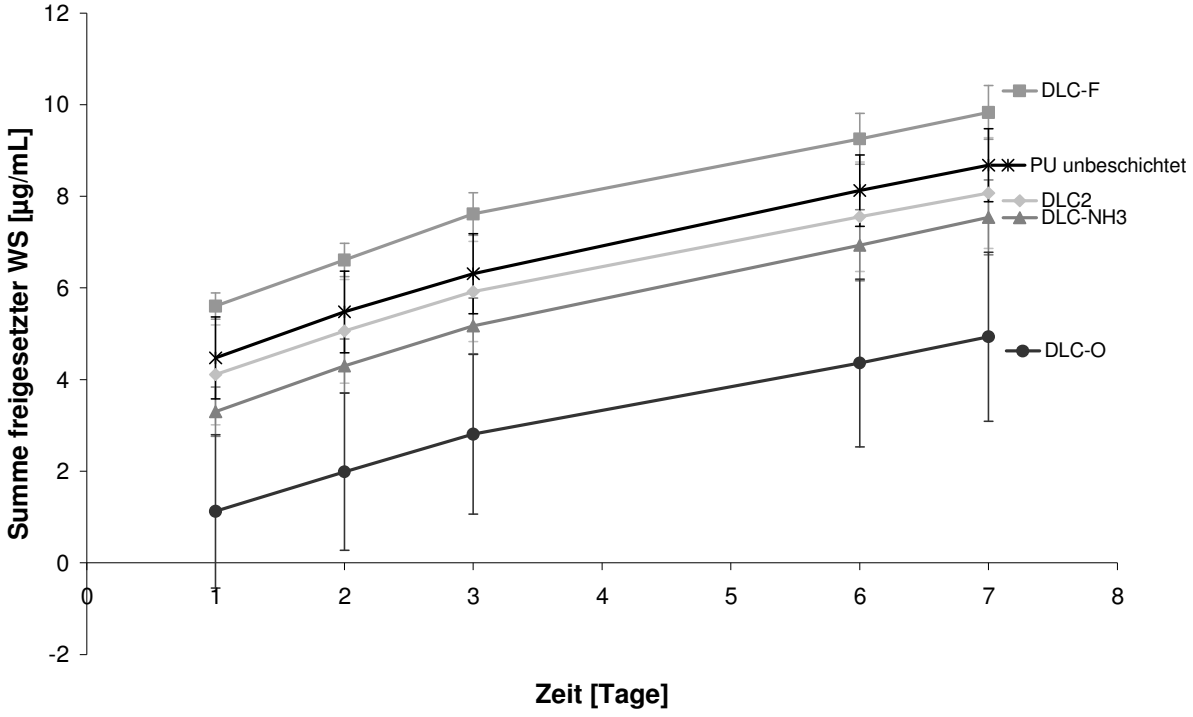


Abbildung 105: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Dioxan-Lösung 0,1% für 1 Stunde gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Der Freisetzungsverlauf ist gleichmäßig linear, die Messkurve der DLC-O-beschichteten Schläuche verläuft am niedrigsten von allen. Das entspricht den Beobachtungen aus der Freisetzung über 6 Stunden (Abbildung 91 in Abschnitt 3.3.5.1.2). Im Vergleich zu der dortigen Abbildung sind aber die vier höher verlaufenden Messkurven dichter zusammengerückt. Der Eindruck könnte allerdings auch dadurch entstehen, dass die Messreihe „DLC-O“ von den anderen nach unten abrückt.

Die nach 7 Tagen freigesetzten Wirkstoffmengen betragen bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen (theoretisch) knapp 5 µg/mL. Die höchste Freisetzungsmenge ist bei den DLC-F-beschichteten Schläuchen zu verzeichnen (10 µg/mL). Es folgen die unbeschichteten Schläuche mit 8,5 µg/mL, dann die DLC2-beschichteten Schläuche mit 8 µg/mL und schließlich die DLC-NH3-beschichteten Schläuche mit 7,5 µg/mL.

Tabelle 35: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,132 n.s.	0,336 n.s.	0,071 n.s.	0,676 n.s.	0,007 *	0,040 *	0,151 n.s.	0,143 n.s.	0,139 n.s.	0,054 n.s.
2	0,130 n.s.	0,380 n.s.	0,071 n.s.	0,641 n.s.	0,007 *	0,038 *	0,146 n.s.	0,134 n.s.	0,139 n.s.	0,052 n.s.
3	0,100 n.s.	0,373 n.s.	0,070 n.s.	0,655 n.s.	0,006 *	0,034 *	0,106 n.s.	0,132 n.s.	0,146 n.s.	0,054 n.s.
6	0,117 n.s.	0,498 n.s.	0,022 *	0,533 n.s.	0,017 *	0,016 *	0,118 n.s.	0,038 *	0,134 n.s.	0,020 *
7	0,112 n.s.	0,563 n.s.	0,079 n.s.	0,514 n.s.	0,020 *	0,121 n.s.	0,121 n.s.	0,119 n.s.	0,158 n.s.	0,055 n.s.

Der signifikante Unterschied zwischen den Beschichtungen DLC-F und DLC-NH3 ist auch bei der längeren Freisetzung zu beobachten. Die Standardabweichungen beider Messreihen sind sehr gering (unter 1 µg/mL), daher spricht der t-Test stärker auf diesen Vergleich an.

Weiterhin ergibt trotz der hohen Standardabweichung der Messreihe „DLC-O" eine signifikante Abweichung zur am höchsten verlaufenden Messreihe „DLC-F". Im Vergleich mit den nächsthöheren Messkurven der unbeschichteten und der DLC2-beschichteten Schläuche wird das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt. Auch im Vergleich mit den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen ist die Nichtsignifikanz nicht sehr ausgeprägt.

Allerdings überschreiten die p-Werte bei keinem der Vergleiche den Wert von 0,5. Die Wahrscheinlichkeit eines β-Fehlers ist also sehr hoch, wenn man den Schluss zieht, dass es keinen Unterschied zwischen den Beschichtungen gibt. Trotzdem reichen die Ergebnisse nicht aus, die Beschichtungen als verschieden einzustufen. Nur bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen könnte man sich eventuell darauf festlegen, dass die Beschichtung unterlegen ist. Da dies jedoch ausgerechnet diejenige Messreihe ist, die nur theoretisch bestimmt wurde, wäre diese Aussage auch nicht besonders gut abgesichert. So soll also weiterhin davon ausgegangen werden, dass sich die verschiedenen Beschichtungen hinsichtlich ihrer Freisetzungseigenschaften nicht unterscheiden.

3.3.5.2.3 Freisetzung über 7 Tage aus in Ethanol gequollenen Schläuchen

Die Ergebnisse, die sich bei der Freisetzung aus den in Ethanol gequollenen Schläuchen ergeben haben, sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

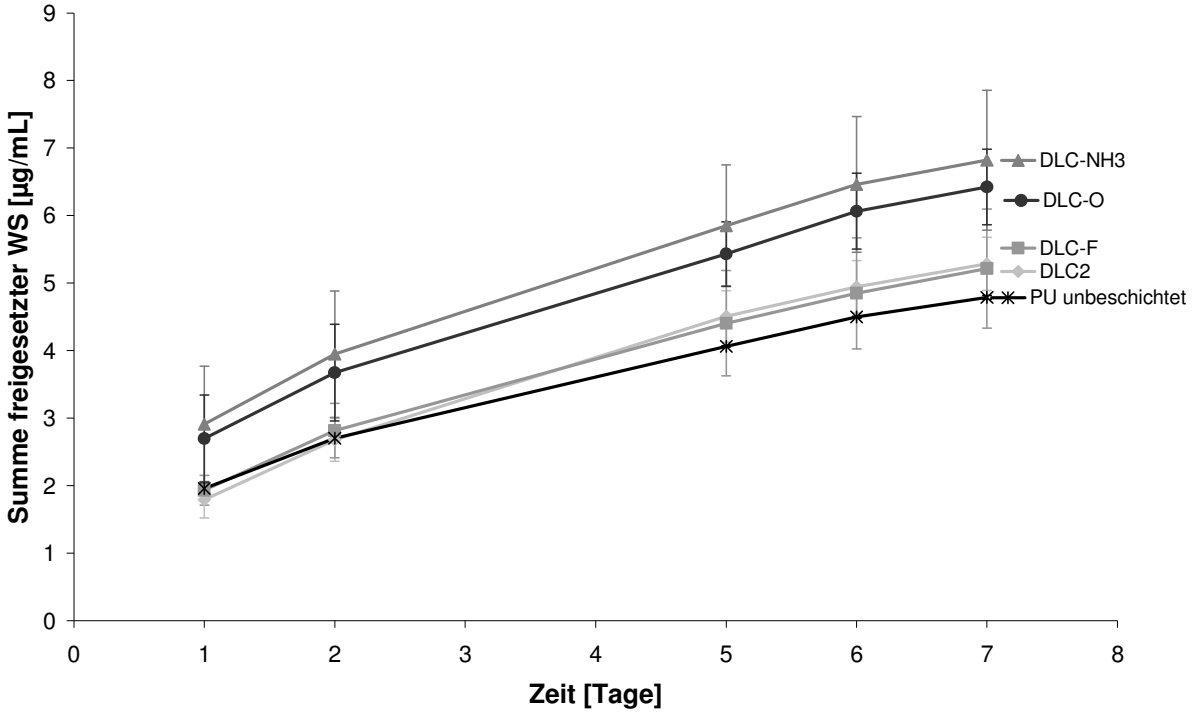


Abbildung 106: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Ethanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Die Freisetzungskurven verlaufen alle linear steigend, die freigesetzten Wirkstoffmengen aus den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen und den (theoretischen) DLC-O-beschichteten Schläuchen sind mit 7 bzw. 6,5 µg/mL etwas höher als aus den anderen Schläuchen (jeweils etwa 5 µg/mL).

Tabelle 36: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,529 n.s.	0,142 n.s.	0,121 n.s.	0,405 n.s.	0,180 n.s.	0,166 n.s.	0,865 n.s.	0,748 n.s.	0,193 n.s.	0,184 n.s.
2	0,664 n.s.	0,132 n.s.	0,122 n.s.	0,893 n.s.	0,160 n.s.	0,163 n.s.	0,681 n.s.	0,712 n.s.	0,148 n.s.	0,142 n.s.
5	0,854 n.s.	0,108 n.s.	0,062 n.s.	0,180 n.s.	0,106 n.s.	0,139 n.s.	0,526 n.s.	0,528 n.s.	0,075 n.s.	0,038 *
6	0,868 n.s.	0,106 n.s.	0,246 n.s.	0,184 n.s.	0,100 n.s.	0,362 n.s.	0,534 n.s.	0,212 n.s.	0,077 n.s.	0,077 n.s.
7	0,908 n.s.	0,111 n.s.	0,051 n.s.	0,161 n.s.	0,112 n.s.	0,491 n.s.	0,491 n.s.	0,600 n.s.	0,077 n.s.	0,037 *

Der t-Test zeigt praktisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messreihen an. Allerdings sind die p-Werte bei den Vergleichen der DLC-NH3- und der DLC-O-Beschichtung mit den anderen Proben nicht allzu weit vom Signifikanzniveau entfernt.

3.3.5.2.4 Freisetzung über 7 Tage aus in Methanol gequollenen Schläuchen

Die Freisetzung der in Methanol gequollenen Schläuche über eine Woche stellt sich wie folgt dar:

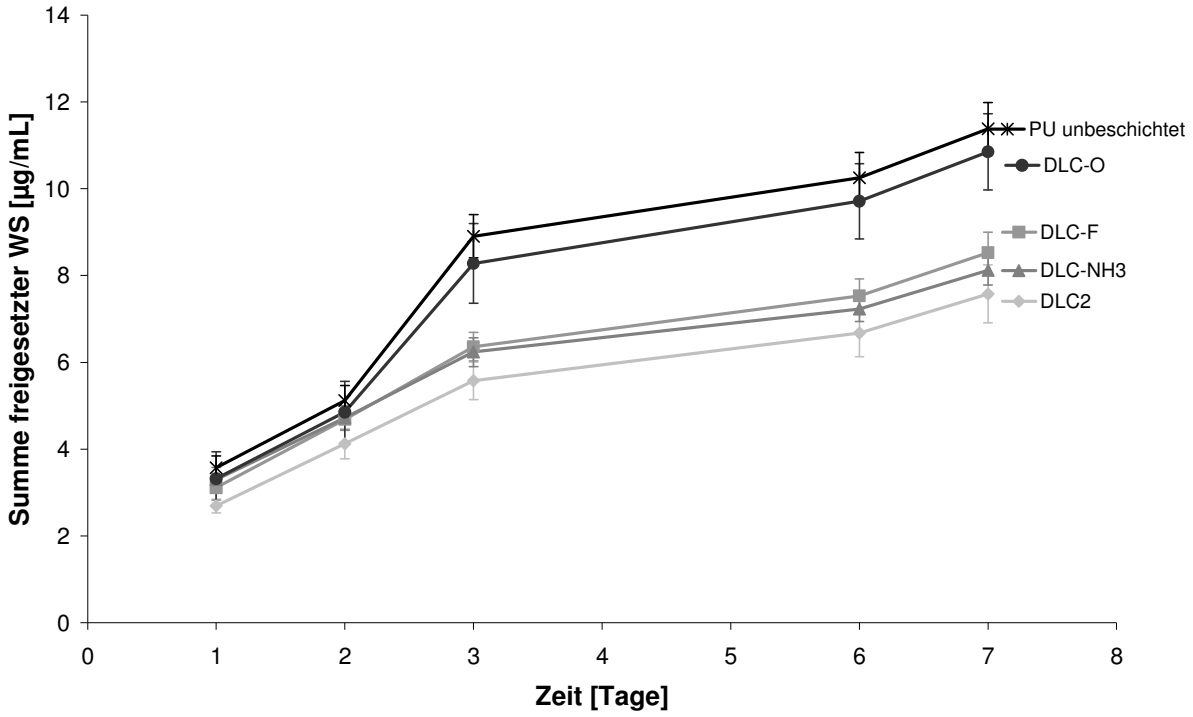


Abbildung 107: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Methanol-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

An den ersten beiden Tagen verlaufen alle fünf Kurven sehr nahe beieinander, bevor sich bei den unbeschichteten und den DLC-O-beschichteten Schläuchen am dritten Tag ein Sprung ergibt. Danach verlaufen die Kurven wieder parallel zueinander.

Die nach 7 Tagen aus den unbeschichteten Schläuchen freigesetzte Wirkstoffmenge beträgt 11,5 µg/mL, bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen sind es knapp 11 µg/mL. Aus den DLC-F-beschichteten Schläuchen sind nach 7 Tagen 8,5 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, aus den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen 8 µg/mL und aus den DLC2-beschichteten Schläuchen 7,5 µg/mL.

Tabelle 37: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,107 n.s.	0,040 *	0,217 n.s.	0,015 *	0,451 n.s.	0,636 n.s.	0,114 n.s.	0,964 n.s.	0,295 n.s.	0,573 n.s.
2	0,093 n.s.	0,085 n.s.	0,215 n.s.	0,026 *	0,880 n.s.	0,735 n.s.	0,170 n.s.	0,791 n.s.	0,208 n.s.	0,607 n.s.
3	0,069 n.s.	0,107 n.s.	0,021 *	0,001 *	0,662 n.s.	0,056 n.s.	0,003 *	0,048 *	0,003 *	0,373 n.s.
6	0,098 n.s.	0,215 n.s.	0,011 *	0,001 *	0,346 n.s.	0,033 *	0,004 *	0,029 *	0,004 *	0,426 n.s.
7	0,122 n.s.	0,303 n.s.	0,008 *	0,002 *	0,285 n.s.	0,004 *	0,004 *	0,022 *	0,003 *	0,444 n.s.

Erwartungsgemäß ergeben sich beim Vergleich der Beschichtungen in den ersten zwei Tagen kaum signifikante Unterschiede. Nur bei der am niedrigsten verlaufende Kurve der DLC2-beschichteten Schläuche – die auch sehr geringe Standardabweichungen aufweist – reagiert der t-Test beim Vergleich mit den unbeschichteten und den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen.

Ab dem dritten Tag treten signifikante Unterschiede beim Vergleich der unbeschichteten und der DLC-O-beschichteten Schläuche mit den anderen beschichteten Schläuchen auf. Dies deckt sich mit dem plötzlichen Kurvenanstieg der Messreihen „PU" und „DLC-O". Die Ursache hierfür ist allerdings ungeklärt.

Ansonsten wurden keine Unterschiede zwischen den Beschichtungen aufgedeckt.

3.3.5.2.5 Freisetzung über 7 Tage aus in Wasser gequollenen Schläuchen

Die Freisetzungskurven der in Wasser gequollenen Schläuche sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt:

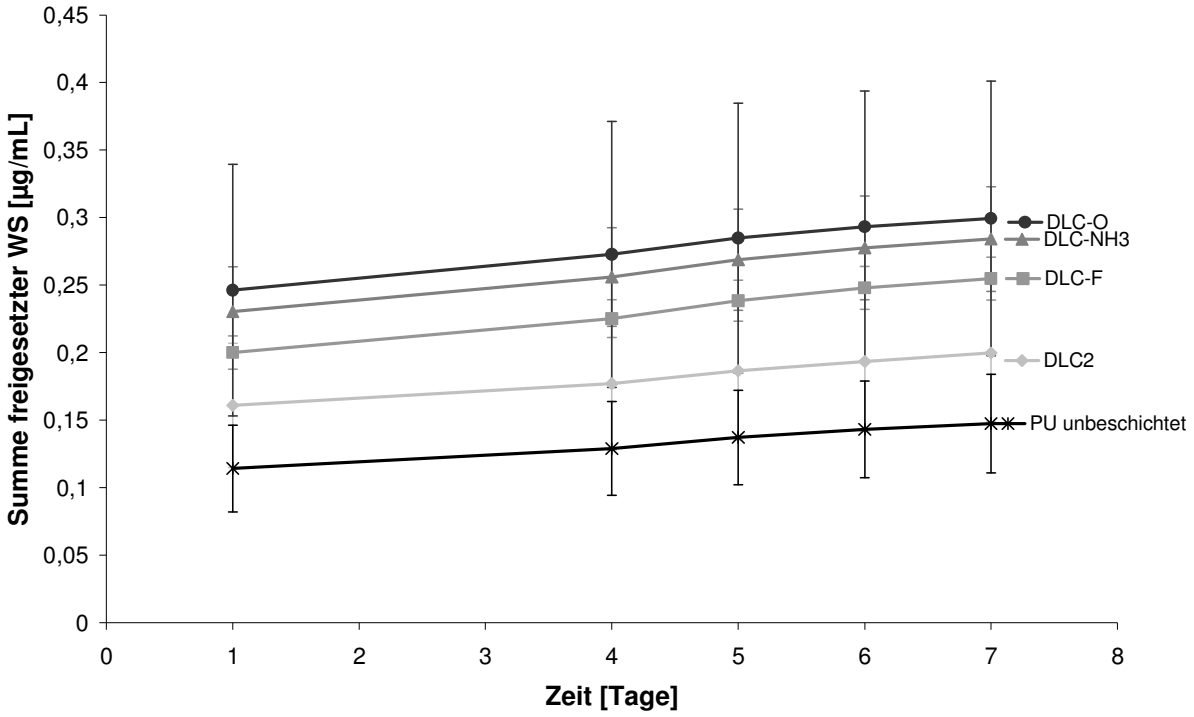


Abbildung 108: Vergleich von vier verschiedenen Plasmabeschichtungen mit unbeschichteten Schläuchen (PU). Die Schläuche wurden jeweils in Ethacridinlactat/Wasser-Lösung 1% für 3,5 Stunden gequollen und erst nach dem Trocknen mit Wasser gespült. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels Fluorimetrie.

Die Kurven zeigen nur einen geringfügigen Anstieg im Zeitverlauf; anscheinend wird so gut wie kein Wirkstoff freigesetzt.

Die Kurven scheinen recht weit auseinander zu liegen und die Standardabweichungen scheinen hoch zu sein. Beachtet man jedoch die absoluten Werte, sieht man, dass dieser Eindruck täuscht.

Am niedrigsten verläuft die Messkurve der unbeschichteten Schläuche auf einem Niveau von 0,11 bis 0,15 µg/mL. Auf dem höchsten Niveau verläuft die Freisetzungskurve der DLC-O-beschichteten Schläuche (0,25 bis 0,30 µg/mL). Dazwischen liegen die Messkurven der DLC-NH3-beschichteten Schläuche (0,23 bis 0,28 µg/mL), der DLC-F-beschichteten Schläuche (0,20 bis 0,25 µg/mL) sowie der DLC2-beschichteten Schläuche (0,16 bis 0,20 µg/mL). Die Kurven liegen nicht weit auseinander.

Tabelle 38: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Beschichtungen miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Beschichtungen dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	DLC2 und DLC-F	DLC2 und DLC-NH3	DLC2 und DLC-O	DLC2 und PU	DLC-F und DLC-NH3	DLC-F und DLC-O	DLC-F und PU	DLC-NH3 und DLC-O	DLC-NH3 und PU	DLC-O und PU
1	0,274 n.s.	0,108 n.s.	0,252 n.s.	0,232 n.s.	0,251 n.s.	0,483 n.s.	0,031 *	0,802 n.s.	0,012 *	0,122 n.s.
4	0,227 n.s.	0,095 n.s.	0,231 n.s.	0,247 n.s.	0,279 n.s.	0,491 n.s.	0,027 *	0,802 n.s.	0,012 *	0,115 n.s.
5	0,216 n.s.	0,094 n.s.	0,226 n.s.	0,249 n.s.	0,293 n.s.	0,502 n.s.	0,024 *	0,809 n.s.	0,011 *	0,112 n.s.
6	0,205 n.s.	0,093 n.s.	0,183 n.s.	0,248 n.s.	0,314 n.s.	0,423 n.s.	0,023 *	0,683 n.s.	0,011 *	0,093 n.s.
7	0,195 n.s.	0,089 n.s.	0,226 n.s.	0,230 n.s.	0,323 n.s.	0,023 *	0,023 *	0,818 n.s.	0,011 *	0,109 n.s.

Trotzdem fallen beim t-Test zwei Vergleiche auf, an denen jeweils die unbeschichteten Schläuche beteiligt sind, also die Schläuche mit der niedrigsten Freisetzung. Die DLC-F-beschichteten Schläuche sind nicht die Proben mit der höchsten Freisetzung, aber sie zeigen besonders niedrige Standardabweichungen (nur maximal 0,02 µg/mL). Die DLC-NH3-beschichteten Schläuche zeigen eine größere Streuung (bis 0,03 µg/mL), allerdings verläuft die zugehörige Kurve auch in etwas größerer Entfernung von der der unbeschichteten Schläuche als dies die Kurve tut, die zu den DLC-F-beschichteten Schläuchen gehört. Bei der am weitesten entfernten Freisetzungskurve sind die p-Werte auch relativ niedrig (maximal 0,122) und die Standardabweichungen sind die deutlich höchsten in diesem Kollektiv (bis 0,1 µg/mL).

Insgesamt sind die p-Werte durch die niedrigen Standardabweichungen sehr klein; trotzdem kann man davon ausgehen, dass zwischen den in Wasser gequollenen Proben keine Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung der Freisetzungseigenschaften bestehen.

3.3.5.2.6 Vergleich der fünf Lösungsmittel

Um die Lösungsmittel einander gegenüberzustellen, wurden die Mittelwerte über die Beschichtungen der zuvor beschriebenen Versuche (Abschnitte 3.3.5.2.1 bis 3.3.5.2.5) gebildet:

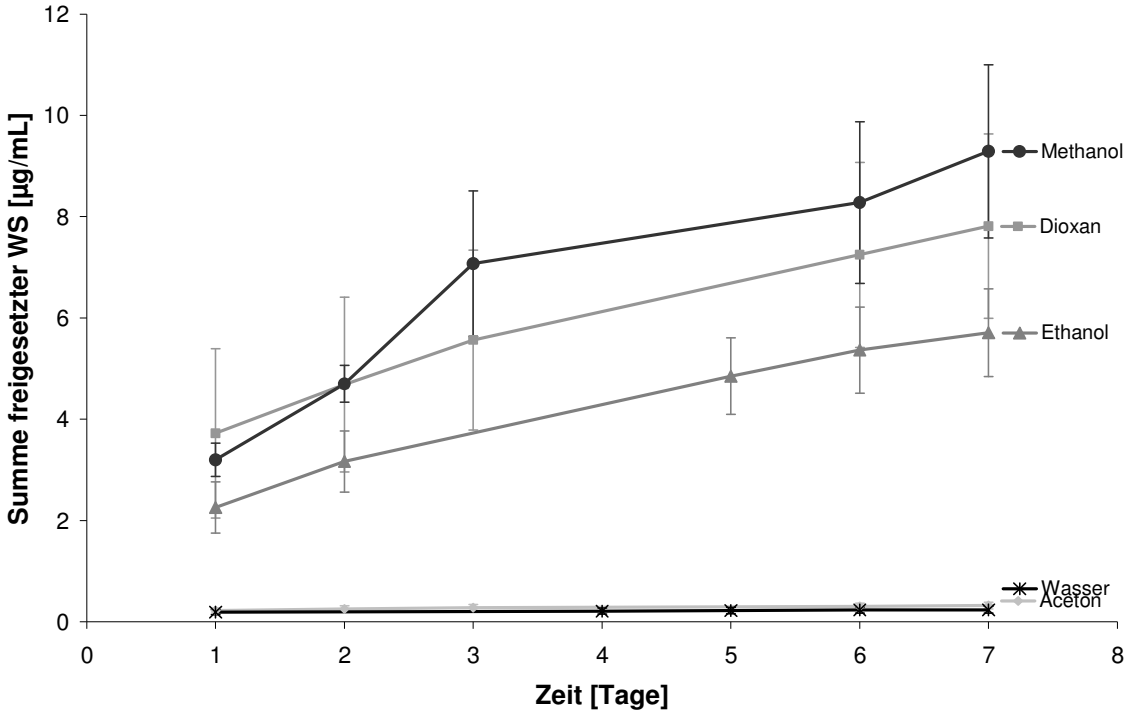


Abbildung 109: Freisetzungskurven für die fünf verwendeten Quellmittel. Es wurde der Mittelwert aus allen Messungen aus dem Vergleich der Beschichtungen gebildet.

Die Freisetzungskurven der in Aceton bzw. in Wasser gequollenen Schläuche bewegen sich auf niedrigem Niveau (zwischen 1,7 und 2 µg/mL bzw. bei 1 µg/mL). Das Niveau liegt damit ähnlich wie bei der UV/Vis-Bestimmung (1 bis 2 µg/mL).

Die Freisetzungskurven der in Dioxan, Ethanol oder Methanol gequollenen Schläuche verlaufen gleichmäßig linear ansteigend, wobei bei der Messkurve der in Methanol gequollenen Schläuche am dritten Tag ein Sprung zu verzeichnen ist, dessen Ursache ungeklärt ist (vgl. Abschnitt 3.3.5.2.4).

Aus den in Ethanol gequollenen Schläuchen wurden im Schnitt nach 7 Tagen 5,7 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt, bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen waren es 7,8 µg/mL und bei den in Methanol gequollenen 9,3 µg/mL. Bei der UV/Vis-Bestimmung waren aus den in Ethanol gequollenen Schläuchen 12,4 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, aus den in Methanol gequollenen 13 µg/mL und aus den in Dioxan gequollenen Schläuchen sogar

27 µg/mL. Dass sich diesmal deutlich niedrigere Freisetzungsmengen ergeben haben, ist sehr wahrscheinlich auf die veränderte Spültechnik zurückzuführen.

Tabelle 39: t-Test zum Vergleich der verschiedenen Quellmittel miteinander. Es sind alle möglichen Kombinationen der fünf Lösungsmittel dargestellt. Die Zahlen geben die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Fall an, dass die Beschichtungen als verschieden eingestuft werden. Als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied wird ein Wert von p<0,05 angesehen. „n.s." steht für „nicht signifikant", „*" für „signifikant".

Zeit [Tage]	Aceton und Dioxan	Aceton und Ethanol	Aceton und Methanol	Aceton und Wasser	Dioxan und Ethanol	Dioxan und Methanol	Dioxan und Wasser	Ethanol und Methanol	Ethanol und Wasser	Methanol und Wasser
1	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,685 n.s.	0,008 *	0,283 n.s.	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *
2	0,000 *	0,000 *	0,000 *		0,008 *	0,978 n.s.		0,000 *		
3	0,000 *		0,000 *			0,020 *				
5									0,000 *	
6	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,330 n.s.	0,003 *	0,119 n.s.	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *
7	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,055 n.s.	0,001 *	0,034 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *

Bei den meisten Vergleichen ergeben sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Quellmitteln. Nur der Vergleich von Aceton und Wasser, sowie der von Dioxan und Methanol ergibt keine signifikanten Unterschiede, der Vergleich von Dioxan mit Ethanol ist etwas weniger signifikant als die anderen Vergleiche, hier steht in der dritten Nachkommastelle keine Null.

Neu ist die Ähnlichkeit zwischen Dioxan und Methanol, wohingegen zwischen Ethanol und Methanol in diesem Versuch kein Zusammenhang zu finden war. Offenbar bringt die variierte Spültechnik vor allem bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen eine Veränderung. Es ist also möglich, dass durch alle drei Lösungsmittel das gleiche Ergebnis erzielt werden kann, dass aber bisher durch eine ungeeignete Spültechnik dies nicht aufgedeckt wurde. In einem solchen Fall wäre das erzielte Ergebnis einer Freisetzungsrate von annähernd 10 µg/(mL·w) das Idealergebnis: mehr Wirkstoff könnte nicht gleichmäßig freigesetzt werden.

Wenn die drei Lösungsmittel Dioxan, Ethanol und Methanol einander hinsichtlich der freisetzungsbeeinflussenden Eigenschaften ebenbürtig sind, kann oder muss die Auswahl nach anderen Kriterien getroffen werden.

Dioxan lässt die Schläuche so stark aufquellen, dass sie im aufgequollenen Zustand schlecht zu handhaben sind, teilweise sogar zerreißen, wenn man ganze Schläuche quillt anstelle von kurzen Schlauchstücken. Außerdem bleiben die Materialeigenschaften der Schläuche nicht erhalten. Nach dem Trocknen zeigen die Schläuche starke Verformungen (vgl. Abbildung 55), so dass eine Verwendung von in Dioxan gequollenen Schläuchen in der Praxis ausgeschlossen ist.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Schläuche ist an Ethanol und Methanol nicht viel zu beanstanden. In Zugtests, die beim Projektpartner Urotech durchgeführt wurden, zeigten sich kleinere Veränderungen, die aber eine Anwendung der Schläuche als Harnleiterschiene nicht gefährden sollten.

Zwischen Ethanol und Methanol gibt es jedoch Unterschiede hinsichtlich der Toxikologie: Durch den Abbau im Körper entsteht aus Methanol Formaldehyd und Ameisensäure, die durch Nervenschädigung zur Erblindung führen können. Beim Ethanolabbau entstehen Acetaldehyd und Essigsäure, was in größeren Mengen Übelkeit und Leberschäden hervorrufen kann. Die Mengen, die noch im Polymermaterial enthalten sein könnten, sind aber ungefährlich.

Es ist zwar zu erwarten, dass das Lösungsmittel vollständig verdampft, aber einerseits kann ein wenig mehr Sicherheit nie schaden und andererseits kommt auch die Person, die das Ethacridinlactat in das Polyurethan einbringt, mit größeren Mengen des Quellmittels in Kontakt, und Methanol wird auch über die Haut resorbiert, kann also seine toxische Wirkung auch entfalten ohne getrunken zu werden.

Im Hinblick auf Arbeits- und Produktsicherheit fiel letztlich die Entscheidung, Ethanol als Quellmittel zu verwenden, was bei der Probenvorbereitung der noch folgenden Abschnitte auch berücksichtigt wurde.

3.3.5.3 Langzeitfreisetzung über 6 Monate

Es ist erwünscht, dass die implantierten Harnleiterschienen für mindestens ein halbes Jahr funktionsfähig bleiben werden, um zusätzliche Kosten und Beschwerden für den Patienten durch eine Operation oder Biofilmbildung zu vermeiden.

Um zu ermitteln, ob die Schläuche hierfür geeignet sind, wurde zunächst untersucht, ob das Ethacridinlactat über einen so langen Zeitraum überhaupt freigesetzt wird.

Es wurden hierfür DLC-NH3-beschichtete Schläuche verwendet. Da durch die bisherigen Freisetzungsversuche keine Beschichtung als überlegen identifiziert werden konnte, wurde diese Beschichtung ausgewählt, da hier zusätzlich eine Wirkstoffimmobilisierung über den Spacer Bernsteinsäure möglich ist.

Die 5 mm langen Schläuche wurden 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen, getrocknet, anschließend mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte in PBS pH 7,3 0,012 M bei 37°C.

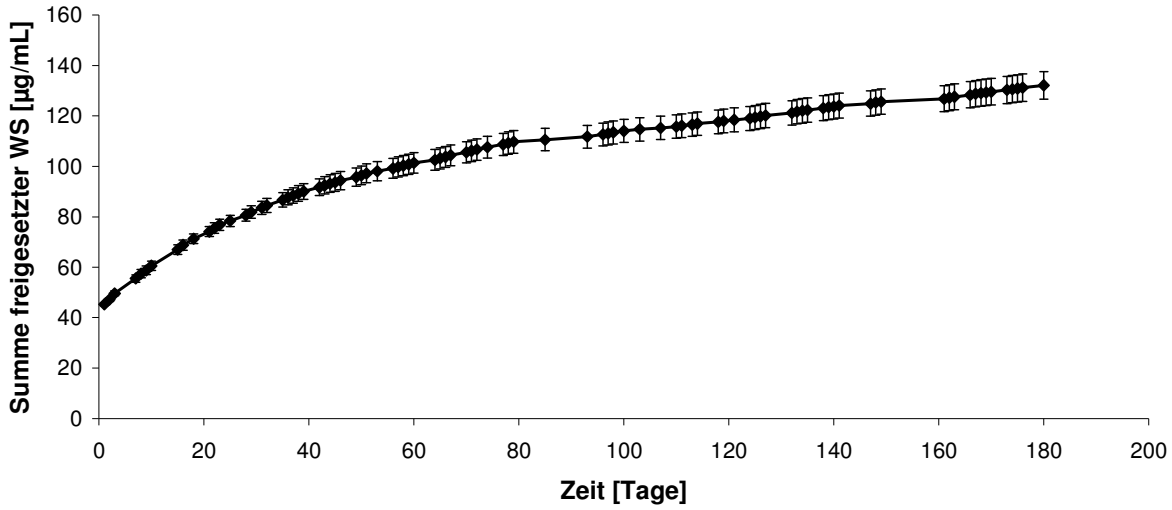


Abbildung 110: Langzeitfreisetzung über 6 Monate aus in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollenen DLC-NH3-beschichteten Schläuchen.

Nach einem Tag sind bereits 45 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, also deutlich mehr als in den Freisetzungsversuchen über eine Woche für diesen Zeitraum ermittelt wurde.

Die Schläuche enthielten also vermutlich noch anhaftenden Wirkstoff, der durch das Spülen nicht entfernt worden war. Das Niveau ist also erhöht.

Trotzdem beobachtet man über die folgenden 179 Tage einen kontinuierlichen Anstieg der Freisetzungskurve, der über einen so langen Zeitraum nicht durch das allmähliche Abwaschen von anhaftendem Wirkstoff zustande kommen kann. Nach 180 Tagen wurden insgesamt 132 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt, in den letzten 179 Tagen also 87 µg/mL.

Die Kurve verläuft nicht die ganze Zeit über linear, sondern scheint im Zeitverlauf abzuflachen. Betrachtet man jedoch nur den Freisetzungsverlauf über die letzten 100 Tage und führt einen Test auf Linearität durch, so erkennt man, dass die Freisetzung in diesem Zeitraum durchaus einen linearen Verlauf aufweist:

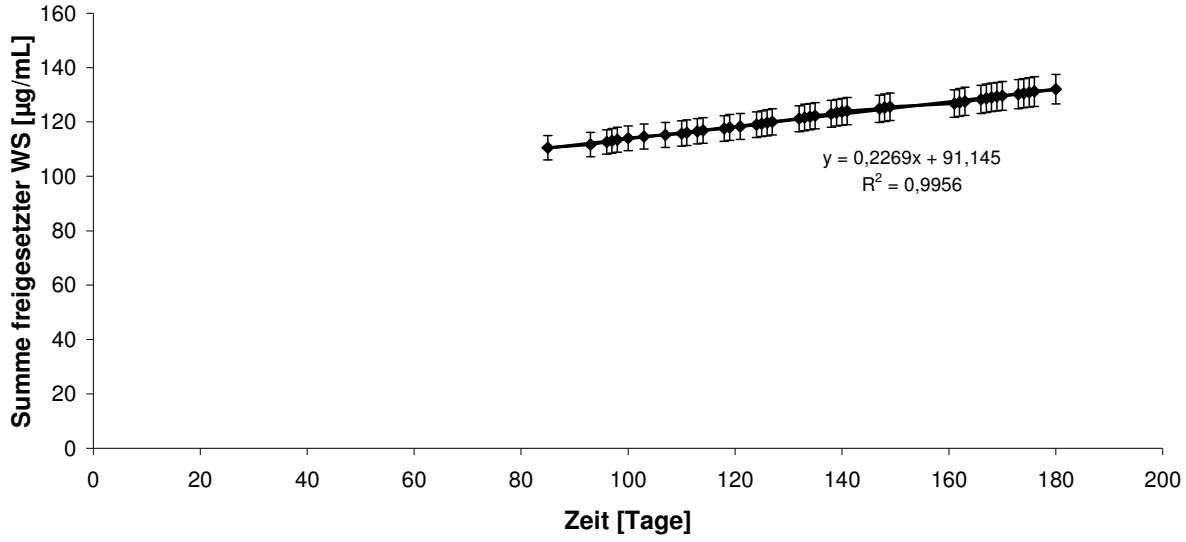


Abbildung 111: Linearität der Freisetzungskurve in den letzten 100 Tagen der Freisetzung.

Am Bestimmtheitsmaß R^2 sieht man, dass die Freisetzung tatsächlich auch zu den fortgeschrittenen Zeitpunkten noch linear verläuft, wenn auch mit einer niedrigeren Steigung als zu Beginn. Ein Bestimmtheitsmaß von mehr als 0,995 gilt als gute Korrelation. Die Freisetzungsrate nimmt also im Laufe der Zeit ab, bleibt aber in den letzten drei Monaten des untersuchten Zeitraumes konstant. Der degressive Verlauf der Freisetzungskurve in den ersten 80 Tagen könnte durch außen anhaftenden Wirkstoff bei dieser Probe verursacht worden sein.

In einem Wiederholungsversuch bestätigt sich diese Annahme:

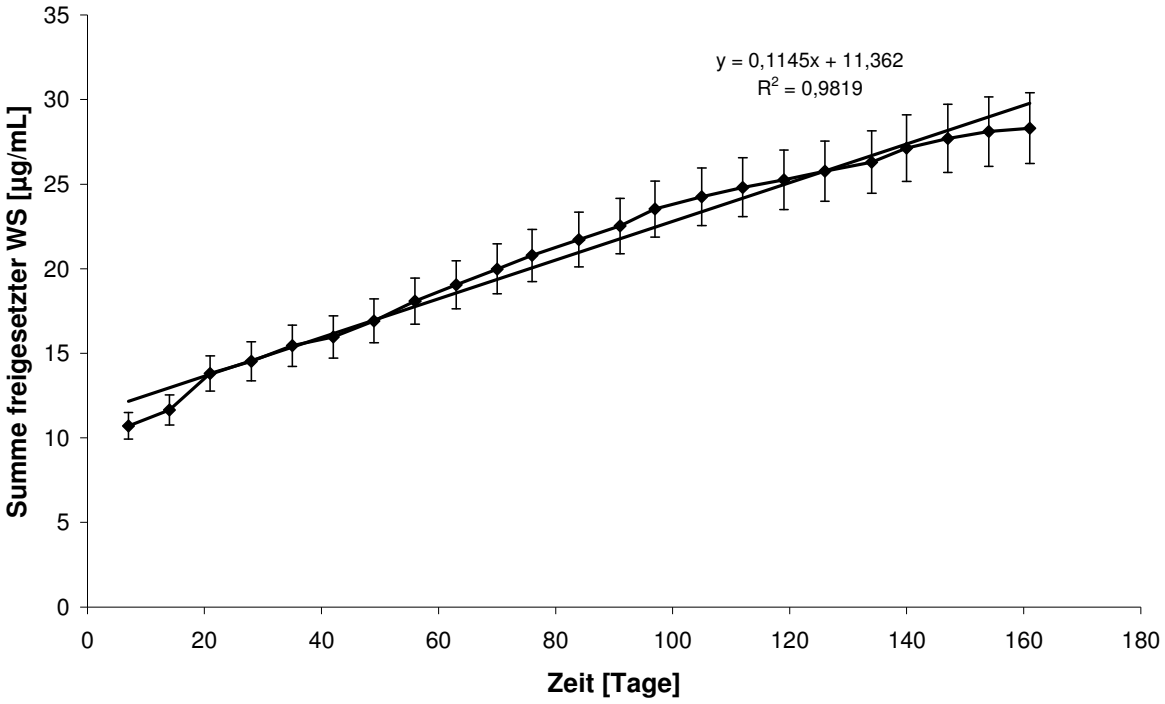


Abbildung 112: Freisetzung über 5 Monate aus in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollenen DLC-NH3-beschichteten Schläuchen mit Linearitätstest.

Der wiederholte Freisetzungsversuch wurde aus technischen Gründen nur über einen Zeitraum von 5 Monaten durchgeführt. Außerdem wurden die Proben nicht täglich gezogen, sondern nur einmal pro Woche, da bei der täglichen Probennahme durch die Wochenenden die Abstände zwischen den Messpunkten nicht gleich waren, wodurch sich Unregelmäßigkeiten im Kurvenverlauf ergaben.

Der Linearitätstest zeigt, dass die Freisetzung über den gesamten Zeitraum weitgehend linear verlief.

Das Polyurethanmaterial ist demnach geeignet, Ethacridinlactat so einzuarbeiten, dass es über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten freigesetzt wird. Ob dies auch in vivo einen Effekt erzeugen kann, bleibt zu untersuchen, ein Vorversuch hierzu findet sich in Abschnitt 3.4.8.

3.3.5.4 Veränderung der Freisetzung bei gealterten Schläuchen

Verschiedene Diskrepanzen in den bislang durchgeführten Freisetzungsversuchen, sowie in einigen mikrobiologischen Tests (siehe Abschnitte 3.4.2 bis 3.4.6, sowie Abschnitt 3.4.8) könnten dadurch zustande gekommen sein, dass die Schläuche, die miteinander verglichen wurden, unterschiedlich alt waren.

Beispielsweise schnitten die sterilisierten Schläuche beim mikrobiologischen Test sehr schlecht ab. Es wurde hierbei aber nicht beachtet, dass die unsterilisierten Schläuche erst kurz vor dem Versuch mit Ethacridinlactat beladen wurden, also etwa einen Monat frischer waren. Ebenso waren die wirkstofffreien Schläuche erst kurz vor dem Versuch in Ethanol gequollen worden.

Bei den Freisetzungsexperimenten gab es Schwankungen zwischen den freigesetzten Wirkstoffmengen bei eigentlich gleichartigen Proben. Die Proben waren nach der Wirkstoffeinbringung teilweise einige Zeit gelagert worden, bevor sie für Freisetzungsversuche eingesetzt wurden. Einige Proben wurden fast sofort nach der Wirkstoffeinbringung verwendet.

Daher wurde ein DLC-NH3-beschichteter Schlauch am Stück 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen, getrocknet, mit Wasser gespült und wieder getrocknet. Die Hälfte des Schlauches wurde dann zum Sterilisieren eingeschickt, die andere Hälfte wurde in einer Plastiktüte aufbewahrt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils drei 5 mm lange Stücke von dem Schlauch abgeschnitten und sechsstündige Freisetzungsversuche in PBS pH 7,3 0,012 M bei 37°C durchgeführt.

Die Freisetzungskurven der unsterilisierten Schläuche sind in dem folgenden Diagramm dargestellt:

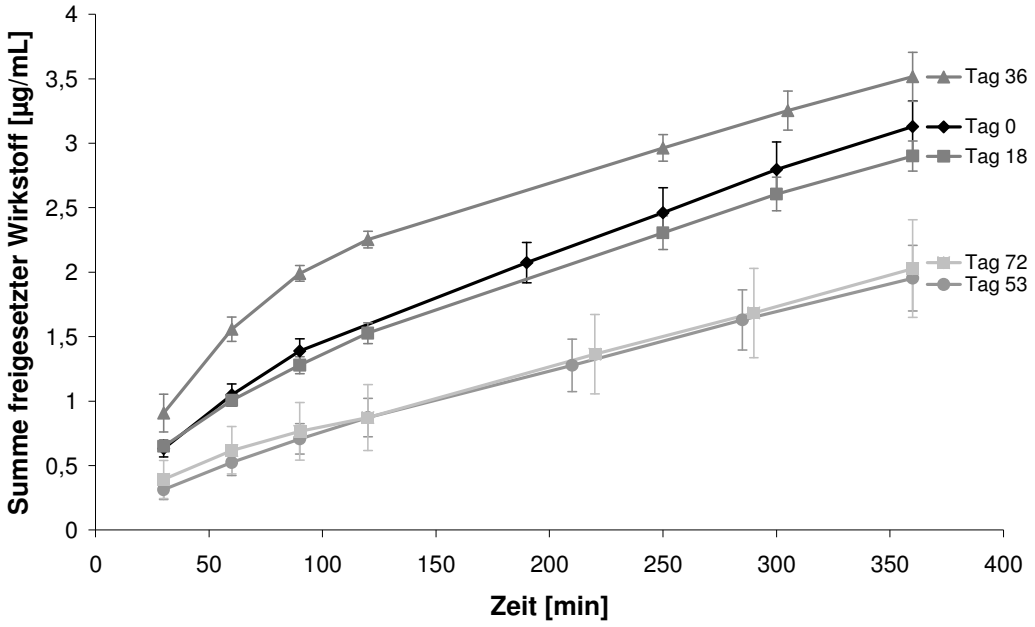


Abbildung 113: Versuch zur Materialalterung. Freisetzungskurven der unterschiedlich alten unsterilisierten Schläuche, die zuvor in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen worden waren.

Betrachtet man nur die Freisetzungskurven von Tag 0, Tag 18 und Tag 53, so scheint eine gleichmäßige Abnahme im Zeitverlauf der Lagerung zu erkennen sein. Bis zum Tag 72 fand dann aber keine weitere Abnahme des Freisetzungsniveaus mehr statt. Die Messreihe von Tag 36 fällt völlig aus dem Rahmen, sie liegt sogar oberhalb der Messreihe von Tag 0.

Nachdem die eingeschickte Schlauchhälfte sterilisiert zurückgesandt worden war, wurden auch diese Schläuche in die Alterungsversuche integriert. Es wurde auch hier die Freisetzung aus 5 mm langen Schlauchstücken an verschiedenen Tagen untersucht:

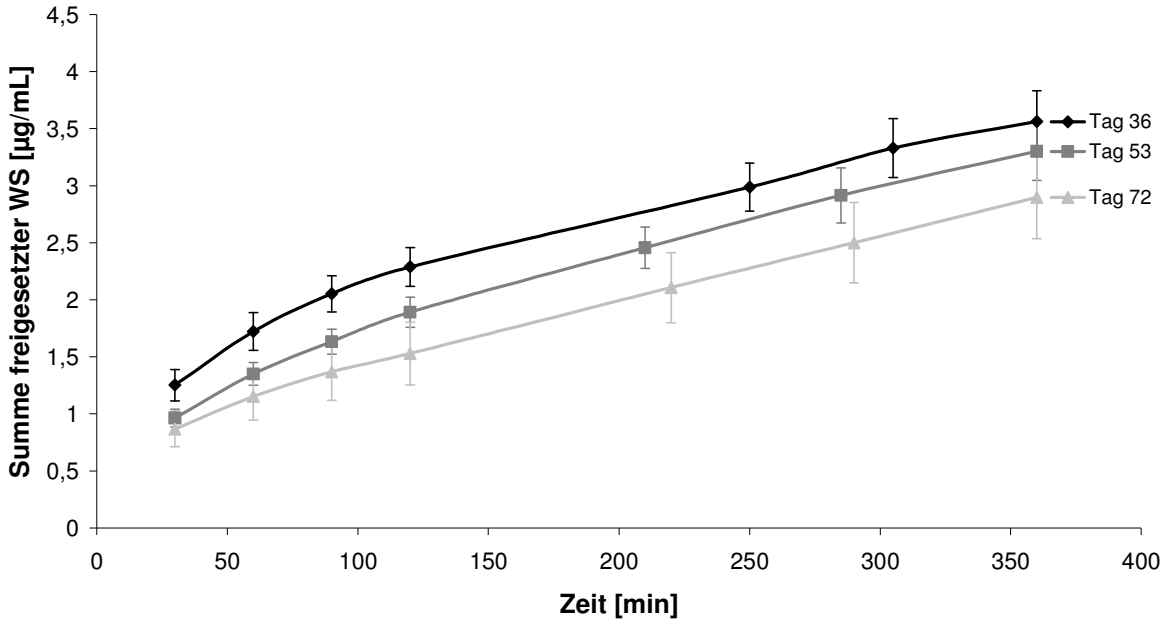


Abbildung 114: Versuch zur Materialalterung. Freisetzungskurven der unterschiedlich alten sterilisierten Schläuche, die zuvor in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen worden waren.

Bei den sterilisierten Schläuchen ist die Abnahme des Freisetzungsniveaus im Zeitverlauf wie erwartet zu erkennen. Die Freisetzung an Tag 36 ist am höchsten, dann folgt die Freisetzung von Tag 54 und schließlich die von Tag 72. Die Standardabweichungen sind gering genug, dass die Nachbarkurven nicht überschnitten werden.

Da die erzielten Ergebnisse alles andere als eindeutig waren, wurde der Versuch zur Materialalterung noch einmal wiederholt. Es wurde wiederum ein DLC-NH3-beschichteter Schlauch am Stück in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung 1% gequollen, getrocknet, mit Wasser gespült und wieder getrocknet. Der Schlauch wurde in einem Kunststoffröhrchen lichtgeschützt im Schrank aufbewahrt. Einmal pro Woche wurden drei 5 mm lange Stücke von dem Schlauch abgeschnitten und für eine sechsstündige Freisetzung in PBS pH 7,3 0,012 M bei 37°C verwendet.

Da diese Versuche über etwa drei Monate wöchentlich durchgeführt wurden, ergab sich eine Vielzahl von Messkurven, wodurch das folgende Diagramm sehr unübersichtlich geworden ist:

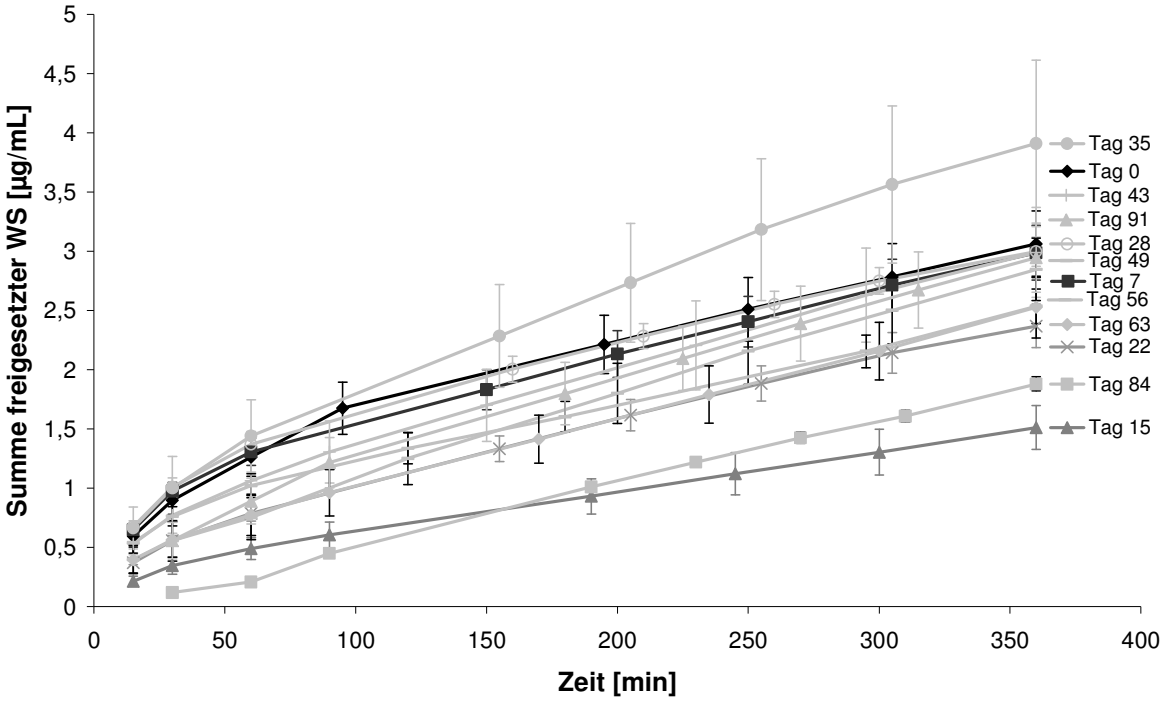


Abbildung 115: Wiederholungsversuch zur Materialalterung. Freisetzungskurven von unterschiedlich alten DLC-NH3-beschichteten Schläuchen, die zuvor in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen worden waren. Die Anordnung der Messreihenbeschriftung entspricht der Rangfolge der freigesetzten Wirkstoffmengen.

Unabhängig von ihrem Alter bewegen sich die meisten Freisetzungskurven im Bereich von freigesetzten Wirkstoffmengen von 2,4 µg/mL und 3,1 µg/mL nach 6 Stunden. Lediglich die Messreihe von Tag 35 stellt einen Ausreißer nach oben dar (3,9 µg/mL nach 6 Stunden), die Messreihen von Tag 15 (1,5 µg/mL nach 6 Stunden) und Tag 84 (1,9 µg/mL nach 6 Stunden) sind Ausreißer nach unten. Die letzte Messreihe wurde an Tag 91 aufgenommen; diese Messreihe befindet sich unter der großen Masse der anderen Messreihen.

Lagert man die Schläuche also im Dunkeln, so findet kein mit Fluoreszenzspektroskopie messbarer Abbau von Ethacridinlactat ab.

3.3.5.5 Einfluss von UV-Licht auf die Freisetzung

Nicht alle Proben, bei denen abweichende Ergebnisse auftraten, waren jedoch die ganze Zeit dunkel gelagert worden. Deshalb muss auch der Einfluss von Licht untersucht werden.

Um eine gleichmäßige Lichteinstrahlung zu gewährleisten und schon nach kurzer Zeit Effekte beobachten zu können, wurden die wirkstoffhaltigen Schläuche sehr energiereichem Licht ausgesetzt, nämlich UV-Licht der Wellenlängen 254 nm. Die Bestrahlungsdauer betrug bei jeweils drei Proben eine, drei oder sechs Stunden.

Anschließend wurde mit all diesen bestrahlten sowie mit drei unbestrahlten Schlauchstücken eine sechsstündige Freisetzung in PBS pH 7,3 0,012 M bei 37°C durchgeführt:

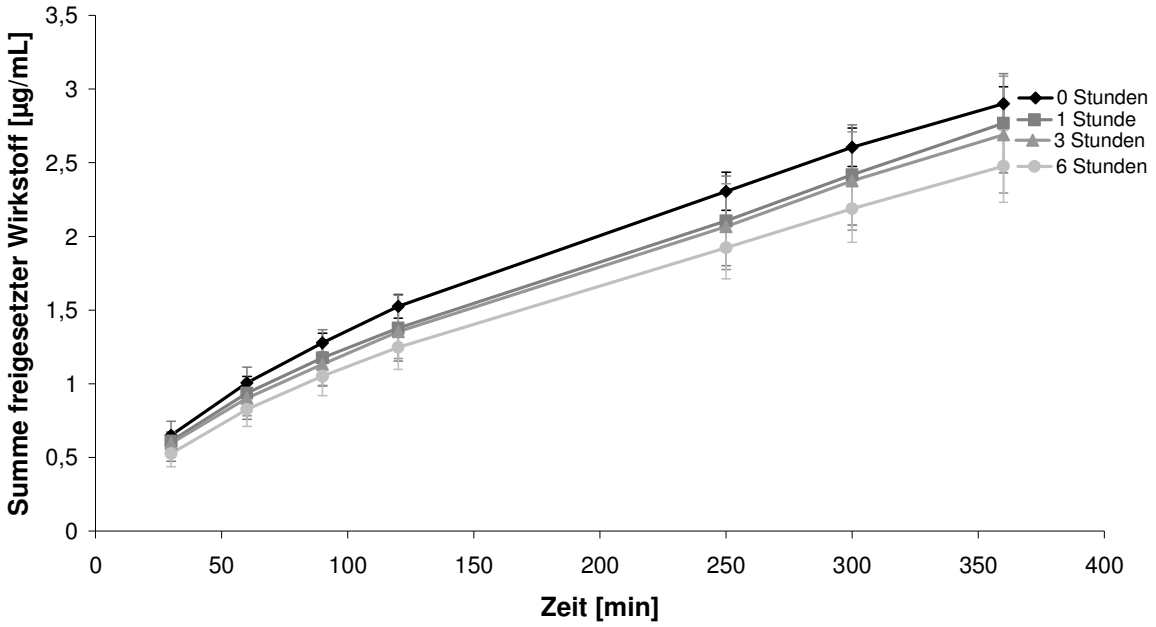


Abbildung 116: Versuch zur Materialalterung unter Einfluss von UV-Licht. Die Schläuche waren in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen worden und unterschiedlich lange mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt worden.

Erwartungsgemäß nimmt das Freisetzungsniveau bei zunehmender Bestrahlungsdauer ab. Die Messreihe der unbestrahlten Schläuche verläuft auf dem höchsten Niveau, nach 6 Stunden sind hier 2,9 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, bei den Schläuchen, die eine Stunde lang mit UV-Licht bestrahlt wurden, waren es 2,8 µg/mL. Aus den Schläuchen, die drei Stunden lang mit UV-Licht bestrahlt worden waren, waren nach 6 Stunden 2,7 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden, aus den Schläuchen, die sechs Stunden bestrahlt worden waren, 2,5 µg/mL.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Messreihen sind nicht besonders groß; man kann sich aber leicht vorstellen, dass sie bei längeren Bestrahlungszeiten deutlicher ausfallen würden.

Durch den Einfall von Licht kann Ethacridinlactat also so verändert werden, dass es nicht mehr so gut analytisch erfasst werden kann. Ob dies auch die Wirkung beeinträchtigt, lässt sich mit den Ergebnissen aus den Freisetzungsversuchen nicht beurteilen; hierzu wäre ein anderer Versuchaufbau notwendig.

3.3.5.6 Einfluss des Sterilisierens auf die Freisetzung

Bevor die Harnleiterschienen in der Praxis verwendet werden können, müssen sie sterilisiert werden. Dazu wird das Verfahren der Gassterilisation mit Ethylenoxid verwendet. Es ist nun wichtig, zu überprüfen, dass Ethacridinlactat durch die Sterilisation nicht geschädigt wird. Einerseits soll dies durch einen mikrobiologischen Test überprüft werden (Abschnitte 3.4.3 und 3.4.4), andererseits durch einen Freisetzungsversuch.

In Abschnitt 3.3.5.4 wurde bereits der Einfluss des Alters auf das Freisetzungsniveau untersucht. Hier sollen nun die sterilisierten und unsterilisierten Schläuche einander gegenübergestellt werden:

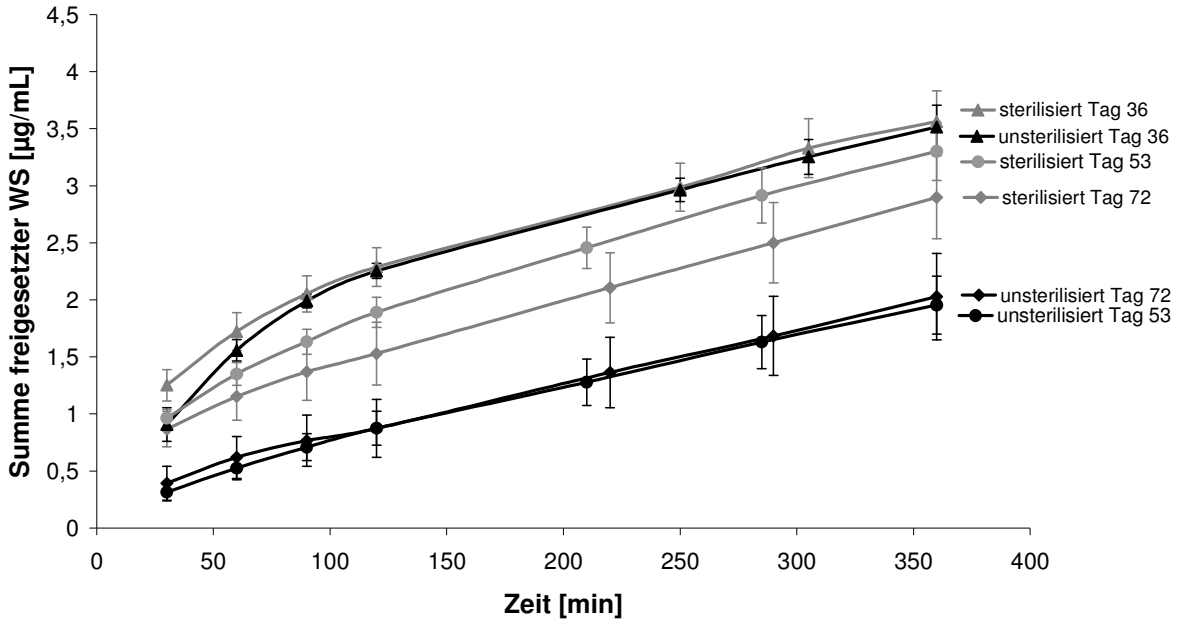


Abbildung 117: Vergleich von sterilisierten und unsterilisierten DLC-NH3-beschichteten Schläuchen, die zuvor in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollen worden waren, anhand ihrer Freisetzungskurven.

Die Messreihen von Tag 36 verlaufen für sterilisierte und nicht sterilisierte Schläuche gleich. Allerdings ist Tag 36 genau die Messreihe, die bei den unsterilisierten Schläuchen den Ausreißer nach oben darstellte.

Die Messungen von Tag 72 und Tag 53 ergeben dann auch entsprechend für die sterilisierten Schläuche ein deutlich höheres Freisetzungsniveau als für die unsterilisierten Schläuche.

Das bedeutet, dass durch den Sterilisationsvorgang der Wirkstoff nicht so verändert wurde, dass er schlechter mit Fluoreszenzspektroskopie erfassbar ist. Im Gegenteil ist er anscheinend

so verändert worden, dass er stärker erfasst wird als zuvor. Was dies jedoch für die Wirksamkeit bedeutet, kann mit einem Freisetzungsversuch nicht festgestellt werden, hierzu braucht man einen anderen Versuchsaufbau (vgl. hierzu die Abschnitte 3.4.3 und 3.4.4).

3.3.5.7 Einfluss des Freisetzungsmediums auf die Freisetzung

Zuletzt sollte noch untersucht werden, welchen Einfluss das Freisetzungsmedium auf die Freisetzung hat.

Dazu wurden wiederum 5 mm lange DLC-NH3-beschichtete Schläuche 3,5 Stunden in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen, getrocknet, mit Wasser gespült und wieder getrocknet.

Die Freisetzung erfolgte bei 37°C in PBS pH 7,3 0,012 M, Ammoniumchlorid-Puffer pH 9,0 0,08 M, in Acetatpuffer pH 4,5 0,14 M, sowie in synthetischem Urin, einer Mixtur aus einer Vielzahl von Salzen und Proteinen, die vom Projektpartner Experimentelle Urologie der Uniklinik in Bonn geliefert wurde:

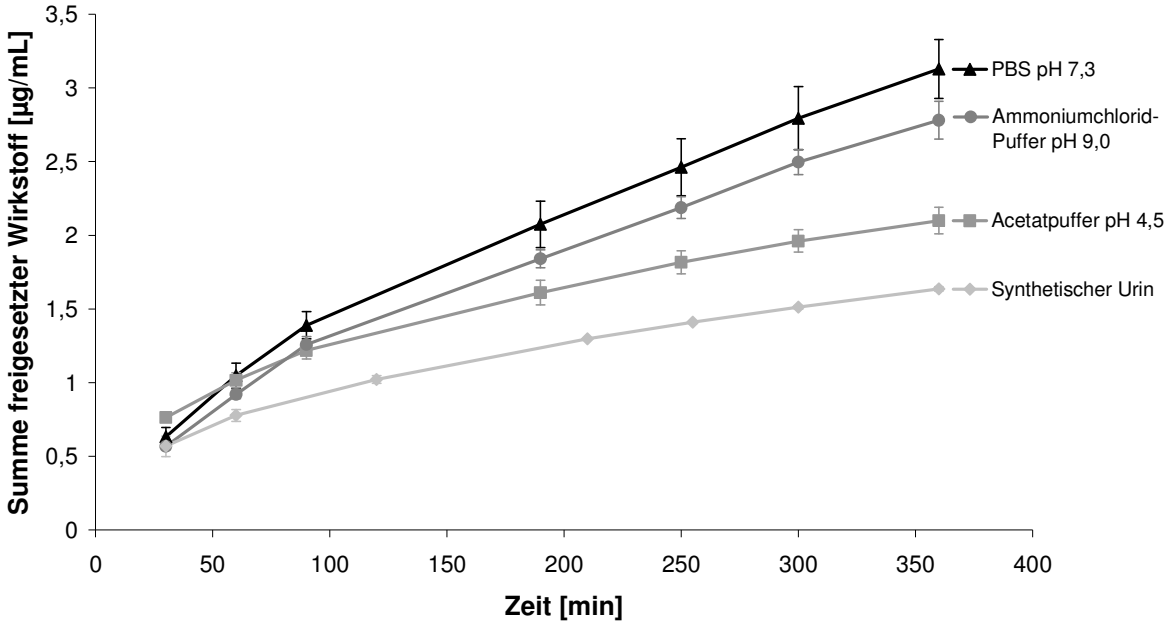


Abbildung 118: Freisetzung aus in Ethacridinlactat/Ethanol 1% gequollenen DLC-NH3-beschichteten Schläuchen in verschiedenen Puffersystemen.

Die Freisetzung bei neutralen pH-Werten in PBS war am höchsten. Nach 6 Stunden waren hier 3,1 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden. Im alkalischen Ammoniumchlorid-Puffer

waren es 2,8 µg/mL, im sauren Acetatpuffer 2,1 µg/mL und im synthetischen Urin nur 1,6 µg/mL.

Dass die Freisetzung in synthetischem Urin so gering war, lässt sich leicht erklären. Die Lösung ist durch die vielen enthaltenen Salze schon vor der Freisetzung am stärksten gesättigt. Entsprechend sind hier weniger Wassermoleküle als in den anderen Lösungen frei, um Ethacridinium- und Lactat-Moleküle zu solvatisieren.

Überraschend ist, dass im alkalischen Puffer eine höhere Freisetzung zu beobachten ist als im sauren, da bereits zuvor beobachtet wurde, dass Ethacridinlactat im alkalischen ausfällt. Allerdings wurden dort keine Puffersysteme verwendet, sondern konzentrierte Natronlauge. Die unterschiedliche Molarität der Pufferlösungen könnte eine Erklärung sein, denn der Ammoniumchlorid-Puffer ist 0,08 M, der Acetatpuffer dagegen mit 0,14 M etwas höher konzentriert.

Im neutralen Milieu löst sich Ethacridinlactat am besten; hier sind die höchsten Freisetzungen zu beobachten. Die Molarität der Puffersubstanzen ist hier am niedrigsten (0,012 M), bezieht man jedoch auch die nichtpuffernden Salze Natriumchlorid und Kaliumchlorid in die Berechnung ein, so ergibt sich eine Molarität von 0,15 M, PBS ist also tatsächlich noch etwas höher konzentriert als der Acetatpuffer. Anscheinend kann diese höhere Molarität aber durch den günstigeren pH-Wert kompensiert werden.

3.4 Mikrobiologische Untersuchungen

3.4.1 Agardiffusionstest

3.4.1.1 Klassischer Agardiffusionstest mit Filterpapier

Je 200 µL einer Bakteriensuspension aus *Escherichia coli* wurden gleichmäßig auf Agarplatten ausgestrichen. Auf die beimpften Agarplatten wurden unterschiedlich vorbehandelte Filterpapierstückchen gelegt und die Platte dann bei 37°C über Nacht bebrütet. Die bebrüteten Platten mit den ggf. entstandenen Hemmhöfen wurden photographiert.

Folgende Vorbehandlungen der Filterpapierstückchen wurden durchgeführt:

Als Positivvergleich wurden 3 µL einer 0,01%igen Ampicillin-Lösung auf die Filterpapierstückchen pipettiert, als Negativvergleich 5 µL Wasser. Als Proben wurden je 5 µL einer Ethacridinlactat-Lösung verschiedener Konzentration verwendet. Getestet wurden die Konzentrationen 0,05%, 0,1%, 0,5% und 1%.

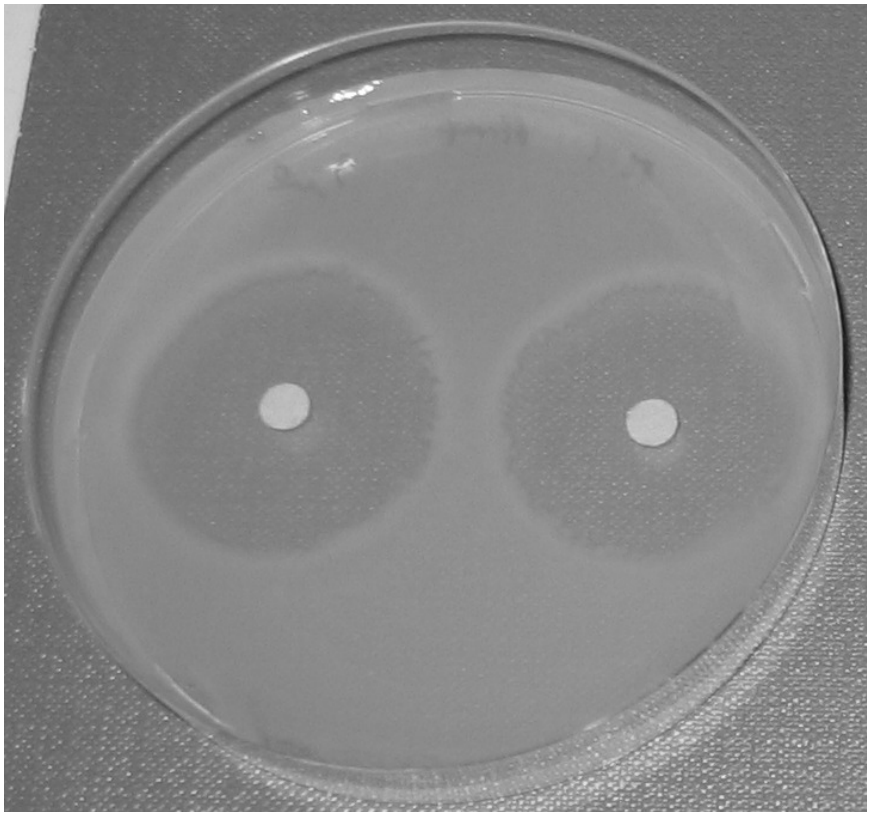


Abbildung 119: Agardiffusionstest mit 3 µL einer 1%igen Ampicillin-Lösung. Die Hemmhöfe um das Filterpapier sind sehr stark ausgeprägt.

Wie erwartet bildet sich beim Positivvergleich mit der Ampicillin-Lösung ein sehr deutlicher und großer Hemmhof (14 mm vom Rand des Filterpapiers bis zum Rand des Hemmhofs) aus.

Zu interpretieren ist dieser Umstand folgendermaßen: Je größer der Abstand vom Filterpapier ist, desto geringer ist die Konzentration des abdiffundierten Antibiotikums. Wenn sich ein sehr großer Hemmhof ausbildet, heißt das, dass sehr geringe Konzentrationen ausreichen, um eine Hemmung des Bakterienwachstums hervorzurufen, das Antibiotikum ist also sehr gut wirksam.

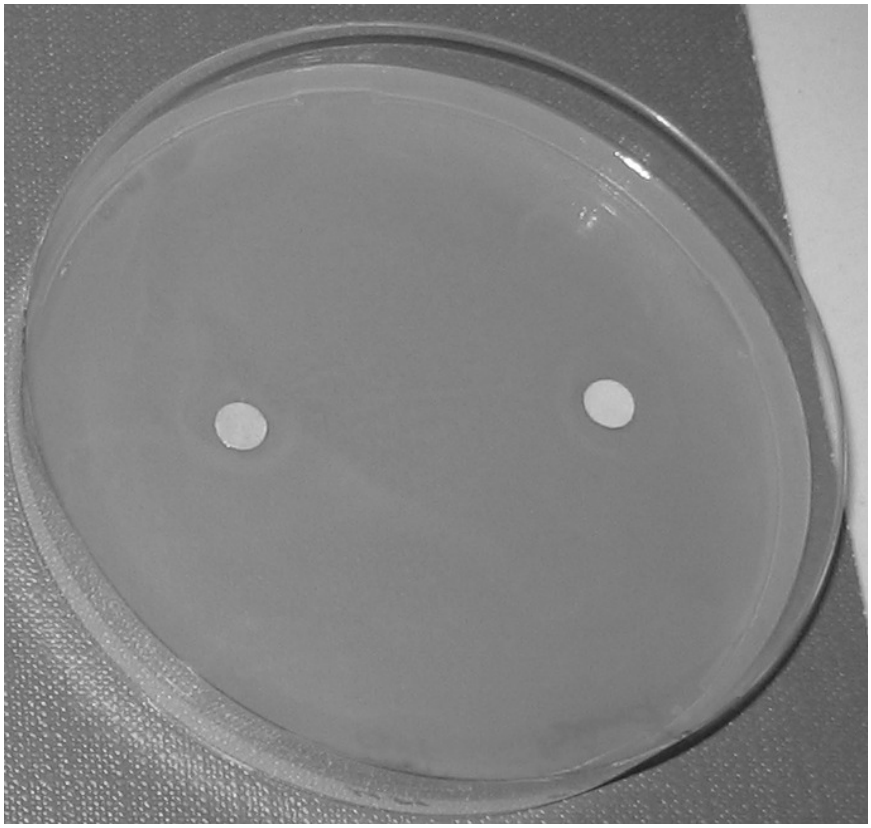


Abbildung 120: Negativvergleich im Agardiffusionstest: auf das Filterpapier wurden 5 µL Wasser aufgebracht. Es bilden sich keine Hemmhöfe um das Filterpapier herum aus.

Beim Negativvergleich mit Wasser ist erwartungsgemäß kein Hemmhof zu sehen.

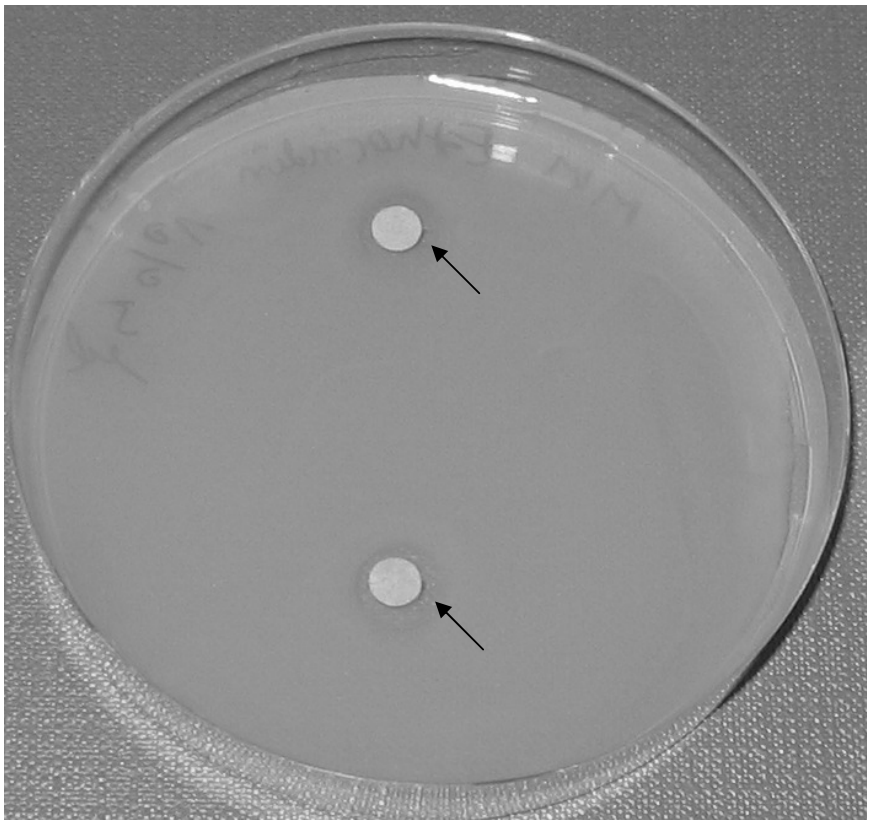


Abbildung 121: Agardiffusionstest mit der am höchsten konzentrierten Probelösung: 5 µL einer Ethacridinlactat-Lösung mit einer Konzentration von 1%. Es sind kleine Hemmhöfe zu erkennen: die Pfeilspitzen markieren die Grenzen des Hemmhofes, die sonst nicht so gut zu erkennen wären.

Die 1%ige Ethacridinlactat-Lösung zeigt eine wachstumshemmende Wirkung, die zwar nicht so ausgeprägt ist wie bei der Ampicillin-Lösung, aber doch ganz klar vorhanden. Es ergibt sich ein Hemmhof von 1,7 mm (Abstand vom Rand des Filterpapiers bis zum Rand des Hemmhofs). Um mit Ethacridinlactat die gleiche Wirkung zu erzielen wie mit Ampicillin, bräuchte man deutlich höhere Konzentrationen.

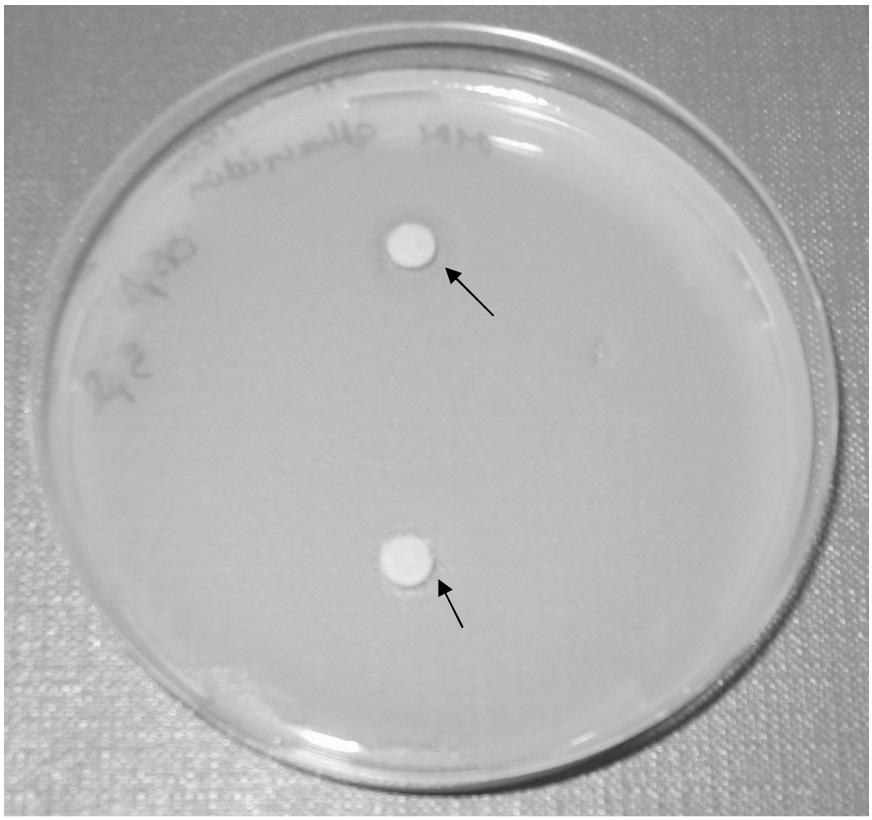


Abbildung 122: Agardiffusionstest mit der am nächsthöchsten konzentrierten Probelösung: 5 µL einer Ethacridinlactat-Lösung mit einer Konzentration von 0,5%. Die Hemmhöfe sind gerade noch zu erkennen, sie sind etwas kleiner als bei der 1%igen Lösung. Die Pfeilspitzen markieren die Grenzen des Hemmhofes, die sonst nicht so gut zu erkennen wären.

Der Hemmhof bei den Filterpapierstückchen mit der 0,5%igen Ethacridinlactat-Lösung ist mit 0,9 mm noch etwas kleiner als der, der sich bei der 1%igen Lösung gebildet hat (1,7 mm). Da er aber noch erkennbar vorhanden ist, ist eine Wirkung für diese Konzentration nachgewiesen.

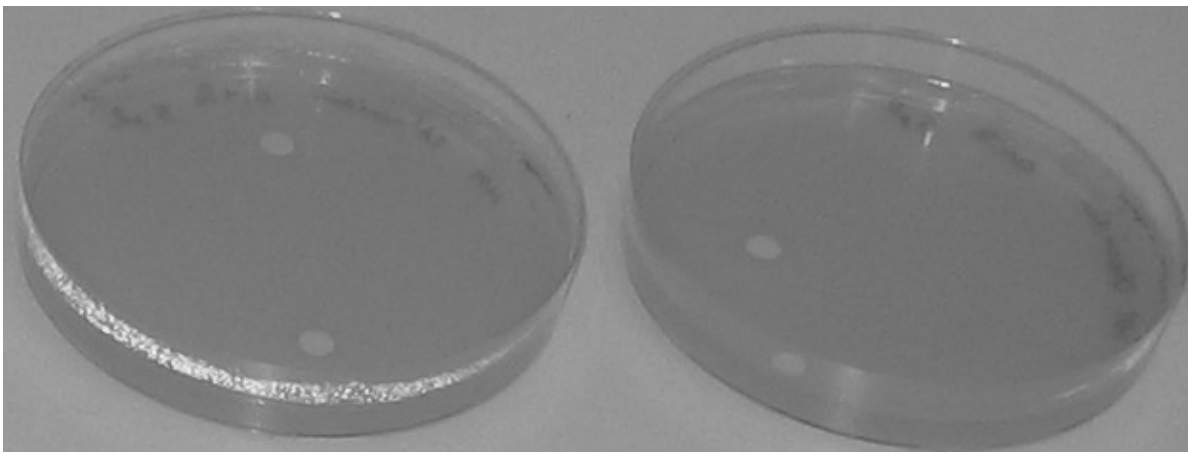


Abbildung 123: Agardiffusionstest für Ethacridinlactat-Lösungen der Konzentrationen 0,1% (links) und 0,05% (rechts). Um keines der Filterpapierstückchen bildet sich ein erkennbarer Hemmhof aus.

Bei den beiden niedrigsten getesteten Konzentrationen von Ethacridinlactat (0,1% und 0,05%) konnte keine Hemmhofbildung um die Filterpapierstückchen beobachtet werden. Diese Konzentrationen reichen also offenbar nicht aus, um eine Wachstumshemmung auf einem Bakterienrasen hervorzurufen.

Die Grenze für die wirksame Ethacridinlactat-Konzentration gegen *Escherichia coli* muss also zwischen 0,1 und 0,5% liegen.

3.4.1.2 Modifizierter Agardiffusionstest mit Schläuchen

Je 200 µL einer Bakteriensuspension aus *Escherichia coli* wurden gleichmäßig auf Agarplatten ausgestrichen. In die beimpften Agarplatten wurden unterschiedlich vorbehandelte Schlauchstücke gesteckt und die Platte dann bei 37°C über Nacht bebrütet. Die bebrüteten Platten mit den ggf. entstandenen Hemmhöfen wurden mit einer Geldokumentationsanlage photographiert. Die Kamera liefert Schwarz-Weiß-Aufnahmen. Das besondere ist, dass man als Beleuchtung sowohl Weißlicht als auch UV-Licht wählen kann. Da Ethacridinlactat bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert, wurden Aufnahmen mit beiden Lichtquellen gemacht. Auf den Aufnahmen mit Weißlicht sind die Hemmhöfe deutlicher zu erkennen, auf denen mit UV-Licht sieht man, wie weit Ethacridinlactat durch den Agar diffundiert ist.

Die einzelnen Schlauchstücke wurden folgendermaßen vorbehandelt: ein Schlauchstück wurde gar nicht behandelt, eines wurde in reinem Lösungsmittel gequollen und fünf in einer Ethacridinlactat-Lösung in dem entsprechenden Lösungsmittel. Von diesen fünf Proben wurden drei erst einmal ohne weitere Behandlung getrocknet, eine wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel gespült und eine mit Wasser. Von den drei getrockneten, wirkstoffhaltigen und noch ungespülten Proben wurde eine mit dem verwendeten reinen Quellmittel gespült und eine mit Wasser. Die dritte Probe wurde ungespült als Positivvergleich verwendet.

Wie die Schlauchstücke auf der Agarplatte verteilt wurden, ist den Legenden neben den Photographien zu entnehmen. Die Bilder, die unter UV-Bestrahlung aufgenommen wurden, befinden sich stets auf der linken Seite und sind überdies am schwarzen Hintergrund leicht zu erkennen. Da es sich um die gleiche Platte handelt wie auf dem rechten Bild, das mit Weißlicht aufgenommen wurde, sind die Schläuche auf der gleichen Position auch genauso vorbehandelt.

Die Angaben über die Größe des Hemmhofs beziehen sich stets auf den Abstand zwischen Filterpapier und der beginnenden Bakterienbesiedlung. Bei unregelmäßigen Hemmhöfen wird der durchschnittliche Abstand angegeben.

3.4.1.2.1 Agardiffusionstest mit in Aceton gequollenen Schläuchen

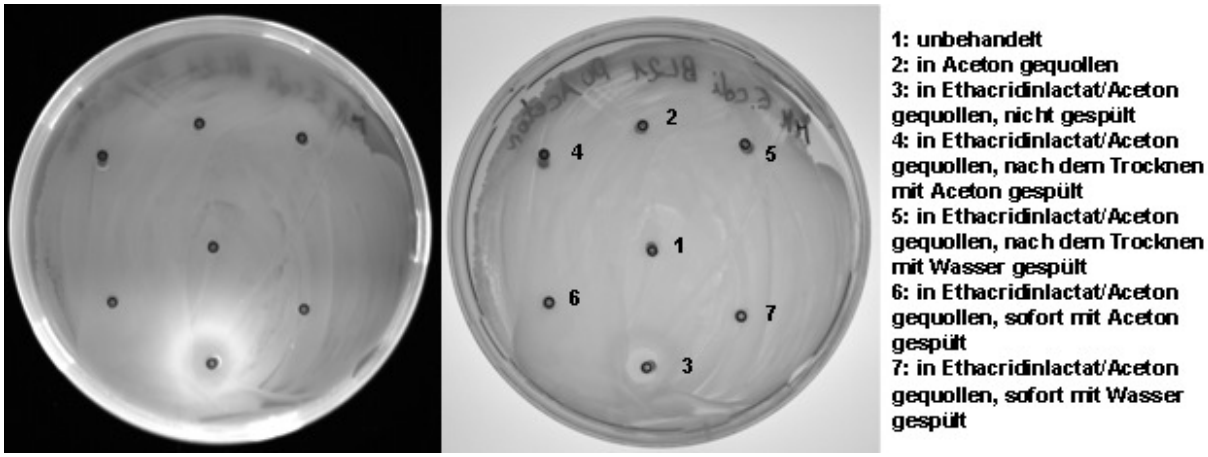


Abbildung 124: Agardiffusionstest mit in Aceton gequollenen Schläuchen. Das linke Bild wurde während der Bestrahlung mit UV-Licht aufgenommen, das rechte mit Weißlicht.

Bei den in Aceton gequollenen Schläuchen ist nur bei Probe 3, also dem ungespülten Schlauch mit Ethacridinlactat, ein Hemmhof zu erkennen (1,9 mm). Auf der mit UV-Licht bestrahlten Platte sieht man bei dieser Probe einen leuchtenden Ring um das Schlauchstück, der deutlich größer ist als der hier ebenfalls zu erkennende Hemmhof.

Man sieht also, dass der Wirkstoff deutlich weiter diffundiert als er seine Wirkung entfaltet. In den weiter entfernten Regionen reichen die Wirkstoffkonzentrationen also nicht aus, um das Bakterienwachstum zu hemmen.

Außerdem wird deutlich, dass man durch Quellen des Schlauchsmaterials offenbar nicht genügend Ethacridinlactat einbringen kann, um einen Hemmhof in einem *Escherichia coli*-Rasen zu erzeugen. Der Hemmhof, der durch Probe 3 erzeugt wurde, kann nicht durch eingelagertem Wirkstoff zustande gekommen sein, da in diesem Fall auch bei den anderen wirkstoffhaltigen Proben Hemmhöfe zu erkennen sein müssten.

3.4.1.2.2 Agardiffusionstest mit in Dioxan gequollenen Schläuchen

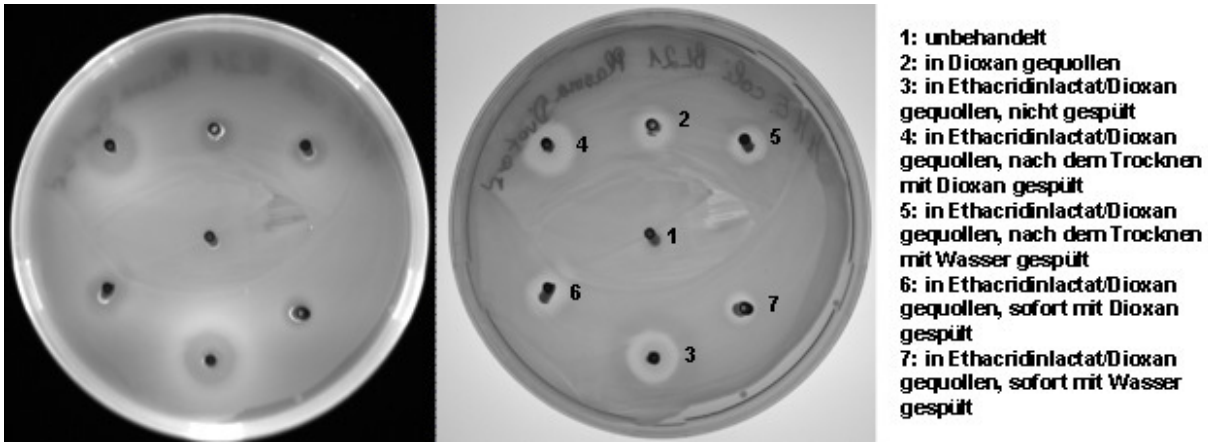


Abbildung 125: Agardiffusionstest mit in Dioxan gequollenen Schläuchen. Das linke Bild wurde während der Bestrahlung mit UV-Licht aufgenommen, das rechte mit Weißlicht.

Bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen kam bei allen Proben außer bei dem gänzlich unbehandelten Schlauch ein Hemmhof zustande.

Dass bei der Positivprobe 3 ein Hemmhof entstehen würde, war zu erwarten (4,9 mm). Auch dass durch das Spülen mit Dioxan das Ethacridinlactat nicht vollständig von der Oberfläche der Schläuche entfernt wird, war bereits bekannt (vgl. hierzu Abschnitt 3.3.1.2). Daher sind auch die Hemmhöfe um die Proben 4 und 6 (3,3 mm bzw. 2,7 mm) gut zu erklären.

Allerdings zeigt auch der Negativvergleich von Probe 2 einen Hemmhof, der in seinem Durchmesser dem der Probe 6 (sofort mit Dioxan gespülter Schlauch) entspricht (2,7 mm). Die hervorgerufene Wirkung kommt also möglicherweise gar nicht allein durch Ethacridinlactat zustande, sondern auch durch eingelagerte Dioxan-Moleküle.

Auch die beiden mit Wasser gespülten Proben 5 und 7 führten zur Bildung eines Hemmhofes. Diese haben jeweils einen etwas geringeren Durchmesser als die entsprechenden mit Dioxan gespülten Schläuche (jeweils 1,6 mm). Dies kann man einerseits auf die im Vergleich zu Dioxan bessere Spülwirkung des Wassers zurückführen, andererseits befindet sich in diesen Schläuchen (Proben 5 und 7) aller Wahrscheinlichkeit nach kein eingelagertes Dioxan mehr, welches ebenfalls das Bakterienwachstum hemmen würde.

Bereits in den Freisetzungsversuchen konnte man sehen, dass aus den in Dioxan gequollenen Schläuchen mehr Wirkstoff freigesetzt wird als aus den Schläuchen, die in anderen Lösungsmitteln gequollen wurden. Dieser Umstand deckt sich mit den beim Agardiffusionstest gemachten Beobachtungen, dass sich bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen die größten Hemmhöfe ausbilden.

3.4.1.2.3 Agardiffusionstest mit in Ethanol gequollenen Schläuchen

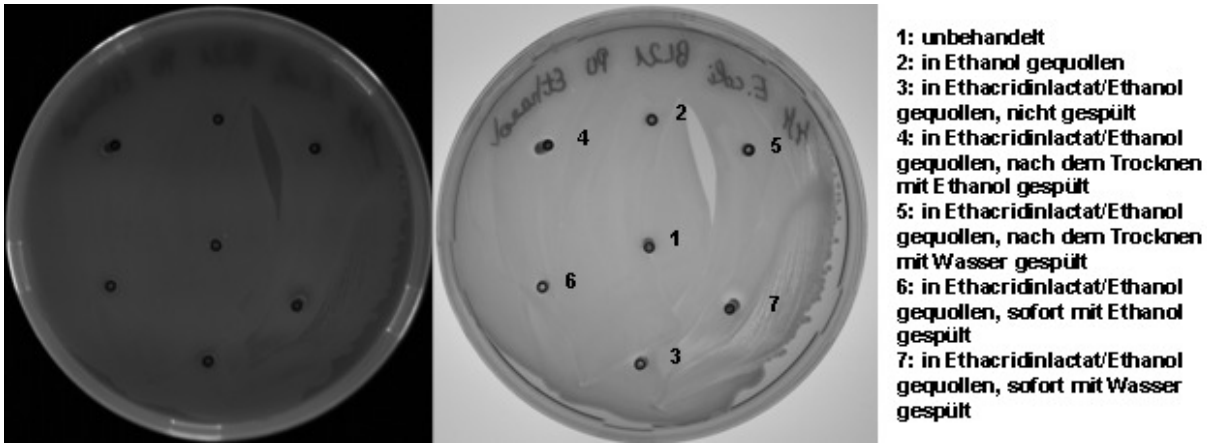


Abbildung 126: Agardiffusionstest mit in Ethanol gequollenen Schläuchen. Das linke Bild wurde während der Bestrahlung mit UV-Licht aufgenommen, das rechte mit Weißlicht.

Die Interpretation der Aufnahmen der in Ethanol gequollenen Schläuche gestaltet sich schwierig, da sich zwar bei einigen Proben Hemmhöfe gebildet haben, diese aber so klein sind, dass sie teilweise kaum zu erkennen sind.

Schon die Positivprobe 3 weist nur einen sehr kleinen Hemmhof auf (nur 0,7 mm). Die anhaftenden Wirkstoffmengen an der Oberfläche der ungespülten schwanken naturgemäß sehr stark, wie auch in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wurde. Trotzdem ist es natürlich ungünstig, dass gerade hier bei der Positivprobe nur eine so geringe Menge Ethacridinlactat an der Oberfläche hängen geblieben ist.

Die Hemmhöfe der Proben 4, 6 und 7 sind mit 0,3 mm etwas kleiner als der von Probe 3, bei Probe 5 ist kein Hemmhof zu erkennen. Bei den beiden Negativvergleichsproben 1 und 2 sind erwartungsgemäß ebenfalls keine Hemmhöfe zu sehen. Dass bei den drei von vier wirkstoffhaltigen, gespülten Schläuchen (Proben 4, 6 und 7) Hemmhöfe vorhanden sind, lässt eine antibakterielle Wirksamkeit in unmittelbarer Umgebung der Schläuche auch in vivo erhoffen. Allerdings ist die Methode durch die kleinen Hemmhöfe nicht so eindeutig wie erhofft. Daher wird in Abschnitt 3.4.2 eine andere Methode eingeführt, die die Wirksamkeit der Einbringung des Ethacridinlactats in das Schlauchmaterial nachweisen soll.

3.4.1.2.4 Agardiffusionstest mit in Methanol gequollenen Schläuchen

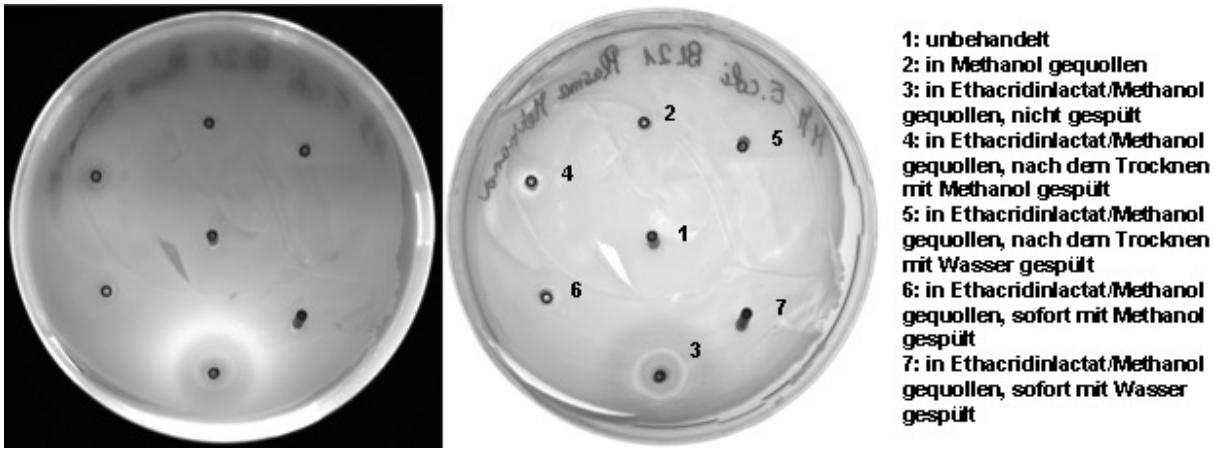


Abbildung 127: Agardiffusionstest mit in Methanol gequollenen Schläuchen. Das linke Bild wurde während der Bestrahlung mit UV-Licht aufgenommen, das rechte mit Weißlicht.

Bei den in Methanol gequollenen Schläuchen sind die Hemmhöfe wieder deutlicher zu erkennen, dafür ist aber bei den wirkstoffhaltigen, mit Wasser gespülten Schläuchen (Proben 5 und 7) kein Hemmhof vorhanden.

Auch bei den Negativvergleichen (Proben 1 und 2) sind keine Hemmhöfe entstanden. Beim Positivvergleich (Probe 3) ist abgesehen von dem ausgeprägten Hemmhof (4,7 mm) auch auf der Aufnahme mit UV-Licht ein sehr heller Ring um den Hemmhof herum zu erkennen, der durch freies, fluoreszierendes Ethacridinlactat zustande kommt.

Der Hemmhof der Probe, die erst nach dem Trocknen mit Methanol gespült wurde (Probe 4) ist etwas größer (1,1 mm) als der der sofort mit Methanol gespülten Probe 6 (0,6 mm). Der Interpretation in Abschnitt 3.3.2 folgend, dürfte dieser Unterschied dadurch entstehen, dass der Wirkstoff durch das Trocknen vor dem Spülen besser in die Polymermatrix eingeschlossen werden konnte.

Dass bei den Proben 5 und 7 kein Hemmhof zu sehen ist, muss daran liegen, dass mit Wasser der Wirkstoff zu gründlich aus den Schläuchen ausgespült werden konnte. Nach dem Spülen blieb nur eine so geringe Menge an Ethacridinlactat zurück, dass der Diffusionsdruck nicht mehr stark genug war, um eine wachstumshemmende Konzentration um den Schlauch herum zu erreichen.

3.4.1.2.5 Agardiffusionstest mit in Wasser gequollenen Schläuchen

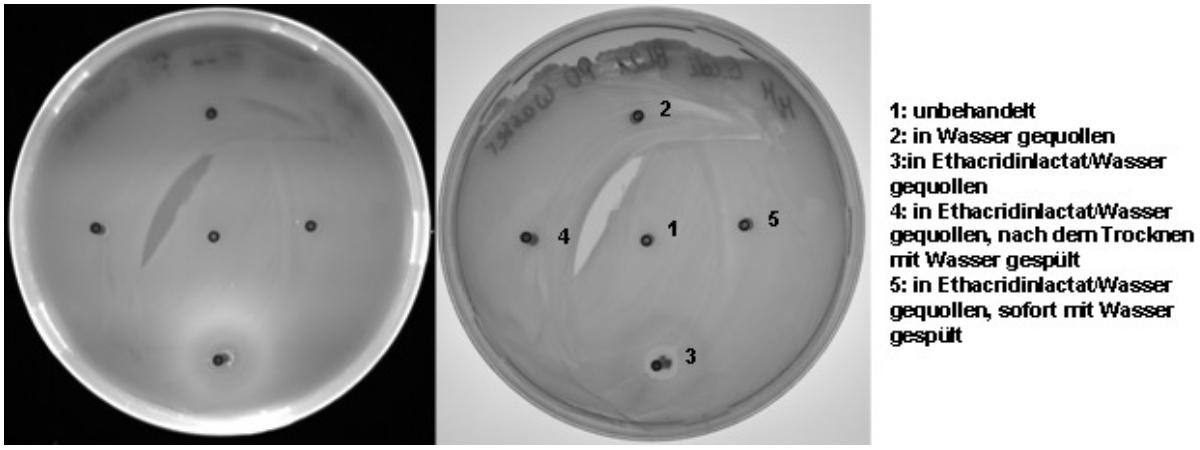


Abbildung 128: Agardiffusionstest mit in Wasser gequollenen Schläuchen. Das linke Bild wurde während der Bestrahlung mit UV-Licht aufgenommen, das rechte mit Weißlicht.

Bei den in Wasser gequollenen Schläuchen kann man nur bei der Positivprobe 3 einen Hemmhof erkennen (2,6 mm). Sowohl die beiden Negativvergleiche 1 und 2 als auch die beiden Proben 4 und 5 zeigen keine wachstumshemmende Wirkung in ihrer Umgebung.

Das deckt sich mit den Beobachtungen aus Abschnitt 3.3, wonach die Schläuche in Wasser gar nicht genug aufquellen um Wirkstoff aufnehmen zu können. Dort konnte keine Freisetzung gemessen werden. Wenn kein Wirkstoff aus den Schläuchen austritt, kann auch ein Agardiffusionstest keine positiven Ergebnisse liefern.

3.4.1.2.6 Zusammenfassung

Die stärksten Effekte waren bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen zu beobachten. Allerdings bildete sich hier auch bei dem Negativvergleich des in reinem Dioxan gequollenen Schlauchstückes ein Hemmhof aus. Die wachstumshemmende Wirkung ist hier also nicht allein auf das Ethacridinlactat zurückzuführen, sondern auch auf das Quellmittel Dioxan.

Bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen waren bei allen Proben Hemmhöfe vorhanden, die Negativproben brachten negative Ergebnisse. Die Hemmhöfe waren allerdings einschließlich desjenigen der Positivprobe nicht sehr ausgeprägt, so dass eine Interpretation der Ergebnisse nicht immer mit der erforderlichen Sicherheit erfolgen kann.

Möglicherweise war genau das auch das Problem bei den in Methanol gequollenen Schläuchen, wo bei den beiden mit Wasser gespülten Proben kein Hemmhof zu erkennen war. Die beiden mit Methanol gespülten Schläuche bildeten genauso wie die Positivprobe Hemmhöfe aus.

Bei den in Wasser bzw. Aceton gequollenen Schläuchen bildete nur die Positivprobe einen Hemmhof aus. In Übereinstimmung mit den Freisetzungsversuchen lässt dies den Schluss zu, dass diese beiden Lösungsmittel ungeeignet sind, das gegebene Polyurethan-Material zur Wirkstoffaufnahme aufquellen zu lassen.

3.4.2 Nachweis der Wirksamkeit der Wirkstoffeinbringung durch Quellen

Die Wirksamkeit kann nur durch einen relativen Vergleich bestimmt werden, d.h. es wird getestet, ob die wirkstoffhaltigen Schläuche in diesem Assay besser abschneiden als die wirkstofffreien Schläuche.

Dazu wurden die 5 mm langen Polyurethan-Schlauchstücke mit den Beschichtungen DLC2, DLC-NH3 und DLC-O, sowie unbeschichtete Schläuche (PU) 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen, getrocknet und anschließend mit dreimal 20 mL Wasser gespült. Nach dem nochmaligen Trocknen wurden die Schläuche noch einmal 10 Minuten in Ethanol gelegt und ein letztes Mal getrocknet. Die Vergleichsschläuche wurden ebenfalls 3,5 Stunden in Ethanol gequollen, allerdings ohne Ethacridinlactat und danach getrocknet. (Der Schritt des 10minütigen Inkubierens der Proben in Ethanol wurde bei den in Abschnitt 3.4.7 dargestellten Ergebnissen leider vergessen.)

Diese Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Es wird bei jeder Gegenüberstellung eine Referenzprobe ausgewählt, die auf 100% gesetzt wird, so dass die Skalierung auf alle drei dargestellten Lösungen passt. In der Regel ist die Referenzprobe die Probe ohne Wirkstoff. Bei der Gegenüberstellung der Beschichtungen (Abschnitt 3.4.6) wurden als Referenz jeweils die unbeschichteten Schläuche ausgewählt.

In der folgenden Abbildung ist der Vergleich der wirkstoffhaltigen mit den wirkstofffreien DLC2-beschichteten Schläuchen dargestellt.

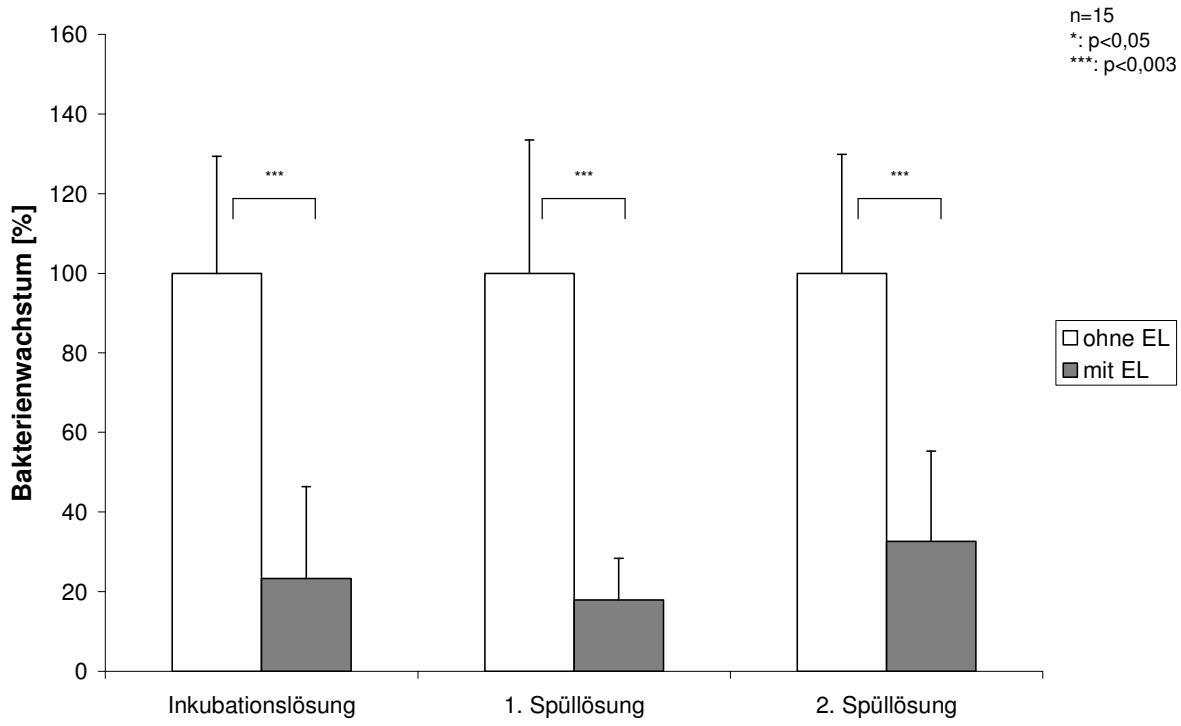


Abbildung 129: Vergleich von wirkstoffhaltigen mit wirkstofffreien Schläuchen mit DLC2-Beschichtung. Abgesehen von der Einbringung von Ethacridinlactat wurden beide Schlaucharten auf die gleiche Weise vorbehandelt.

Deutlich erkennt man hier die Unterschiede zwischen den beiden Messreihen. Bei den Schlauchstücken, die in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen wurden, sind die Keimzahlen deutlich geringer als bei den Schläuchen, die nur mit reinem Ethanol behandelt wurden. Bei der Inkubationslösung der wirkstoffhaltigen Schläuche („mit EL") beträgt die Keimzahl 23% der Keimzahl der Inkubationslösung der wirkstofffreien Schläuche („ohne EL"). Bei der ersten Spüllösung sind es dann 18%, bei der zweiten Spüllösung 33%.

Um zu klären, ob diese Unterschiede signifikant sind, wurde für jede der Lösungen ein t-Test durchgeführt, in dem die beiden Messreihen miteinander verglichen wurden. Die Ergebnisse des t-Tests wurden direkt im Diagramm dargestellt. Die drei Sternchen *** stehen für einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den beiden verglichenen Mittelwerten, d.h. der p-Wert ist kleiner als 0,003.

Als nächstes erfolgt die Darstellung der DLC-O-beschichteten Schläuche mit und ohne Ethacridinlactat (EL):

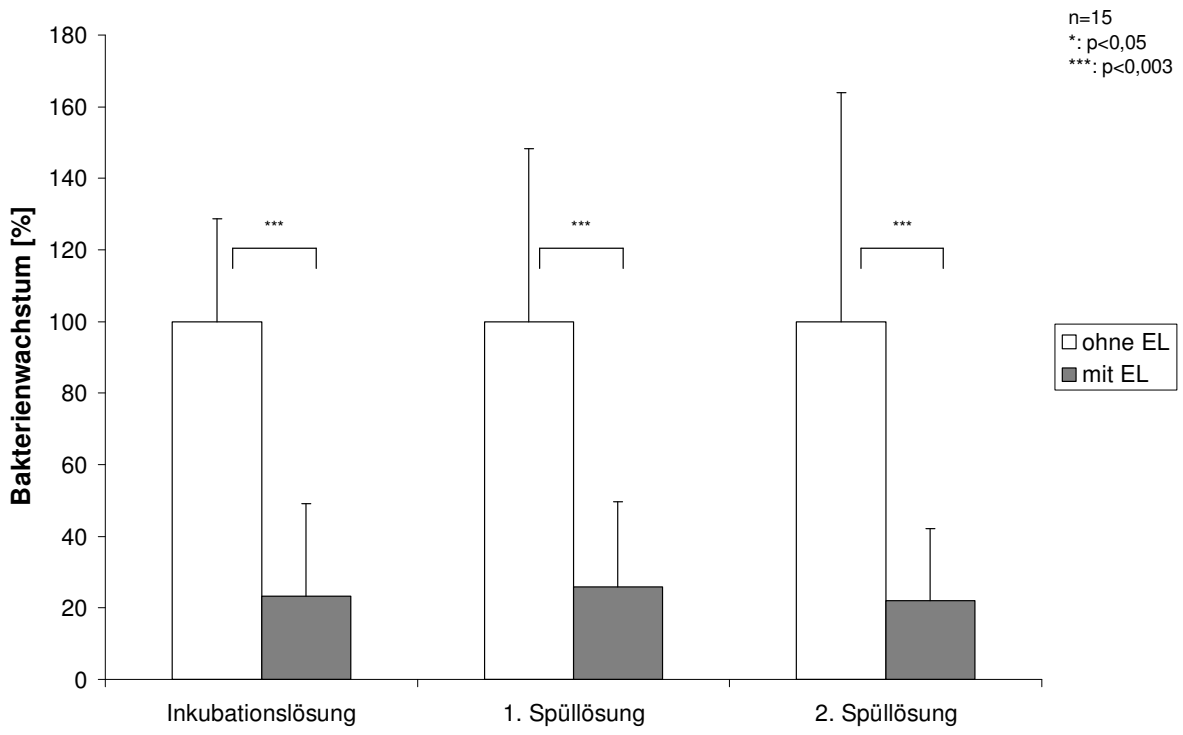


Abbildung 130: Vergleich von wirkstoffhaltigen mit wirkstofffreien Schläuchen mit DLC-O-Beschichtung. Abgesehen von der Einbringung von Ethacridinlactat wurden beide Schlaucharten auf die gleiche Weise vorbehandelt.

Auch bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen erkennt man sofort, dass die Keimbelastung bei den wirkstofffreien Schläuchen deutlich höher ist als bei den wirkstoffhaltigen. Bei der Inkubationslösung beträgt die Keimbelastung der wirkstoffhaltigen Schläuche 23% der Keimbelastung der wirkstofffreien Schläuche. Bei der ersten Spüllösung sind es 26%, bei der zweiten Spüllösung 22%.

Um zu klären, ob diese Unterschiede signifikant sind, wurde für jede der Lösungen ein t-Test durchgeführt, in dem die beiden Messreihen miteinander verglichen wurden. Das Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 130 dargestellt. Bei allen drei Vergleichen besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den wirkstofffreien und den wirkstoffhaltigen Schläuchen.

Bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen ergab sich das folgende Bild:

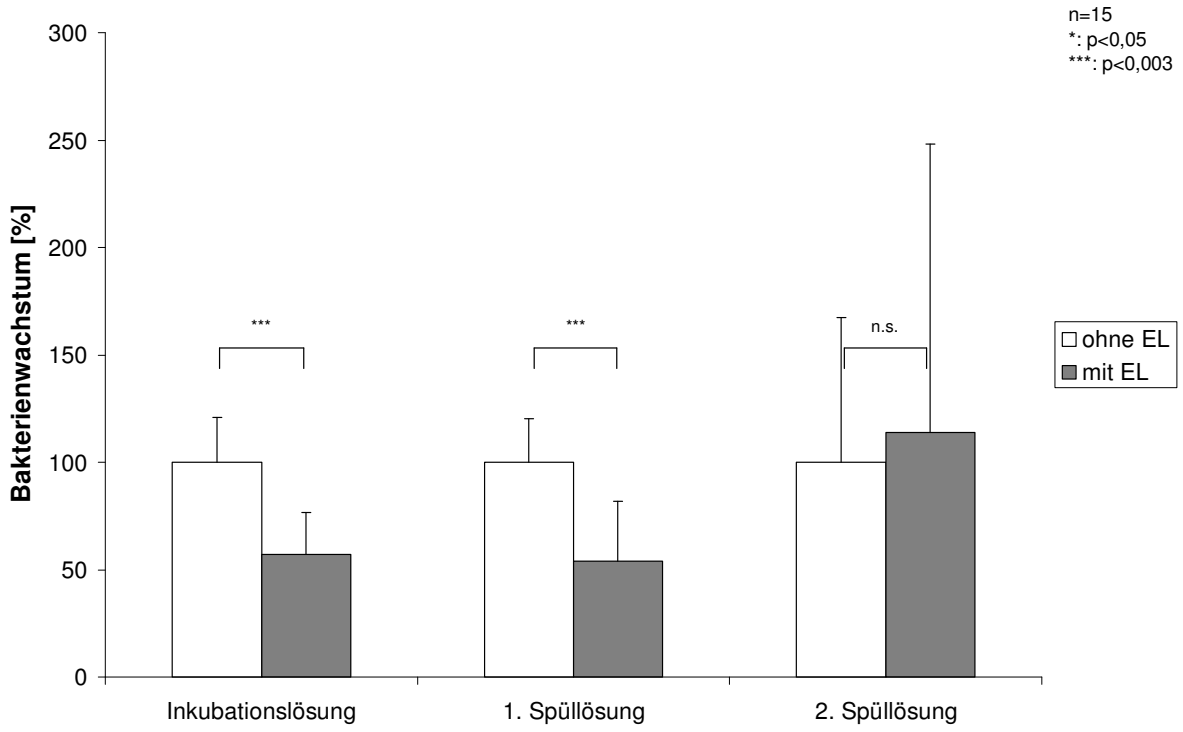


Abbildung 131: Vergleich von wirkstoffhaltigen mit wirkstofffreien Schläuchen mit DLC-NH3-Beschichtung. Abgesehen von der Einbringung von Ethacridinlactat wurden beide Schlaucharten auf die gleiche Weise vorbehandelt.

Im Vergleich der DLC-NH3-beschichteten Schläuche zeigt sich kein so deutlicher Unterschied wie bei der DLC2- und der DLC-O-Beschichtung. Die Keimbelastung ist zwar auch hier bei der Inkubationslösung und der ersten Spüllösung bei den wirkstofffreien Schläuchen hochsignifikant höher als bei den wirkstoffhaltigen, die Keimzahlen der wirkstoffhaltigen Proben beträgt 57% (Inkubationslösung) bzw. 54% (erste Spüllösung) der Keimzahl der wirkstofffreien Proben. Bei der zweiten Spüllösung jedoch ist die Keimbelastung bei den wirkstoffhaltigen Schläuchen 14% höher als bei den wirkstofffreien Schläuchen. Dieser Unterschied ist allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

Der Vergleich der unbeschichteten Schläuche mit und ohne Ethacridinlactat wird in der folgenden Abbildung dargestellt:

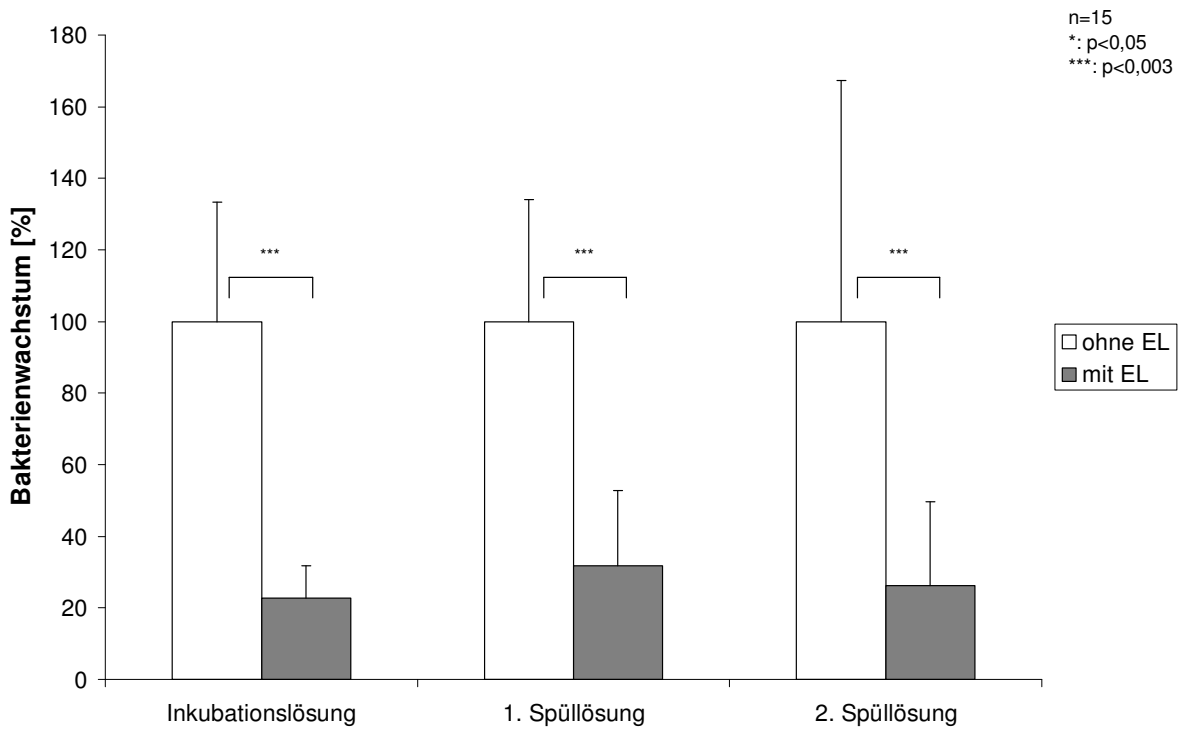


Abbildung 132: Vergleich von wirkstoffhaltigen mit wirkstofffreien Schläuchen ohne Beschichtung. Abgesehen von der Einbringung von Ethacridinlactat wurden beide Schlaucharten auf die gleiche Weise vorbehandelt.

Bei den unbeschichteten Schläuchen fällt der Vergleich wiederum sehr deutlich aus. Bei allen drei Lösungen ist die Keimbelastung bei den wirkstoffhaltigen Schläuchen deutlich geringer als bei den wirkstofffreien Schläuchen. Bei der Inkubationslösung beträgt die Keimzahl der wirkstoffhaltigen Schläuche 23% der Keimzahl der wirkstofffreien Schläuche, bei der ersten Spüllösung sind es 32%, bei der zweiten Spüllösung 26%. Alle Unterschiede sind hochsignifikant, die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 0,3%.

Mit dem Assay konnte also in vitro nachgewiesen werden, dass die Einbringung von Ethacridinlactat in die Polyurethanmatrix das Bakterienwachstum und die Anhaftung der Bakterien auf den Schläuchen verringert. Die Ergebnisse waren mit einer Ausnahme hochsignifikant. Am wenigsten ausgeprägt war die Wirksamkeit bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen.

3.4.3 Einfluss des Sterilisierens auf die antibakterielle Wirksamkeit

Die Harnleiterschienen müssen zur Anwendung steril sein. Der Hersteller hat bereits ein für das Kathetermaterial geeignetes Sterilisationsverfahren bestimmt. Es handelt sich um eine Gassterilisation mit Ethylenoxid. Es ist nun sehr wichtig, zu untersuchen, ob der im Polyurethan enthaltene Wirkstoff durch den Sterilisationsvorgang so verändert wird, dass er nicht mehr wirksam ist. Dazu werden Stücke von sterilisierten Schläuchen mit Stücken von unsterilisierten Schläuchen und mit Stücken von wirkstofffreien Schläuchen verglichen. Die Keimzahlen müssten theoretisch zwischen den Keimzahlen der beiden Vergleiche liegen. Idealerweise würden sich die Keimzahlen auf den sterilisierten Proben nicht von denen der unsterilisierten, wirkstoffhaltigen Proben unterscheiden.

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Die zu sterilisierenden Proben (Polyurethan-Schläuche mit den Beschichtungen DLC2, DLC-O und DLC-NH3, sowie unbeschichtete Schläuche) wurden am Stück (vgl. Abbildung 19 in Abschnitt 2.2.1.2.2) für 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung gequollen, anschließend getrocknet, zwei Tage später mit Wasser gespült und wieder getrocknet. Danach wurden die Proben zum Sterilisieren nach Achenmühle geschickt. Nach etwa einem Monat kamen die sterilisierten Proben zurück.

Die beiden Vergleichsproben wurden erst vorbereitet, als die sterilisierten Proben angekommen waren. Diese Proben wurden in 5 mm langen Stücken gequollen, und zwar entweder 3,5 Stunden in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung oder in reinem Ethanol. Die Schlauchstücke wurden getrocknet, die wirkstoffhaltigen Schlauchstücke mit dreimal 20 mL Wasser gespült und wieder getrocknet. Alle Proben wurden unter der Sterilbank noch einmal 10 Minuten mit Ethanol behandelt und getrocknet, bevor der eigentliche Versuch durchgeführt wurde. Diese Proben wurden einander bereits in Abschnitt 3.4.2 gegenübergestellt.

Die so vorbereiteten Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch angeimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Die wirkstofffreien Schläuche wurden dann als Bezugspunkt ausgewählt und auf 100% gesetzt, damit die Skalierung für die drei Lösungen einheitlich ist:

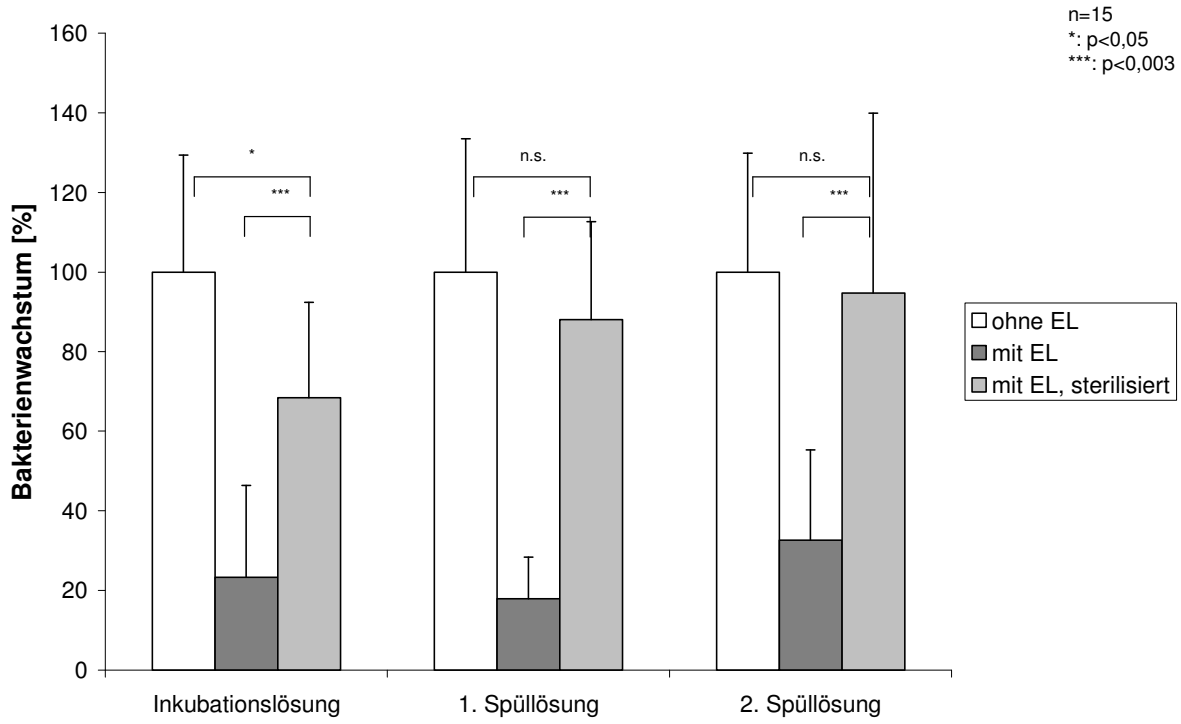


Abbildung 133: Vergleich von sterilisierten mit wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Schläuchen, jeweils mit DLC2-Beschichtung.

Der Vergleich von wirkstofffreien („ohne EL“) mit wirkstoffhaltigen, unsterilisierten („mit EL“) Schläuchen wurde bereits in Abschnitt 3.4.2 angestellt. Hier sollen nur die Vergleiche der sterilisierten Schläuche mit den unsterilisierten, wirkstoffhaltigen Schläuchen sowie mit den wirkstofffreien Schläuchen behandelt werden.

Auf den ersten Blick sieht man bereits, dass der Balken, der für die sterilisierten Proben steht, sich von seiner Höhe her zwischen den Balken bewegt, die zu den wirkstofffreien bzw. zu den wirkstoffhaltigen, unsterilisierten Schläuchen gehören. Die Keimzahlen sind bei den sterilisierten Schläuchen mit Ethacridinlactat also doch deutlich höher als bei den unsterilisierten Schläuchen mit Ethacridinlactat, aber niedriger als bei den Schläuchen ohne Ethacridinlactat.

Bei der Inkubationslösung beträgt die Keimzahl der unsterilisierten Schläuche mit Ethacridinlactat 23%, die der sterilisierten Schläuche 68%. Bei der ersten Spüllösung sind es 18% und 88%, bei der zweiten Spüllösung 33% und 95%.

Die Unterschiede zwischen den sterilisierten und unsterilisierten Schläuchen mit Ethacridinlactat sind allesamt hochsignifikant, die Unterschiede zwischen wirkstofffreien und sterilisierten Schläuchen sind größtenteils nicht signifikant.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Ethacridinlactat durch die Sterilisation – zumindest teilweise – inaktiviert wird.

Allerdings wurde bei der Versuchsplanung nicht alles beachtet, was Beachtung verdient gehabt hätte. Die sterilisierten Schläuche unterscheiden sich von den Vergleichsproben abgesehen von der Sterilisierung in einem weiteren Parameter: Sie sind einen Monat älter. Dieser Parameter der Alterung von Schlauchmaterial und eingebrachtem Wirkstoff wurde in diesem Experiment nicht beachtet, sein Einfluss wurde nachträglich untersucht (vgl. hierzu Abschnitt 3.4.4).

Bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen stellt sich die Sachlage wie folgt dar:

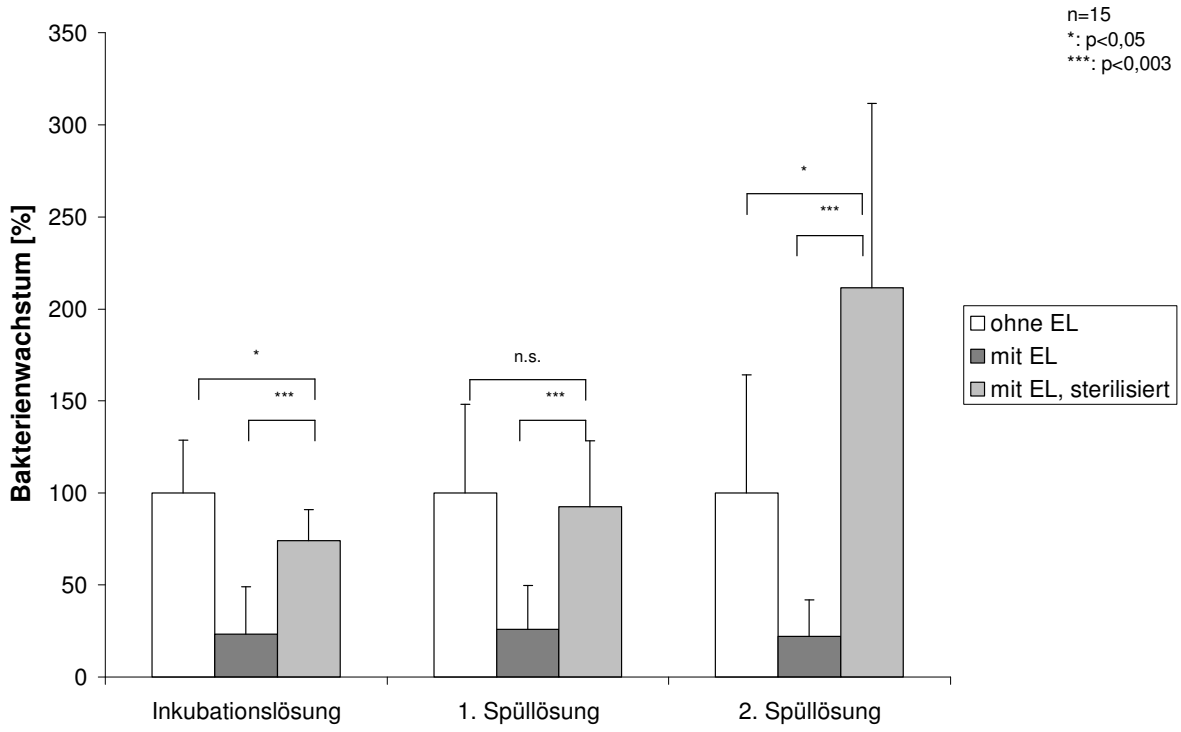


Abbildung 134: Vergleich von sterilisierten mit wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Schläuchen, jeweils mit DLC-O-Beschichtung.

Auch hier schneiden die sterilisierten Proben nicht so gut ab wie die unsterilisierten Proben mit Ethacridinlactat. Die Keimzahlen bei der Inkubationslösung betragen bei den unsterilisierten Schläuchen mit Ethacridinlactat 23%, bei den sterilisierten Schläuchen 74%. Bei der ersten Spüllösung sind es 26% und 93%, bei der zweiten Spüllösung 22% und 212%. Die Keimzahl der sterilisierten Schläuche in der zweiten Spüllösung ist also mehr als doppelt so hoch wie die der wirkstofffreien Schläuche!

Die Unterschiede zwischen den sterilisierten und unsterilisierten Proben sind stets hochsignifikant, die zwischen den sterilisierten und wirkstofffreien Proben in Fällen signifikant, in einem nicht signifikant. Allerdings geht der Vergleich bei der zweiten Spüllösung in die falsche Richtung: eine Signifikanz des Unterschiedes bedeutet hier, dass die sterilisierten Schläuche signifikant schlechter sind als die wirkstofffreien Schläuche.

Beim Vergleich der DLC-NH3-beschichteten Schläuche ergibt sich das folgende Bild:

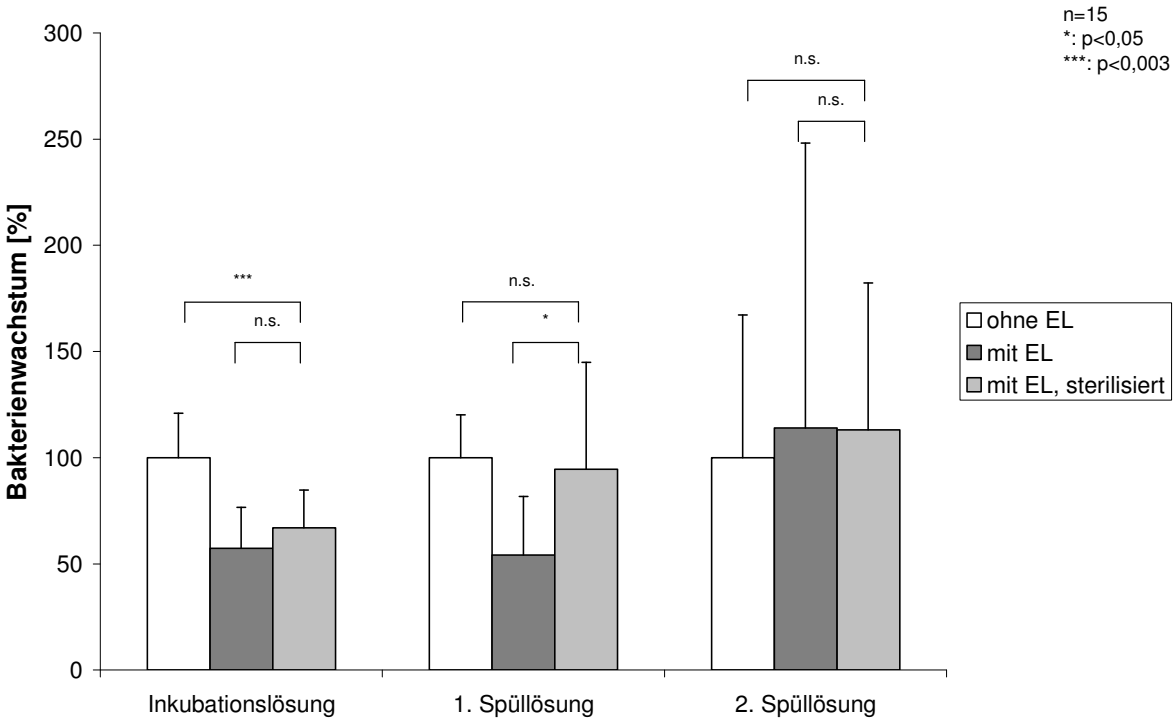


Abbildung 135: Vergleich von sterilisierten mit wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Schläuchen, jeweils mit DLC-NH3-Beschichtung.

Bei der Inkubationslösung kann man erstmals einen Zusammenhang zwischen den sterilisierten und unsterilisierten Proben mit Ethacridinlactat vermuten, die Keimzahl der unsterilisierten Schläuche mit Ethacridinlactat beträgt 57%, die der sterilisierten 67%, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten zu erkennen ist. Dafür ist aber ein hochsignifikanter Unterschied beim Vergleich der sterilisierten Schläuche mit den wirkstofffreien Schläuchen nachzuweisen.

Bei der ersten Spüllösung verschiebt sich dieser Eindruck aber schon wieder. Hier beträgt die Keimzahl der unsterilisierten Schläuche mit Ethacridinlactat 54%, während sich bei den sterilisierten Schläuchen ein Wert von 95% ergibt. Der Unterschied ist hier signifikant, der Unterschied zwischen den sterilisierten und wirkstofffreien Schläuchen jedoch nicht.

Bei der zweiten Spüllösung sind die Keimzahlen der beiden wirkstoffhaltigen Proben praktisch identisch, allerdings liegen sie um 14% bzw. 13% höher als die Keimzahl der wirkstofffreien Probe. Die hier auftretenden Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Positiv zu bewerten wäre an dieser Stelle also das einigermaßen günstige Verhältnis von sterilisierter zu unsterilisierter Probe. Allerdings ist dies zu relativieren, da die unsterilisierte

Probe mit Ethacridinlactat bei der DLC-NH3-Beschichtung genau die Probe war, die in Abschnitt 3.4.2 als einzige nicht so gut abgeschnitten hatte.

Das bei den unbeschichteten Schläuchen erzielte Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

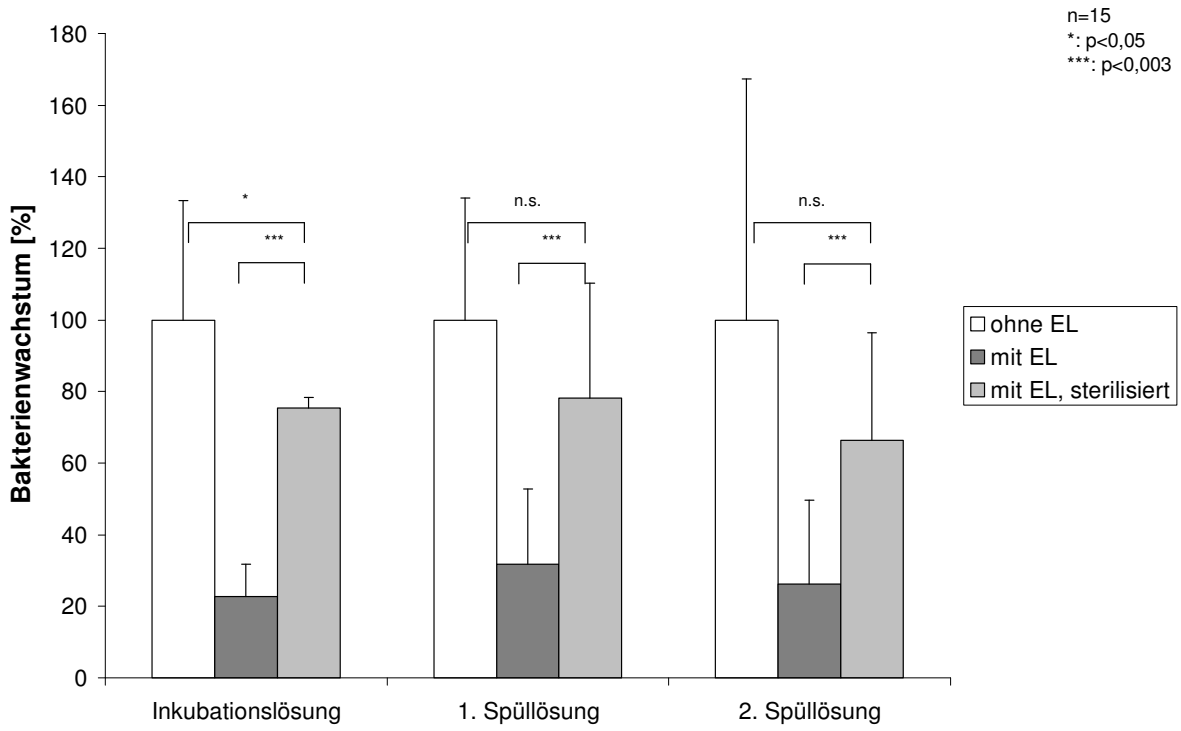


Abbildung 136: Vergleich von sterilisierten mit wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Schläuchen. Die Schläuche sind nicht beschichtet.

Am günstigsten für die sterilisierten Proben stellt sich die Situation bei den unbeschichteten Proben dar. Der zu den sterilisierten Schläuchen gehörige Balken endet stets zwischen den beiden Vergleichsbalken. Allerdings ähnelt er in der Höhe auch hier eher dem Balken, der für die wirkstofffreien Proben steht als dem, der zu den wirkstoffhaltigen, unsterilisierten Schlauchstücken gehört.

Bei der ersten Inkubationslösung beträgt die Keimzahl der unsterilisierten Schläuche mit Ethacridinlactat 23%, die sterilisierten Schläuche 75%. Bei der ersten Spüllösung sind es 32% und 78%, bei der zweiten Spüllösung 26% und 66%.

Allerdings sind die Unterschiede zwischen den wirkstoffhaltigen Proben alle hochsignifikant, während die zwischen den sterilisierten und wirkstofffreien Proben größtenteils nicht signifikant sind.

Insgesamt scheint die Gassterilisierung also durchaus einen schädigenden Einfluss auf die Wirksamkeit des immobilisierten Ethacridinlactats zu haben. Allerdings wurde bei den

bisherigen Untersuchungen außer Acht gelassen, dass die sterilisierten Schläuche einen Monat älter sind als die anderen Schläuche, mit denen sie verglichen wurden. Möglicherweise ist das schlechte Abschneiden der sterilisierten Schläuche in dieser Untersuchung also nicht auf eine Schädigung des Wirkstoffes durch den Sterilisationsprozess zurückzuführen, sondern auf eine Schädigung durch Alterungsprozesse. Dieser Aspekt muss noch untersucht werden (vgl. Abschnitt 3.4.4).

3.4.4 Vergleich der sterilisierten und unsterilisierten Schläuchen gleichen Alters am Beispiel der DLC-NH3-Beschichtung

Um zu untersuchen, ob Alterungseffekte das schlechte Abschneiden der sterilisierten Schläuche verursacht haben, wurde ein DLC-NH3-beschichteter Schlauch am Stück für 3,5 Stunden in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen und getrocknet. Anschließend wurde er mit Wasser gespült, wieder getrocknet und dann geteilt. Ein Teil wurde zum Sterilisieren eingeschickt, der andere Teil wurde dunkel aufbewahrt. Auch wurde etwas Material für 3,5 Stunden in reinem Ethanol gequollen und anschließend getrocknet.

Nachdem das sterilisierte Schlauchstück zurückgesandt worden war, wurden die sterilisierten, die unsterilisierten, sowie die wirkstofffreie Proben in 5 mm lange Stücke geschnitten und für 10 Minuten in Ethanol inkubiert und im Anschluss getrocknet.

Die so vorbereiteten Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert,

die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Die wirkstofffreien Schläuche wurden dann als Bezugspunkt ausgewählt und auf 100% gesetzt, damit die Skalierung für die drei Lösungen einheitlich ist:

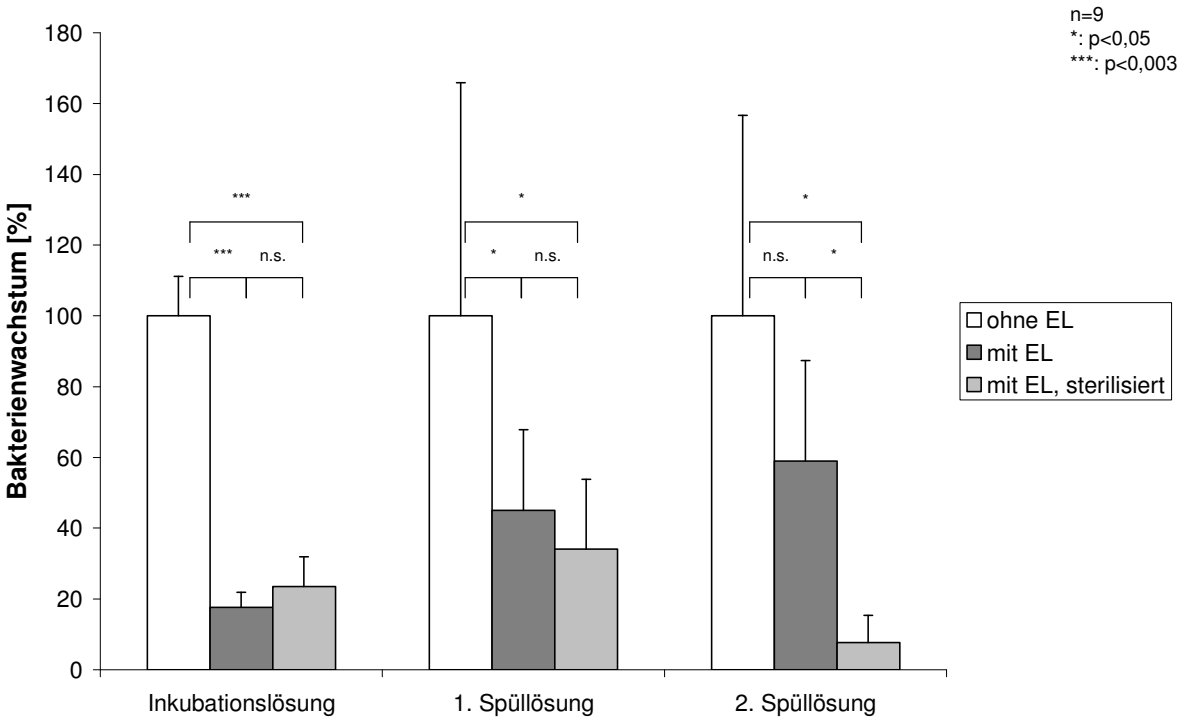


Abbildung 137: Vergleich von sterilisierten mit wirkstoffhaltigen und wirkstofffreien Schläuchen, jeweils mit DLC-NH3-Beschichtung. Die Proben wurden diesmal alle am selben Tag vorbereitet.

Das Ergebnis zeigt, dass die Vermutung richtig war. Bei der Inkubationslösung und der ersten Spüllösung ergeben sich hochsignifikante bzw. signifikante Unterschiede zwischen den wirkstofffreien und den wirkstoffhaltigen Schläuchen. Dagegen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den sterilisierten und unsterilisierten Proben mit Ethacridinlactat. Die Keimzahlen der sterilisierten Probe in der Inkubationslösung liegen bei 24%, bezogen auf die Keimzahl der wirkstofffreien Schläuche. Bei der ersten Spüllösung sind es 34%. Bei den unsterilisierten Schläuchen beträgt die Keimzahl in der Inkubationslösung 18%, in der ersten Spüllösung 45%.

Bei der zweiten Spüllösung ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der unsterilisierten und der wirkstofffreien Probe, dafür aber in beiden Vergleichen der sterilisierten Probe. Die Keimzahl der sterilisierten Probe beträgt nur 8%, bei den unsterilisierten Proben sind es 59%.

Die sterilisierte Probe hat hier jetzt also am besten abgeschnitten, woraus man schließen kann, dass Ethacridinlactat durch den Sterilisationsprozess nicht geschädigt wird. Die Anzeichen, die zuvor darauf hindeuteten (Abschnitt 3.4.3), sind auf die Alterung der sterilisierten Schläuche zurückzuführen.

3.4.5 Vergleich der Wirkstoff-Immobilisierungsmethoden

Nachdem der Test bei der Untersuchung der Wirksamkeit im Vergleich von wirkstofffreien und in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen so erfolgreich war, sollte er auch auf die Untersuchung der Wirksamkeit der anderen Beschichtungsmethode angewendet werden, also auf die Methode der Wirkstoffimmobilisierung über den Spacer Bernsteinsäure.

Dazu wurden die Schläuche mit DLC-O-Beschichtung und DLC-NH3-Beschichtung verwendet, da die Bernsteinsäure sowohl über eine Esterbindung an eine Hydroxylfunktion als auch über eine Säureamidbindung an eine Aminofunktion binden kann. Den Protokollen aus den Bindungsversuchen (Abschnitt 2.2.1.1.1) folgend, wurden die Schläuche zunächst 2 Minuten in verdünnter Natronlauge pH 8, dann 30 Minuten in einer einprozentigen wässrigen Ethacridinlactat-Lösung inkubiert, bevor sie mit dreimal 20 mL Wasser gespült und getrocknet wurden.

Zum Vergleich wurden auch entsprechend beschichtete Schläuche 3,5 Stunden in einer einprozentigen ethanolischen Ethacridinlactat-Lösung bzw. in reinem Ethanol gequollen. Die Schläuche wurden getrocknet, die wirkstoffhaltigen Schläuche dann mit dreimal 20 mL Wasser gespült und erneut getrocknet.

Abschließend wurden alle zu verwendenden Schläuche noch einmal 10 Minuten in Ethanol inkubiert und getrocknet. Dieser Vorgang sowie die anschließende Lagerung fand unter der Sterilbank statt.

Die Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert

wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Die Keimzahlen der wirkstofffreien Schläuche wurden als Bezugspunkt definiert und auf 100% gesetzt.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dargestellt, die mit den DLC-O-beschichteten Schläuchen erzielt wurden:

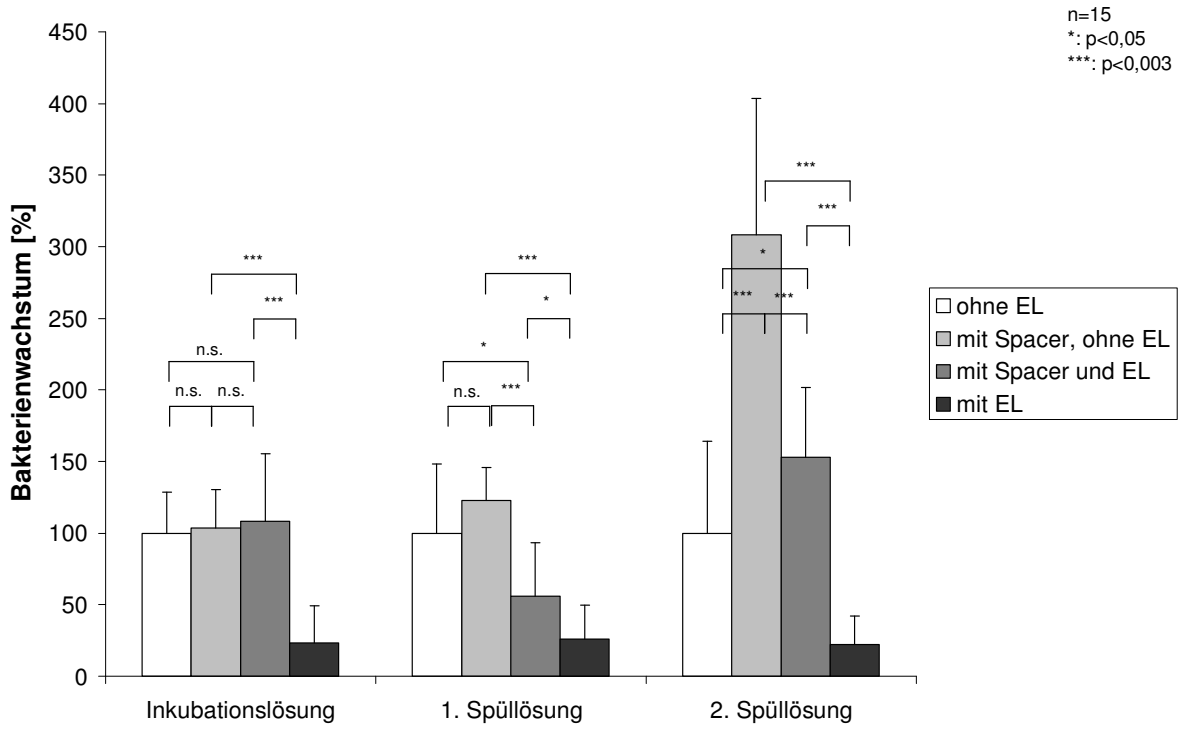


Abbildung 138: Vergleich von DLC-O-beschichteten Schläuchen auf denen Ethacridinlactat über den Spacer Bernsteinsäure ionisch gebunden wurde mit wirkstofffreien Schläuchen und Schläuchen, in die Ethacridinlactat durch Quellen eingebracht wurde. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit Schläuchen, auf denen nur der Spacer ohne Wirkstoff immobilisiert wurde.

Bei der Inkubationslösung ergeben sich kaum Unterschiede zwischen den beiden Schläuchen mit Spacer (104% bzw. 108%) und der wirkstofffreien Probe (100%). Der Unterschied zu den in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollenen Proben ist dagegen recht deutlich (23%).

Bei der ersten Spüllösung sind die Schwankungen zwischen den drei erstgenannten Proben größer. Mit 123% sind die Keimzahlen bei den Proben nur mit Spacer am höchsten, dann folgen die wirkstofffreien Proben und schließlich die Proben mit Spacer und Ethacridinlactat (56%). Die Keimzahlen bei den Schläuchen, die mit der Quellmethode behandelt wurden, sind jedoch noch immer deutlich geringer (26%).

Bei der zweiten Spüllösung wird die Reihenfolge der Schläuche mit Spacer und Ethacridinlactat und den wirkstofffreien Schläuchen umgekehrt. Bei den Proben mit Spacer und Wirkstoff betrug die Keimzahl im Schnitt 153%. Bei den Proben mit Spacer ohne Ethacridinlactat waren es 308%, bei den in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen 22%.

Bei der Inkubationslösung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der wirkstofffreien Schläuche mit den Schläuchen, auf denen Spacer immobilisiert sind, unabhängig davon, ob an den Spacer Ethacridinlactat gebunden ist oder nicht. Der Vergleich der Immobilisierungsmethoden liefert bei der Inkubationslösung hochsignifikante Unterschiede, wohingegen zwischen den beiden Schläuchen mit Spacer kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist.

Bei der ersten Spüllösung sind die Keimzahlen der Schläuche mit Spacer ohne Ethacridinlactat hochsignifikant höher als bei den Schläuchen mit Spacer und Ethacridinlactat und auch als bei den Schläuchen, in die Ethacridinlactat durch Quellen eingebracht wurde. Es besteht dagegen kein signifikanter Unterschied zu den wirkstoff- und spacerfreien Schläuchen. Im Vergleich der Schläuche mit Spacer und Ethacridinlactat ergeben sich jeweils signifikante Unterschiede zu den wirkstofffreien Schläuchen als auch zu den Schläuchen, in die Ethacridinlactat durch Quellen eingebracht wurde.

Bei der zweiten Spüllösung schneiden beide Schläuche mit Spacer sehr schlecht ab. Die Keimzahlen der Schläuche mit Spacer ohne Ethacridinlactat waren hochsignifikant höher als die aller anderen Proben. Die Proben mit Spacer und Ethacridinlactat zeigten signifikant höhere Keimzahlen als die wirkstofffreien Schläuche und hochsignifikant höhere als die Schläuche, die in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen worden waren.

Insgesamt sind die Schläuche mit Spacer – ob mit oder ohne Ethacridinlactat – signifikant bis hochsignifikant schlechter als die in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollenen Schläuche. Im Vergleich mit den wirkstofffreien Schläuchen traten bei der Spüllösung keine signifikanten Unterschiede zu den Schläuchen mit Spacer auf, bei der ersten Spüllösung stellten sich die Schläuche mit Spacer und Ethacridinlactat signifikant besser dar als die

wirkstofffreien Schläuche, bei der zweiten Spüllösung signifikant schlechter. Die Schläuche mit Spacer ohne Ethacridinlactat waren in der ersten Spüllösung den wirkstofffreien Schläuchen ebenbürtig, bei der zweiten Spüllösung jedoch hochsignifikant unterlegen.

Es gibt also einen Hinweis darauf, dass die Proben mit Spacer aber ohne Ethacridinlactat den wirkstofffreien Schläuchen unterlegen sind (zweite Spüllösung) und zwei Hinweise darauf, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Probenarten gibt (Inkubationslösung und erste Spüllösung).

Dagegen gibt es bei den Proben mit Spacer und Ethacridinlactat einen Hinweis auf eine Gleichwertigkeit mit den wirkstofffreien Schläuchen (Inkubationslösung), einen Hinweis auf Überlegenheit der Schläuche mit Spacer und Ethacridinlactat (erste Spüllösung) und einen Hinweis auf deren Unterlegenheit (zweite Spüllösung).

Die Ergebnisse sind also widersprüchlich, was eine konkrete Schlussfolgerung sehr erschwert. Eine genauere Diskussion findet sich in Abschnitt 4.4.

Auf jeden Fall kann man aus diesen Ergebnissen ableiten, dass durch die Immobilisierung nach der Quellmethode die Keimzahlen stärker verringert werden können als mit der Immobilisierung nach der Spacermethode. Da die Ergebnisse im Vergleich der Schläuche mit Spacer und der wirkstofffreien Schläuche widersprüchlich sind, muss man hieraus schließen, dass die Methode offenbar nicht geeignet ist, Unterschiede zwischen diesen Schläuchen zu detektieren.

Der gleiche Versuch wurde auch mit DLC-NH3-beschichteten Schläuchen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

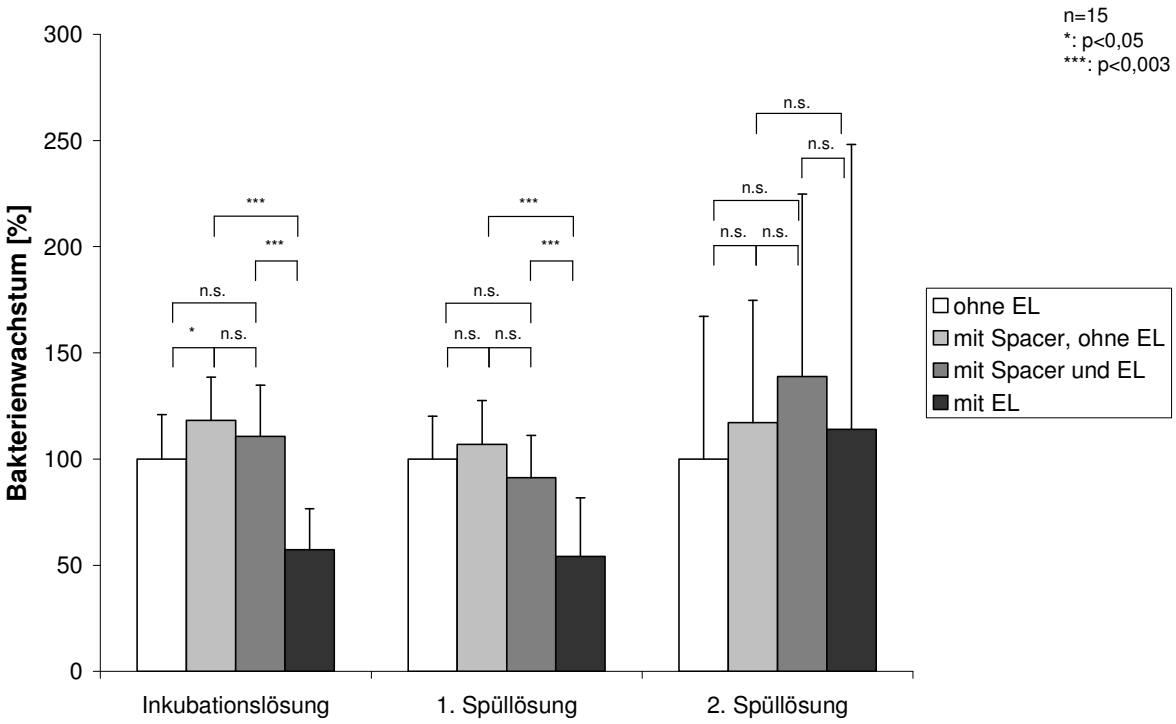


Abbildung 139: Vergleich von DLC-NH3-beschichteten Schläuchen auf denen Ethacridinlactat über den Spacer Bernsteinsäure ionisch gebunden wurde mit wirkstofffreien Schläuchen und Schläuchen, in die Ethacridinlactat durch Quellen eingebracht wurde. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit Schläuchen, auf denen nur der Spacer ohne Wirkstoff immobilisiert wurde.

Bei der DLC-NH3-Beschichtung fallen die Unterschiede zu den Schläuchen, in die Ethacridinlactat durch Quellen eingebracht wurde, nicht so deutlich aus. Die entsprechende Probe zeigte im Vergleich zu den anderen Beschichtungen relativ hohe Keimzahlen (vgl. die Abschnitte 3.4.2 und 3.4.6.2). Deshalb ist die Keimzahl der entsprechenden Probe mit 114% in der zweiten Spüllösung auch nicht die niedrigste: die wirkstofffreien Schläuche weisen hier eine niedrigere Keimzahl (100%) auf, die der beiden Proben mit Spacer ist nur unwesentlich höher (117% bzw. 139%).

Zwischen den drei letztgenannten Probenarten sind die Unterschiede bezogen auf alle drei Lösungen geringer als bei den zuvor betrachteten DLC-O-beschichteten Schläuchen. Die Probe mit Spacer ohne Ethacridinlactat zeigt in der Inkubationslösung (118%) und in der ersten Spüllösung (117%) die höchsten Keimzahlen, die Probe mit Spacer und Ethacridinlactat in der zweiten Spüllösung (139%). Die niedrigsten Keimzahlen in der Inkubationslösung fanden sich – abgesehen von den in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Proben (57%) – bei den wirkstofffreien Schläuchen (100%). Bei der ersten Spüllösung waren

die Keimzahlen bei den Proben mit Spacer und Ethacridinlactat am niedrigsten (91%), abgesehen natürlich von den in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen (54%). Die Unterschiede sind also zwischen den Spacer-Proben und den wirkstofffreien Proben nicht sehr groß, besonders wenn man zusätzlich noch die Fehlerbalken beachtet, die die Nachbarsäulen grundsätzlich überragen. Die Unterschiede sind demnach wahrscheinlich zufällig zustande gekommen.

Bei der zweiten Spüllösung, also der Lösung mit den „verunglückten“ gequollenen Schläuchen ergeben sich überhaupt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Schläuchen.

Bei der ersten Spüllösung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Proben mit Spacer untereinander, und auch nicht im Vergleich mit den wirkstofffreien Schläuchen. Im Vergleich mit den gequollenen Schläuchen ergeben sich dagegen hochsignifikante Unterschiede.

Auch bei der Inkubationslösung sind die Keimzahlen der in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuche hochsignifikant geringer als die Keimzahlen der Schläuche mit Spacer. Im Vergleich der Schläuche mit Spacer und Ethacridinlactat mit den wirkstofffreien Schläuchen, sowie mit den Schläuchen mit Spacer und ohne Ethacridinlactat ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, wohl aber beim Vergleich der wirkstofffreien Schläuche mit den Schläuchen mit Spacer ohne Ethacridinlactat.

Auch hier ist der Schluss zu ziehen, dass der Versuchsaufbau nicht geeignet ist, so geringfügige Unterschiede wie die zwischen den wirkstofffreien Schläuchen und den Schläuchen mit Spacer (mit oder ohne Ethacridinlactat) aufzudecken. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Immobilisierungsmethode durch Quellen der Immobilisierungsmethode über Spacer deutlich überlegen ist.

3.4.6 Vergleich der Beschichtungen hinsichtlich antibakterieller Wirkung

Um herauszufinden, ob es qualitative Unterschiede der Beschichtungen in Bezug auf die Bakterien abweisende Wirkung gibt, wurden die in den vorigen Abschnitten bereits vorgestellten Ergebnisse noch einmal in anderer Weise aufbereitet. In den folgenden drei Abschnitten werden die drei Beschichtungen und die unbeschichteten Schläuche einander gegenübergestellt, und zwar jeweils für die wirkstofffreien Proben, die in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Proben und für die sterilisierten Proben.

3.4.6.1 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstofffreien Schläuchen

Die Schläuche wurden alle 3,5 Stunden in reinem Ethanol gequollen, dann getrocknet, noch einmal 10 Minuten mit Ethanol behandelt und wieder getrocknet.

Die einander gegenübergestellten Beschichtungen sind eine unfunktionalisierte (DLC2), eine mit Ammoniak funktionalisierte (DLC-NH3) und eine mit Sauerstoff funktionalisierte (DLC-O) a:CH-Schicht, sowie unbeschichtete Proben (PU).

Diese Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Als Bezugspunkt wurden die unbeschichteten Schläuche (PU) ausgewählt, die dort ermittelte Keimzahl wurde auf 100% gesetzt, die anderen Keimzahlen entsprechend umgerechnet:

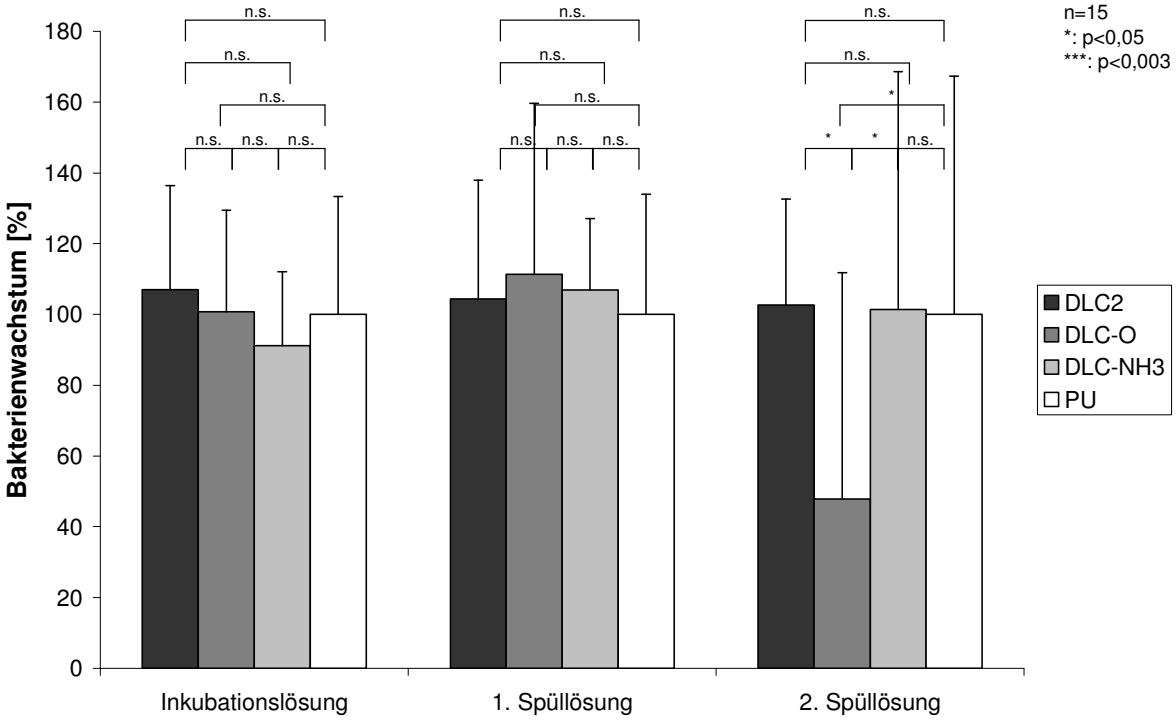


Abbildung 140: Vergleich der drei Beschichtungen und der unbeschichteten Schläuche anhand der wirkstofffreien Schläuche

Die Keimzahlen der unterschiedlich beschichteten Schläuche bewegen sich immer in einem ähnlichen Bereich, nämlich zwischen 91% (Inkubationslösung NH3-beschichtete Schläuche) und 111% (erste Spüllösung DLC-O-beschichtete Schläuche), wenn man die zweite Spüllösung der DLC-O-beschichteten Schläuche (48%) nicht berücksichtigt.

Auch durch den t-Test wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beschichtungen ermittelt, mit Ausnahme der Vergleiche, die die zweite Spüllösung der DLC-O-beschichteten Schläuche beinhalten. Allerdings waren die Unterschiede aufgrund der hohen Standardabweichungen bei diesen Proben auch nur signifikant, nicht hochsignifikant.

3.4.6.2 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstoffhaltigen Schläuchen

Die Schläuche wurden alle 3,5 Stunden in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen, dann getrocknet, mit Wasser gespült und wieder getrocknet. Unter der Sterilbank wurden die Proben dann noch einmal 10 Minuten mit Ethanol behandelt und ein letztes Mal vor dem eigentlichen Versuch getrocknet.

Die einander gegenübergestellten Beschichtungen sind eine unfunktionalisierte (DLC2), eine mit Ammoniak funktionalisierte (DLC-NH3) und eine mit Sauerstoff funktionalisierte (DLC-O) a:CH-Schicht, sowie unbeschichtete Proben (PU).

Diese Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Als Bezugspunkt wurden die unbeschichteten Schläuche (PU) ausgewählt, die dort ermittelte Keimzahl wurde auf 100% gesetzt, die anderen Keimzahlen entsprechend umgerechnet:

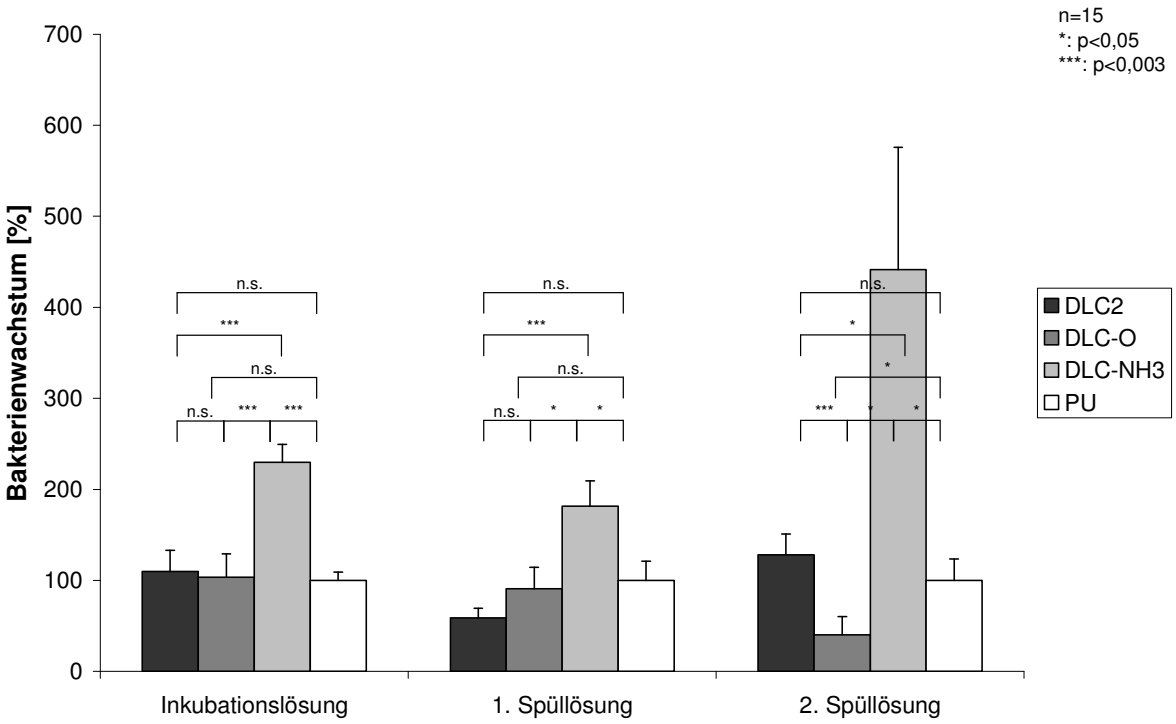


Abbildung 141: Vergleich der drei Beschichtungen und der unbeschichteten Schläuche anhand der in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollenen Schläuche

Bei der Inkubationslösung sieht man zwischen den unbeschichteten Proben (100%) und den Beschichtungen DLC2 (110%) und DLC-O (103%) auch nach dem t-Test keinen Unterschied. Die Keimzahlen der Proben mit DLC-NH3-Beschichtung sind allerdings gut doppelt so hoch (230%) und die Unterschiede zu den anderen Schläuchen sind hochsignifikant.

Auch bei der ersten Spüllösung ist die Keimzahl bei dieser Beschichtung deutlich am höchsten (182%), während die der DLC2-beschichteten Proben am geringsten ist (59%). Zwischen den unbeschichteten Schläuchen (100%) und den Schläuchen mit DLC-O-Beschichtung (91%) ist auch hier praktisch kein Unterschied zu erkennen. Der t-Test zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich der DLC-NH3-beschichteten Schläuche mit den unbeschichteten und den DLC-O-beschichteten Schläuchen und einen hochsignifikanten Unterschied zu den DLC2-beschichteten Schläuchen. Zwischen den anderen Proben der ersten Spüllösung wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Bei der zweiten Spüllösung ist die Keimzahl der DLC-NH3-beschichteten Schläuche (442%) sogar mehr als dreimal so hoch wie bei den DLC2-beschichteten (128%) über viermal so hoch wie bei den unbeschichteten und elfmal so hoch wie bei den DLC-O-beschichteten

Schläuchen (40%). Dennoch sind die Unterschiede zu den anderen Schläuchen nur signifikant, nicht hochsignifikant, wohingegen sich beim Vergleich der DLC2-beschichteten und DLC-O-beschichteten Schläuche eine hochsignifikante Überlegenheit der DLC-O-beschichteten Schläuche ergibt. Auch schneiden die DLC-O-beschichteten Schläuche signifikant besser ab als die unbeschichteten Schläuche. Zwischen den DLC2-beschichteten und den unbeschichteten Schläuchen ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Insgesamt scheinen die DLC-NH3-beschichteten Schläuche den anders beschichteten und den unbeschichteten Schläuchen unterlegen zu sein, wenn man sie mit Ethacridinlactat behandelt. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch um zufällige Messabweichungen. Um hierüber Aufschluss zu erhalten, müsste man den Versuch wiederholen.

3.4.6.3 Vergleich der Beschichtungen bei wirkstoffhaltigen, sterilisierten Schläuchen

Die Schläuche wurden alle 3,5 Stunden in einprozentiger ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollen, dann getrocknet, mit Wasser gespült und wieder getrocknet. Anschließend wurden sie zur Gassterilisation mit Ethylenoxid eingeschickt. Nachdem sie nach vier Wochen zurückkamen, wurden die Proben unter der Sterilbank noch einmal 10 Minuten mit Ethanol behandelt und ein letztes Mal vor dem eigentlichen Versuch getrocknet.

Die einander gegenübergestellten Beschichtungen sind eine unfunktionalisierte (DLC2), eine mit Ammoniak funktionalisierte (DLC-NH3) und eine mit Sauerstoff funktionalisierte (DLC-O) a:CH-Schicht, sowie unbeschichtete Proben (PU).

Diese Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert,

die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Als Bezugspunkt wurden die unbeschichteten Schläuche (PU) ausgewählt, die dort ermittelte Keimzahl wurde auf 100% gesetzt, die anderen Keimzahlen entsprechend umgerechnet:

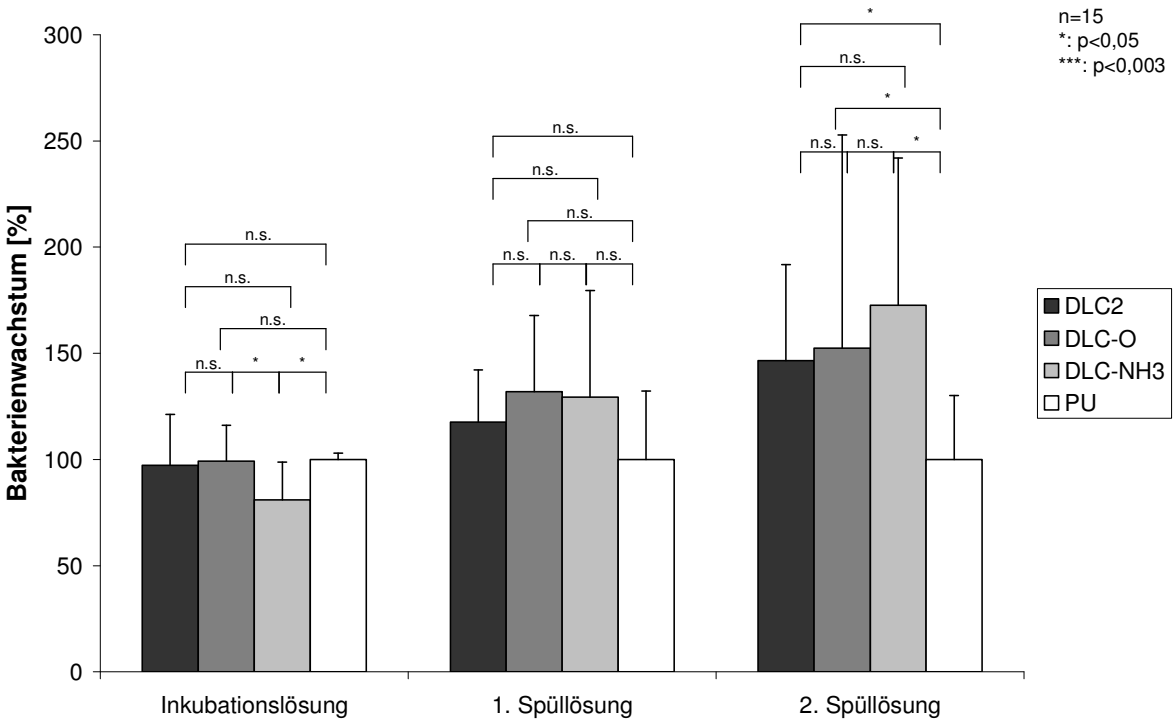


Abbildung 142: Vergleich der drei Beschichtungen und der unbeschichteten Schläuche anhand der in ethanolischer Ethacridinlactat-Lösung gequollenen und sterilisierten Schläuche

Bei keinem der Vergleiche ergeben sich besonders auffällige Unterschiede zwischen den verschiedenen Beschichtungen. Bei der Inkubationslösung zeigen die DLC-NH3-beschichteten Schläuche mit 81% die niedrigste Verkeimung, der Unterschied ist signifikant im Vergleich mit den unbeschichteten Schläuchen (100%) und den DLC-O-beschichteten Schläuchen (99%). Nicht signifikant aufgrund der etwas höheren Standardabweichung ist der Unterschied zu den DLC2-beschichteten Schläuchen (97%).

Bei der ersten Spüllösung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben. Die niedrigste Keimzahl ist bei den unbeschichteten Schläuchen (100%) zu verzeichnen, es folgen die DLC2-beschichteten Proben mit 118%, dann die DLC-NH3-beschichteten mit 129% und schließlich die DLC-O-beschichteten Schläuche mit 132%.

Bei der zweiten Spüllösung sind die Keimzahlen bei den unbeschichteten Schläuchen signifikant geringer als bei den beschichteten Schläuchen. Die DLC2-beschichteten Schläuche

zeigen eine Verkeimung von 147%, bezogen auf die unbeschichteten Schläuche, die DLC-O-beschichteten von 153%, und die DLC-NH3-beschichteten 173%.

Da es immer andere Schlaucharten sind, die sich dem anderen als überlegen erweisen, kann man davon ausgehen, dass keiner der Unterschiede wirklich von Bedeutung ist. Die Beschichtungen dürften also gleichwertig sein.

Da es unwahrscheinlich ist, dass der Grund für die Unterlegenheit der DLC-NH3-beschichteten Schläuche durch das Sterilisieren beseitigt wird, ist vermutlich auch das schlechte Abschneiden dieser Proben, welches in Abschnitt 3.4.6.2 beschrieben wurde, ohne Bedeutung.

3.4.7 Vergleich der drei Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat

Der erarbeitete Versuchsaufbau sollte nun auch noch einmal dazu genutzt werden, um die Bakterien abweisende Wirkung der beiden Substanzen Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zu untersuchen, die bereits nach den Untersuchungen mit Spektralphaseninterferenz ausgemustert worden waren.

Dazu wurden 5 mm lange DLC-K-beschichtete Schlauchstücke für 3,5 Stunden in einprozentigen ethanolischen Lösungen von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat, sowie in reinem Ethanol gequollen. Die Schläuche wurden getrocknet und die wirkstoffhaltigen Schläuche fünfmal mit je 1 mL Wasser bei 2500 rpm gespült und wieder getrocknet.

Bei den bisherigen mikrobiologischen Spülversuchen wurden die Schläuche danach noch einmal für 10 Minuten in Ethanol inkubiert und nochmals getrocknet. Dieser Schritt wurde hier nicht durchgeführt, so dass die wirkstofffreien Schläuche zuletzt mit bakterizidem Ethanol in Berührung gekommen waren, die wirkstoffhaltigen Schläuche mit dem bakterienfreundlichen Medium Wasser.

Diese Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Als Bezugspunkt wurden die wirkstofffreien Schläuche ausgewählt, die dort ermittelte Keimzahl wurde auf 100% gesetzt, die anderen Keimzahlen entsprechend umgerechnet:

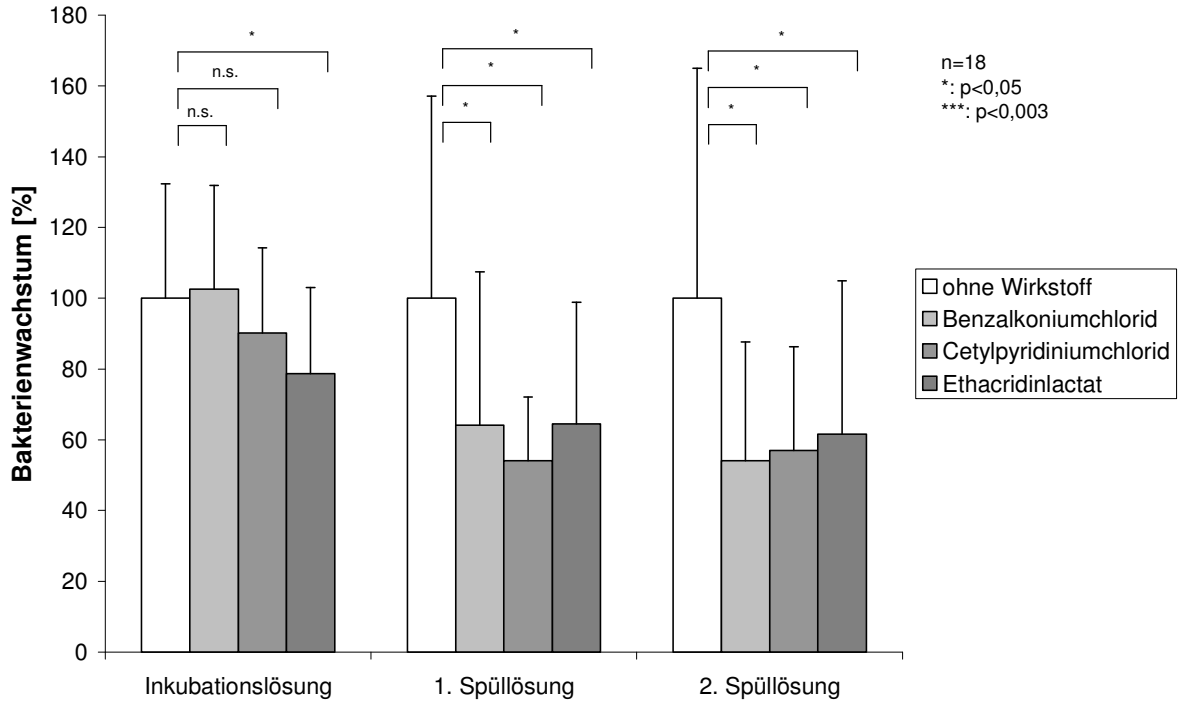


Abbildung 143: Vergleich der drei bakteriziden Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat in einem mikrobiologischen Test

Anders als bei den zuerst vorgestellten Ergebnissen (Abschnitt 3.4.2) sind die Unterschiede zwischen den wirkstofffreien und den wirkstoffhaltigen Schläuchen nicht sehr ausgeprägt. Dies dürfte damit zu begründen sein, dass die zehnminütige Inkubation in Ethanol vor dem Versuch nicht durchgeführt wurde. Die absoluten Keimzahlen bei den wirkstoffhaltigen Schläuchen waren deutlich höher als bei den ersten Versuchen, die Annäherung der Kurven

ist also nicht durch eine Verringerung der Keimzahlen bei den wirkstofffreien Schläuchen zustande gekommen, sondern durch eine Erhöhung der Keimzahlen der wirkstoffhaltigen.

So ergab sich bei mit Benzalkoniumchlorid behandelten Schläuchen in der Inkubationslösung eine Keimzahl von 103%, bei den mit Cetylpyridiniumchlorid behandelten Schläuchen eine Keimzahl von 90% und bei den mit Ethacridinlactat behandelten Schläuchen eine Keimzahl von 79%, bezogen auf die wirkstofffreien Schläuche. Signifikant niedriger als bei den wirkstofffreien Schläuchen ist die Keimzahl damit nur bei den in Ethacridinlactat-Lösung gequollenen Schläuchen.

Bei der ersten Spüllösung betrugen die Keimzahlen bei den Schläuchen mit Benzalkoniumchlorid und Ethacridinlactat 64%, bei den Schläuchen mit Cetylpyridiniumchlorid 54%. Die Unterschiede zu den wirkstofffreien Schläuchen waren in allen drei Vergleichen signifikant.

Bei der zweiten Spüllösung lagen die Keimzahlen bei den Benzalkoniumchlorid-haltigen Schläuchen bei 54%, bei den Cetylpyridiniumchlorid-haltigen bei 57% und bei den Ethacridinlactat-haltigen bei 62%. Alle Vergleiche mit den wirkstofffreien Schläuchen ergaben signifikante Unterschiede.

Nicht im Diagramm dargestellt ist der Vergleich der drei Stoffe miteinander. Die meisten Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede, nur beim Vergleich der Inkubationslösungen der Schläuche mit Benzalkoniumchlorid und den Schläuchen mit Ethacridinlactat ergab sich ein signifikanter Unterschied.

Demnach wären die beiden ausgemusterten Stoffe für eine Reduktion anhaftender Bakterien genauso geeignet gewesen wie Ethacridinlactat. Allerdings sind auch die sonstigen Eigenschaften von Ethacridinlactat für das gegebene Problem am besten geeignet (vgl. Abschnitt 1.1.4.2.1).

3.4.8 Antibakterielle Wirksamkeit der wirkstoffhaltigen Schläuche nach 6 Monaten Freisetzung

Um zu untersuchen, ob auch nach einem halben Jahr Liegedauer noch eine Wirkung zu erwarten ist, wurde mit den Schläuchen aus dem sechsmonatigen Freisetzungsversuch auch der mikrobiologische Spülversuch durchgeführt.

Verglichen werden die Schläuche mit frisch in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen, sowie mit sterilisierten und wirkstofffreien Schläuchen.

Die Schläuche wurden vor dem Versuch nicht der zehnminütigen Inkubation in Ethanol unterzogen, da dies in vivo auch nicht stattfinden könnte.

Die Schläuche wurden dann über Nacht jeweils in 4 mL eines frisch mit *Escherichia coli* beimpften Luria-Bertani-Mediums auf einem Schüttler bei 200 U/min bebrütet (Inkubationslösung). Eine weitere Mediumprobe wurde ebenfalls mit dem gleichen Volumen der Stammsuspension angeimpft und ohne Schlauchstück bebrütet.

Am nächsten Tag wurde jeder Schlauch zweimal in je einem frischen Medium unter starkem Schütteln (600 U/min) eine Minute gespült (erste und zweite Spüllösung).

Sowohl die Inkubationslösung als auch die beiden Spüllösungen und die Mediumprobe ohne Schlauch mussten zunächst verdünnt werden, bevor sie auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden dann wiederum bei 37°C 1-2 Tage inkubiert, bis die gebildeten Kolonien groß genug waren, um gut ausgezählt werden zu können.

Die gezählten Kolonienzahlen der verschiedenen verdünnten Proben wurden durch die Anzahl der Kolonien dividiert, die in der verdünnten Probe ohne Schlauch bestimmt wurde. Auf diese Weise werden die Schwankungen zwischen verschiedenen Messtagen eliminiert, die durch verschieden konzentrierte Bakterien-Stammsuspensionen zustande kommen. Die Ergebnisse von verschiedenen Messtagen sind somit miteinander vergleichbar.

Als Bezugspunkt wurden die wirkstofffreien Schläuche ausgewählt, die dort ermittelte Keimzahl wurde auf 100% gesetzt, die anderen Keimzahlen entsprechend umgerechnet:

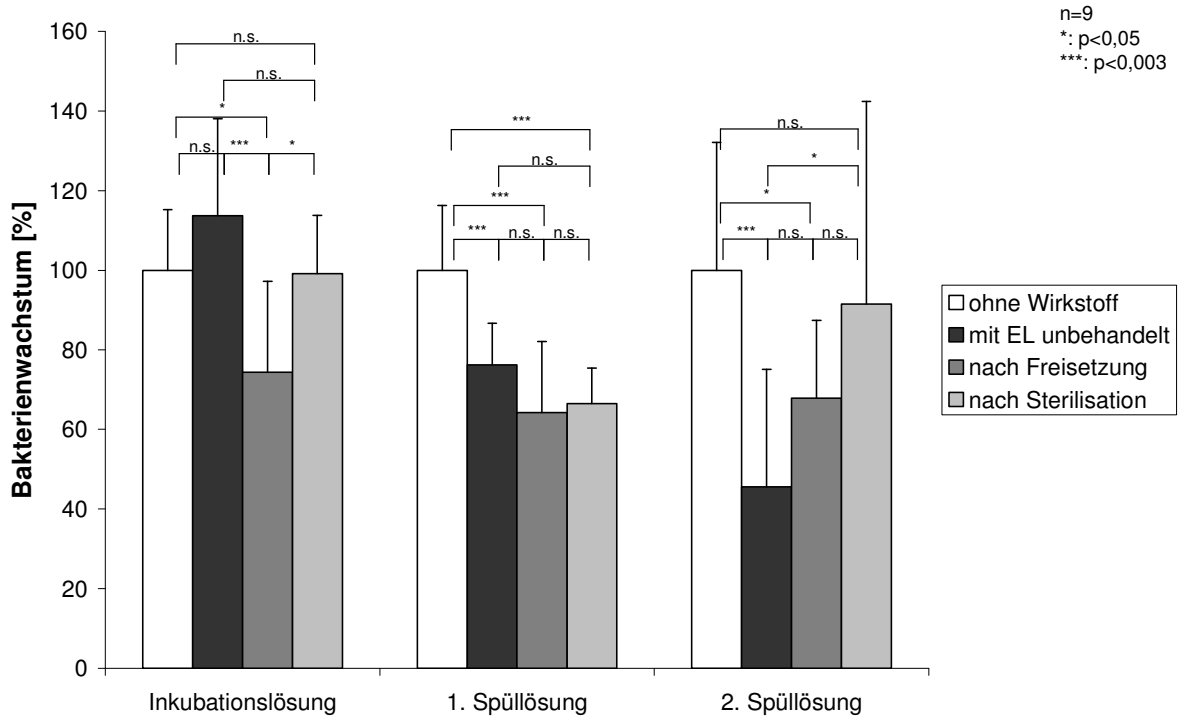


Abbildung 144: Vergleich der Schläuche aus der 6-Monats-Freisetzung mit wirkstofffreien und Ethacridinlactat-haltigen sterilisierten und frischen Schläuchen in einem mikrobiologischen Spülversuch. Alle Schläuche sind DLC-NH3-beschichtet.

Dadurch, dass die Proben nicht vor dem Versuch in Ethanol inkubiert wurden, rücken die Keimzahlen der wirkstofffreien Schläuche und der anderen Schläuche wieder sehr dicht zusammen, was das Ergebnis leider nicht allzu deutlich ausfallen lässt.

Trotzdem ergeben sich im Vergleich der aus der Freisetzung stammenden Schläuche mit den wirkstofffreien Schläuchen stets signifikante bis hochsignifikante Unterschiede. In der Inkubationslösung ergibt sich für die Schläuche aus dem Freisetzungsversuch eine Keimzahl von 74%, bezogen auf die wirkstofffreien Schläuche und ein signifikanter Unterschied. Bei der ersten Spüllösung ist der Unterschied bei einer Keimzahl von 64% hochsignifikant, bei der zweiten Spüllösung bei 68% signifikant. Der Unterschied zu den frisch gequollenen Schläuchen ist bei der Inkubationslösung (114%) hochsignifikant, bei der ersten (76%) und zweiten Spüllösung (46%) nicht signifikant. Im Vergleich mit den sterilisierten Schläuchen ergibt sich bei der Inkubationslösung (99%) ein signifikanter Unterschied, bei der ersten (67%) und zweiten Spüllösung (92%) dagegen wegen der hohen Standardabweichung nicht.

Daraus ist zu schließen, dass auch nach 6 Monaten noch genügend Ethacridinlactat in den Schläuchen vorhanden ist, um eine bakterielle Besiedelung zu verringern.

4 Diskussion

4.1 Modellversuche zur Simulation der Bindung von Wirkstoffen an verschiedene Oberflächen

Bei der Messung der Bindung von Benzalkoniumchlorid-Lösung (Abschnitt 3.1.1) der Konzentration 10 mg/mL an eine carboxylierte Oberfläche trat eine Schichtdickenabnahme von etwa 6,5 nm auf. Bei der niedriger konzentrierten Lösung (1 mg/mL) war kein Signal zu verzeichnen. Offenbar ist eine gewisse Mindestkonzentration an Analyt-Molekülen notwendig, um eine messbare Bindung zu erzeugen.

Die Schichtdickenabnahme trat auch bei der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (ebenfalls Abschnitt 3.1.1) der Konzentrationen 1 mg/mL und 10 mg/mL an die Carboxyloberfläche auf. Die durchschnittliche Schichtdickenabnahme betrug 1,3 nm. Bei der Lösung der Konzentration 100 µg/mL wurde kein Bindungssignal beobachtet. Die Mindestkonzentration für Cetylpyridiniumchlorid-Moleküle scheint also geringer zu sein als die der Benzalkoniumchlorid-Moleküle, während das gemessene Signal auch bei äquivalenter Konzentration niedriger ausfällt.

Betrachtet man die Strukturen von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid, so fällt deren tensidische Struktur auf: Beide Moleküle besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil, wobei sich der hydrophile Teil bei Cetylpyridiniumchlorid im aromatischen System befindet, bei Benzalkoniumchlorid außerhalb des Phenylringes.

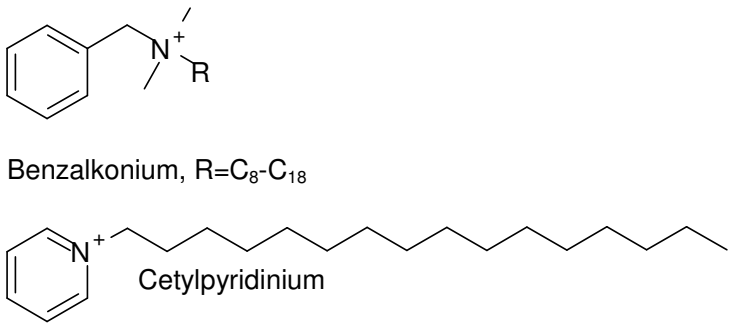


Abbildung 145: Strukturformeln von Benzalkonium und Cetylpyridinium

Es ist also denkbar, dass diese Struktur etwas mit dem Bindungsverhalten der Substanzen an die hydrophile Oberfläche zu tun hat.

Der mögliche Ablauf des Bindungsvorganges ist in Abbildung 31 schematisch dargestellt. Da sich die folgende Beschreibung mehrfach auf die entsprechende Abbildung bezieht, ist sie hier noch einmal eingefügt:

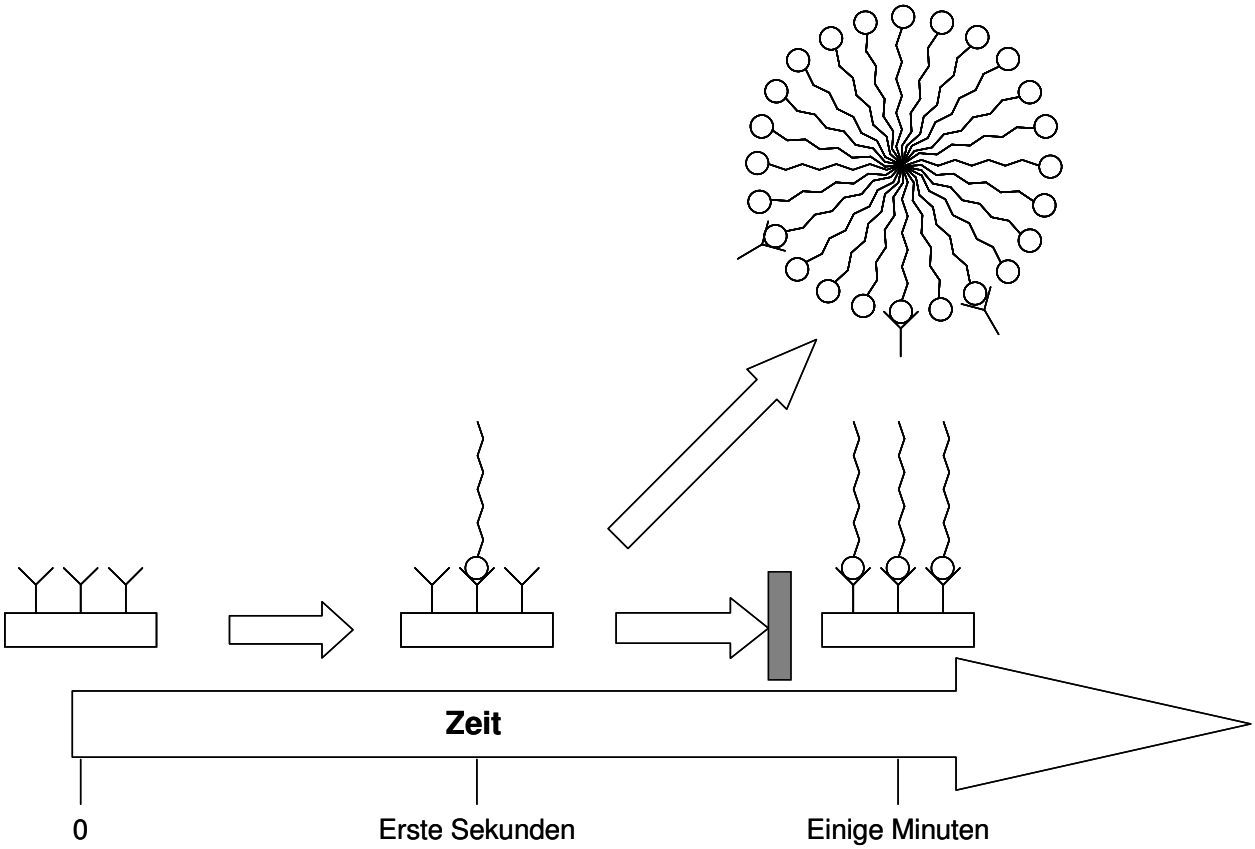


Abbildung 146: Schematische Darstellung der Bindung von tensidischen Molekülen an eine hydrophile Oberfläche. In den ersten Sekunden lagern sich nur einzelne Moleküle an, so dass ein positives Signal beobachtet wird. Da sich in einer wässrigen Umgebung keine hydrophobe Oberfläche ausbilden wird (unten), schließen sich die Tenside zu Mizellen zusammen, wobei sie teilweise auch die Beschichtung zerstören.

Ausgangspunkt ist der beschichtete Glasträger (links).

Bei den Bindungskurven ist jeweils vor der Schichtdickenabnahme ein kurzzeitig bestehender Peak zu erkennen. Dieser könnte durch die initiale Anlagerung der Wirkstoffmoleküle zustande kommen (Mitte).

Wenn sich die Wirkstoffmoleküle einfach nacheinander auf der Oberfläche anlagern würden, erhielte man ein stabiles, positives Messsignal. Da dies nicht der Fall ist, kann ausgeschlossen werden, dass der Weg unten rechts abläuft.

Tenside in Lösung bilden ab einer gewissen Konzentration Mizellen aus. Wenn nun Moleküle in diese Mizellen integriert werden, die bereits an die Carboxylgruppen auf der Oberfläche gebunden haben, gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wird die ionische Bindung zwischen der Carboxylatgruppe und dem Wirkstoffkation gelöst oder aber die Beschichtung wird mit

abgelöst. Der Kurvenverlauf spricht für den zweiten Fall, da die Schichtdicke irreversibel bis weit unter die Basislinie absinkt. Würde sich nur die ionische Bindung lösen, so könnten neue Wirkstoffmoleküle an die freigewordene Bindungsstelle andocken, und es käme ein stabiles positives Signal zustande.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass eine kovalente Bindung eher gespalten wird als eine ionische. Daher ist anzunehmen, dass nicht eine Abspaltung des Spacers Bernsteinsäure erfolgt, sondern eher, dass auch das ursprüngliche Aminosilan mit von der Glasoberfläche entfernt wird.

Es wäre auch denkbar gewesen, dass die Mizellbildung ein Grund dafür sein könnte, dass bei Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid nicht dieselben Mindestkonzentrationen für ein Signal ermittelt wurden. Allerdings liegen die CMC-Werte (Critical Micelle Concentration) mit 0,02% für Benzalkoniumchlorid [Porkert, 2006] und 0,03% für Cetylpyridiniumchlorid [Wan und Poon, 1969] nicht weit auseinander. Die Konzentration von 100 µg/mL (entspricht 0,01%), also die niedrigste verwendete Cetylpyridiniumchlorid-Konzentration, liegt aber tatsächlich unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration. Warum dann jedoch auch bei der 0,1%igen Benzalkoniumchlorid-Lösung kein Signal festzustellen war, ist unklar.

Um die Vermutung zu untermauern, dass die Schichtdickenabnahme bei der Zugabe von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid auf die tensidische Struktur der beiden Substanzen zurückzuführen ist, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt.

Einerseits wurde das Bindungsverhalten von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid auf einer hydrophoben Oberfläche untersucht (Abschnitt 3.1.2.1), andererseits das Bindungsverhalten anderer Tenside auf der hydrophilen Carboxyloberfläche (Abschnitt 3.1.2.2) und schließlich das Bindungsverhalten von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat direkt auf den Glasträgern (Abschnitt 3.1.2.3).

Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid an eine hydrophobe C_{18}-Oberfläche traten dann auch – wie erwartet – Schichtdickenzunahmen auf, bei Benzalkoniumchlorid um 1,3 nm, bei Cetylpyridinium-chlorid waren es knapp 2 nm. Als Fließmittel in diesem Versuch wurde nicht Wasser, sondern Toluol verwendet. In diesem Lösungsmittel bilden sich aus den beiden Wirkstoffen inverse Mizellen, also Mizellen, bei denen die hydrophoben Molekülteile nach außen gerichtet sind und die hydrophilen nach innen. Die Bindung der Wirkstoffe an die Oberfläche erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den C_{18}-Ketten und den hydrophoben

Molekülteilen der Analyten. Beim Versuch, die gebundenen Wirkstoffe mit Toluol abzuspülen, ergab sich nur eine geringfügige Abnahme der Schichtdicke; jedoch wurde die Kurve nicht bis zur Basislinie abgesenkt. Das muss bedeuten, dass die Stoffe nicht komplett von der Oberfläche abgewaschen werden, sondern sich wegen der Änderung der Polarität der Umgebung anders anordnen.

Auch beim zweiten Kontrollversuch (Abschnitt 3.1.2.2, Abbildung 34) ergaben sich die erwarteten Ergebnisse: Das Sensogramm der Bindung von Hexadecylamin sieht vom Prinzip her genauso aus wie die Sensogramme der Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid. Bei ihnen allen tritt auf die Zugabe des Tensids hin ein Peak auf, kurze Zeit später erfolgt eine Schichtdickenabnahme weit unter die Basislinie. Die Schichtdickenabnahme ist also sehr wahrscheinlich auf Strukturelemente zurückzuführen, die Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Hexadecylamin gemein sind, bei Ethacridinlactat aber nicht auftauchen. Dies trifft auf die Tensidstruktur zu.

Beim dritten Kontrollversuch wurde untersucht, wie sich das Bindungsverhalten von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat auf unbeschichtetem Glas darstellt. Wenn die Schichtdickenabnahme durch das Ablösen der Beschichtung zustande kommt, kann sie bei diesem Versuch nicht auftreten, da es keine Beschichtung gibt, die abgelöst werden kann. Tatsächlich zeigen sich auch durchweg positive Sensogramme; die Substanzen werden durch Wasser wieder abgewaschen, die adsorptiven Kräfte sind also nicht besonders stark. Es erscheint zunächst verwunderlich, dass Ethacridinlactat offenbar nicht vollständig abgespült wird. Der Grund hierfür liegt in der leicht ansteigenden Basislinie. Setzt man deren Verlauf gedanklich fort, so erreicht man beinahe den gemessenen Wert nach 1200 Sekunden.

Es lassen sich also die Ergebnisse aller drei Kontrollexperimente mit der Theorie vereinbaren, dass die Schichtdickenabnahme auf den tensidischen Charakter von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zurückzuführen ist.

Bei den vier Konzentrationen, bei denen Sensogramme der Bindung von Ethacridinlactat an eine Carboxyloberfläche aufgezeichnet wurden, war bei den beiden niedrigsten Konzentrationen (100 µg/mL und 1 mg/mL) kein Signal zu verzeichnen. Bei den beiden höheren Konzentrationen (5 mg/mL und 10 mg/mL) ergab sich beinahe der gleiche Schichtdickenzuwachs, nämlich 0,4 nm bzw. 0,6 nm. Beide Signale blieben auch bei der anschließenden Wasserzugabe stabil, d.h. Ethacridinlactat konnte eine stabile Bindung mit den Carboxylatgruppen eingehen. Verwunderlich ist indes, dass eine andere Messung –

ebenfalls bei einer Ethacridinlactat-Konzentration von 10 mg/mL – einen wesentlich größeren Schichtdickenzuwachs von etwa 1,5 nm zur Folge hatte. Es handelt sich hier möglicherweise um verschiedene Messchips. Bei den RIfS-Messungen (Abschnitt 3.2.1.2) wurde jedenfalls beobachtet, dass die Messsignale auf dem einen Chip immer gleich hoch waren, bei einem anderen Chip jedoch ein anderer Wert gemessen wurde. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass sich Unterschiede zwischen den Detektionsgrenzen von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid ergeben haben (s.o.).

Da sich in dem zuvor beschriebenen Kontrollversuch (s. auch Abschnitt 3.1.2.3) bei der Bindung von Ethacridinlactat an Glas ergab, dass der Wirkstoff durch Wasserzugabe zumindest teilweise wieder von der Oberfläche abgewaschen wird, muss ein Zusammenhang zwischen der stabilen Bindung und der ionischen Wechselwirkung des Ethacridinium-Kations mit der Carboxylatgruppe bestehen.

Aus den hier erzielten Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass für die Immobilisierung über einen Spacer von den untersuchten Substanzen einzig Ethacridinlactat geeignet ist.

Die Übertragbarkeit auf eine aminofunktionalisierte a:CH-Schicht wurde in Abschnitt 3.1.4 untersucht. Dafür wurden die Aminogruppen ebenfalls mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und die Bindung von Ethacridinlactat an diese Oberfläche beobachtet. Die Bindung war stabil; es ergaben sich aber bei den unterschiedlich konzentrierten Lösungen unterschiedlich hohe Signale. Bei der Bindung über einen Spacer sollten eigentlich unabhängig von der Konzentration einheitliche Signale zustande kommen, da sich eine monomolekulare Schicht ausbilden sollte.

Es gibt zwei mögliche Erklärungsansätze hierfür. Die Schichtdickenzunahme könnte auf adsorptive Effekte zurückzuführen sein. Dagegen spricht aber, dass das Signal auf die Zugabe des Phosphatpuffers hin stabil bleibt. Bei einer adsorptiven Bindung würde sich das Ethacridinlactat wieder ablösen, wie es bei der Bindung an die unbeschichtete Glasoberfläche (Abschnitt 3.1.2.3) und bei den RIfS-Messungen (s.u. oder Abschnitt 3.2.1) beobachtet wurde. Wahrscheinlicher ist, dass die unterschiedlichen Signale durch die Verwendung verschiedener Glasträger zustande kamen, wie es auch bei den RIfS-Messungen (s.u., sowie Abschnitt 3.2.1.2) gezeigt wurde.

Unabhängig von diesen Schwankungen konnte aber eindeutig nachgewiesen werden, dass auch auf der aminofunktionalisierten Kohlenstoff-Beschichtung eine Immobilisierung über einen Spacer möglich ist.

Die oben beschriebenen Ergebnisse sollten auf das neue Messgerät BIAffinity übertragen werden, um dieses zu etablieren. Die BIAffinity basiert auf dem Messprinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS).

Hierbei wurde die Bindung von Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an eine Carboxyloberfläche bei verschiedenen pH-Werten untersucht (Abschnitt 3.2.1). Dabei wurde festgestellt, dass sich bei verschiedenen Messchips unterschiedlich hohe Signale ergeben können (Abbildung 45 in Abschnitt 3.2.1.2). Hierfür könnten zwei Ursachen in Betracht kommen. Da die Messchips mehrfach verwendet werden, ist es möglich, dass die Oberflächen durch das mehrfache Anätzen mit Natronlauge und die Behandlung mit Piranha-Lösung bereits unterschiedlich stark abgenutzt sind. Daraus können einerseits veränderte optische Eigenschaften resultieren, die unterschiedliche Schichtdickenänderungen suggerieren. Andererseits ist es aber auch möglich, dass die Schichtdickenzunahmen tatsächlich unterschiedlich hoch sind. Dies setzt allerdings voraus, dass die Bindung nicht über ionische Wechselwirkungen erfolgt, da sich hier eine monomolekulare Schicht aus Wirkstoffmolekülen auf der Oberfläche anlagern würde. Wenn die Beschichtung mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid jedoch nicht erfolgreich gewesen sein sollte (s.u.), so wäre das positive Signal auf adsorptive Effekte zurückzuführen. Durch die unterschiedlich stark angegriffenen Oberflächen könnte auch die Stärke der adsorptiven Kräfte beeinflusst werden.

Unabhängig davon, wie die unterschiedlichen Ergebnisse zustande kommen, ist daraus abzuleiten, dass eine Kalibrierung jedes Messchips erforderlich ist. Beispielsweise könnte man mit jedem Chip zunächst einmal die Bindung von Ethacridinlactat messen, bevor der Chip für weitere Messungen verwendet wird.

Anders als bei den Messungen mit der Spektralphaseninterferenz (SPI, Abschnitt 3.1.1) zeigten sich weder eine stabile Bindung von Ethacridinlactat an die Carboxyloberfläche noch eine Schichtdickenabnahme bei Cetylpyridiniumchlorid.

Beides legt nahe, dass die Beschichtung nicht erfolgreich war. Die entsprechenden Sensogramme ähneln den SPI-Sensogrammen der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid bzw. Ethacridinlactat an unbeschichtetes Glas (Abschnitt 3.1.2.3). Für diese Vermutung spricht ebenfalls, dass sich durch die unterschiedlichen pH-Werte zumindest bei Cetylpyridiniumchlorid kaum Veränderungen der Sensogramme ergeben (Abbildung 44).

Bei Ethacridinlactat kamen durchaus unterschiedliche Signale in Abhängigkeit vom verwendeten Fließmittel zustande. Vermutlich sind diese darauf zurückzuführen, dass Ethacridinlactat in Pufferlösungen nicht stabil ist. Es wurde bereits bei anderen Versuchen

beobachtet, dass die Substanz in Pufferlösungen praktisch nicht lagerfähig ist. Bereits am nächsten Tag kann man beobachten, dass die ehemals gelbe Lösung braun geworden ist und zahlreiche braune Agglomerate enthält. Bei der Größenordnung, in der man mit RIfS misst, könnten auch schon geringere Ausfällungen detektiert werden. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Spitze bei Ethacridinlactat-Zugabe in Abbildung 43 durch die Anlagerung eines Agglomerats zustande kommt, das sich beim ersten Kontakt der Ethacridinlactat-Lösung mit dem Ammoniumchlorid-Puffer gebildet hat. Durch die Kraft der Strömung würde dieses zunächst wieder von der Oberfläche abgespült. Im Laufe der Messung fällt jedoch weiteres Ethacridinlactat aus und lagert sich allmählich auf der Oberfläche an, wodurch der allmähliche Anstieg der Messkurve zu erklären wäre. Bei Verwendung von Wasser als Fließmittel wurden weder die Spitzen zu Beginn der Ethacridinlactat-Zugabe noch der nachträgliche Anstieg der Messkurve beobachtet. Dies spricht für die Inkompatibilität von Ethacridinlactat mit Puffern als Ursache für den abweichenden Kurvenverlauf.

Bei Cetylpyridiniumchlorid sind ähnliche Phänomene zu beobachten. Auch bei diesen Sensogrammen (Abbildung 44 und Abbildung 45) sind die Spitzen bei Wirkstoff-Zugabe nur in den gepufferten Systemen zu sehen; bei Wasser ist die Spitze kaum vorhanden. Der nachträgliche Anstieg der Messkurve ist besonders bei PBS stark ausgeprägt; beim Ammoniumchlorid-Puffer ist er etwas schwächer. Möglicherweise ist die starke Ausprägung bei PBS auf die hohe Molarität zurückzuführen, die durch den Zusatz der Chloride zustande kommt. Es scheint also auch Inkompatibilitäten von Cetylpyridiniumchlorid und Puffern zu geben.

Um die bereits angesprochene Vermutung, dass die Beschichtung mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid nicht erfolgreich war, zu untersuchen, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.4). Die Oberfläche wurde mit NHS und DCC aktiviert, um das Protein Streptavidin daran zu binden. Diese Bindung konnte nur an einer Carboxyloberfläche gelingen. Da das Sensogramm in Abbildung 47 keine stabile Bindung des biotinylierten Antikörpers an die Oberfläche zeigte, kann man davon ausgehen, dass der Antikörper nur an die Oberfläche adsorbierte. Wäre Streptavidin auf der Oberfläche immobilisiert gewesen, so hätte sich eine stabile Bindung ergeben müssen.

Der Kontrollversuch ist kein sicherer Nachweis dafür, dass die Carboxylbeschichtung nicht erfolgreich war, da auch einer der Folgeschritte (Aktivierung, Bindung von Streptavidin) gescheitert sein könnte. Er konnte aber auch nicht belegen, dass die Beschichtung erfolgreich gewesen wäre. Aus den weiter oben anführten Gründen (Sensogramme der Bindung von

Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat) ist es jedoch wahrscheinlich, dass schon einer der ersten Beschichtungsschritte nicht funktioniert hat. Faktoren, die hierfür verantwortlich sein könnten, wäre eine Hydrolyse des Bernsteinsäureanhydrids. Das Reagenz wäre dann nicht mehr reaktiv. Wenn APTES durch Polymerisation unbrauchbar wird, müsste man dies der Substanz ansehen können, da APTES dabei Farbe und Konsistenz ändert. Beide Substanzen wurden neu bestellt und der Versuch wiederholt, ohne dass sich an den Ergebnissen etwas änderte. Diese beiden Reagenzien sind also als Fehlerquelle auszuschließen. Damit bleibt nur die Vorbehandlung der Glasträger mit Natronlauge und Piranha-Lösung als Fehlerquelle übrig. Bei den bisherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe [Hartmann, 2004], [Vornicescu, 2007] und bei der Vorbereitung der SPI-Chips war die Vorbehandlung gut geeignet. Bei den RIfS-Chips ist die Glasoberfläche möglicherweise von einer anderen Beschaffenheit, die es unmöglich macht, APTES durch die beschriebene Vorbehandlung aufzubringen. Es muss in der Zukunft also eine andere Methode der Vorbehandlung gefunden werden.

Eine andere denkbare Möglichkeit für die von den SPI-Messungen abweichenden Ergebnisse könnte ein unterschiedliches Strömungsverhalten in den Messgeräten sein. Wenn die Turbulenzen bei dem RIfS-Gerät stärker wären als beim SPI-Gerät, so würden auf den gebundenen Analyten größere Kräfte wirken, die ihn möglicherweise eher abspülen würden. Hierdurch wäre jedoch nur zu erklären, warum Ethacridinlactat nicht stabil an die Oberfläche bindet; nicht jedoch, warum es bei der Bindung von Cetylpyridiniumchlorid kein negatives Signal gibt. Das negative Signal kann nur durch eine fehlende Beschichtung erklärt werden.

Es ist also davon auszugehen, dass das bisher verwendete Beschichtungsprotokoll für die RIfS-Chips nicht geeignet ist.

Die Untersuchung der Bindung von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an eine Polyurethan-Oberfläche wurde mittels SPI durchgeführt.

Für das Spincoating der Glasträger erwies sich eine Lösung von Polyurethan in Chloroform als geeignet. Die Lösung ist in Konzentrationen zwischen 0,5% und 1% verwendbar; es wurde die niedrigere Konzentration gewählt, da durch die einprozentige Lösung keine wesentlich höheren Signale erzielt werden konnten (Abschnitt 3.1.3.1). Für das Coating wurden entweder 200 µL oder 400 µL der Lösung verwendet. Durch das größere Volumen konnte das Signal gesteigert werden (Abschnitt 3.1.3.3).

Dies ist leicht zu erklären: Durch das größere Volumen wurde mehr Polyurethan auf die Oberfläche aufgebracht. In diese dickere Matrix kann sich bei der Messung mehr Wirkstoff einlagern als in die dünnere Matrix. Allerdings ist es überraschend, dass dieser Effekt bei der Verwendung der höheren Konzentration nicht so ausgeprägt war. Möglicherweise liegt der Grund auch hier wieder in einer unterschiedlichen Beschaffenheit der einzelnen Messchips.

Inwieweit das Signal durch die Verwendung noch größerer Volumina gesteigert werden kann, wurde nicht untersucht.

Beim Vergleich der Sensogramme der Bindung der drei verschiedenen Desinfizientien Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat an die Polyurethan-Oberfläche (Abschnitt 3.1.3.2) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Bindung an die Carboxyloberfläche: Bei Ethacridinlactat ergab sich eine stabile Bindung, bei Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid kam es jedoch zu einer Schichtdickenabnahme.

Wie auch bei der Carboxyloberfläche war bei der Bindung von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid zunächst ein positives Signal zu beobachten, welches vermutlich auf die initiale Anlagerung der Moleküle zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf der Messung sank das Signal jedoch schlagartig ins Negative. Anders als bei der Carboxyloberfläche war die Schichtdickenabnahme hier bei Wasserzugabe reversibel. Das spricht dagegen, dass die Beschichtung durch sich ablösende Wirkstoffmoleküle abgerissen wurde, wie es vermutlich bei der Carboxylbeschichtung der Fall war. Es ist hier wahrscheinlicher, dass die Einlagerung von Benzalkoniumchlorid bzw. Cetylpyridiniumchlorid die Polyurethan-Schicht kollabieren lässt. Dies könnte beispielsweise durch Verdrängen von Wasser- oder Luftmolekülen aus der Polymermatrix geschehen. Da das Phänomen nur bei Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid auftritt, nicht jedoch bei Ethacridinlactat, ist es wahrscheinlich, dass auch hier ein Zusammenhang zum tensidischen Charakter von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid besteht.

Die Bindung von Ethacridinlactat in verschiedenen Konzentrationen an Polyurethan wurde ebenfalls untersucht (Abschnitt 3.1.3.4). Dabei wurde ein annähernd proportionaler Zusammenhang zwischen der Höhe des Signals und der Ethacridinlactat-Konzentration festgestellt (Abbildung 40). Demnach kann man die einzulagernde Wirkstoffmenge durch Verwendung hoch konzentrierter Wirkstofflösungen steigern. Die Grenze liegt jedoch bei einer Ethacridinlactat-Konzentration von 10 mg/mL; mehr Ethacridinlactat ist in Wasser nicht löslich.

Auffällig, doch nicht überraschend ist, dass bei der Bindung von Ethacridinlactat an Polyurethan sehr viel höhere Signale erzielt werden als bei der Bindung an eine Carboxyloberfläche. Auf der Carboxyloberfläche entsteht eine monomolekulare Schicht von Ethacridinlactat. Bei einer Polyurethan-Oberfläche lagert sich Ethacridinlactat nicht nur auf der Schicht an, sondern auch in der Schicht. Somit lassen sich in oder auf einer Polyurethan-Schicht wesentlich mehr Wirkstoffmoleküle immobilisieren als auf einer Carboxylschicht. Hinzu kommt, dass bei der Carboxylschicht pro Spacer-Molekül auch nur ein Wirkstoffmolekül gebunden werden kann. Daher ist zu vermuten, dass auch schon *auf* der Polymerschicht die Ethacridinlactat-Moleküle sehr viel dichter gepackt sind. Durch den gegebenen Versuchsaufbau ist letzteres allerdings nicht nachzuweisen.

Die Immobilisierung von Ethacridinlactat im Polyurethan scheint also demnach eine attraktivere Immobilisierungsmethode zu sein als die Immobilisierung über ein Spacer-Molekül.

In den weiteren Experimenten wurde daher auch der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Freisetzungseigenschaften aus dem Polymermaterial gelegt. Die Proben, auf denen Ethacridinlactat über einen Spacer immobilisiert worden war, wurden nur noch gelegentlich ergänzend untersucht (Abschnitte 3.4.5 und 4.4).

4.2 Freisetzungsversuche: Erarbeiten einer geeigneten Technik

Anders als die in Abschnitt 4.1 diskutierten Ergebnissen wurden die Ergebnisse, die hier zu diskutieren sind, teilweise schon in Abschnitt 3.3 interpretiert. Dies mag eine unübliche Vorgehensweise sein, doch einige der Ergebnisse sind ohne diese sofortige Interpretation schwer zu verstehen. Außerdem wäre eine ausführliche Diskussion der einzelnen Ergebnisse an dieser Stelle langwierig und wenig interessant.

Die Diskussion in diesem Abschnitt beschäftigt sich übergreifend mit den verschiedenen in Abschnitt 3.3 dargestellten Teilergebnissen. Aspekte dieser Diskussion sollen die verschiedenen Messtechniken, die Spültechnik und die Auswahl eines geeigneten Quellmittels sein. Die Aspekte wurden teilweise schon angesprochen; diese Diskussion soll dann einen abrundenden Gesamteindruck vermitteln.

Für die Bestimmung der freigesetzten Ethacridinlactat-Mengen wurden zwei verschiedene Messverfahren verwendet: die UV/Vis-Spektroskopie und die Fluoreszenzspektroskopie.

Zu Beginn wurde die UV/Vis-Spektroskopie angewandt, da dies eine klassische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Lösungen ist. Laut Literatur liegt die untere Bestimmungsgrenze bei 0,25 AU [Rücker et al., 2001]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in einem Konzentrationsbereich oberhalb von 2 µg/mL noch ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Absorption gegeben war, obwohl die Absorption hier nur 0,012 AU betrug (Abschnitt 3.3.1).

Die gemessenen Absorptionen lagen jedoch teilweise noch niedriger (bis zu -0,003 AU). Diese geringen Wirkstoffmengen sind mit UV/Vis-Spektroskopie nicht mehr zuverlässig zu bestimmen. Es können sich bei der Berechnung mittels der Kalibriergerade (Abbildung 49) sogar negative Freisetzungsmengen ergeben, und zwar immer dann, wenn der (positive) y-Achsenabschnitt der Geradengleichung dem Betrage nach größer ist als die gemessene Absorption. Negative Freisetzungsmengen können sich also rechnerisch ergeben, praktisch begründbar sind sie jedoch nicht. Es gab zwei Möglichkeiten, diesem Problem zu begegnen. Einerseits könnte man allen Absorptionen unterhalb von 0,012 AU eine Konzentration von Null zuordnen. Dadurch gehen jedoch Informationen bezüglich des Trends verloren. Beispielsweise würde das für die Freisetzungskurven der in Toluol gequollenen Schläuche (Abbildung 60 in Abschnitt 3.3.1.5) bedeuten, dass sie die ersten 150 Minuten entlang der Nulllinie verlaufen würden um danach plötzlich linear anzusteigen. Dies würde der Realität

nicht gerecht werden. Daher wurde entschieden, zu allen Messwerten, die mit der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt wurden, einen Wert von 0,0053 AU zu addieren. Dieser Wert setzt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade in Abbildung 49 und dem niedrigsten gemessenen Absorptionswert von -0,003 AU (in Aceton gequollene und mit Wasser gespülte Schläuche nach 5 Minuten, Abschnitt 3.3.1.1) zusammen.

Dadurch wurde erreicht, dass alle Freisetzungskurven im positiven Bereich verlaufen, ohne dass Informationen über Trends verloren gingen. Allerdings sind die absoluten Werte der freigesetzten Wirkstoffmengen besonders in den niedrigen Konzentrationsbereichen mit Vorsicht zu interpretieren, da sie um 0,7 µg/mL nach oben verschoben wurden und die Messungen zudem in einem Konzentrationsbereich erfolgten, für den es keine Kalibriergerade gibt, weil man sich unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) befindet. Die Interpretation sollte eigentlich in die Richtung gehen, dass man die Zahlenwerte bei den Freisetzungen aus den in Aceton, Toluol oder Wasser gequollenen Schläuchen nicht beachtet, sondern nur die Aussage aus den Ergebnissen ableitet, dass die Freisetzung aus den entsprechend vorbehandelten Schläuchen zwar stattfindet, jedoch auf einem so niedrigen Niveau, dass sie nicht quantifizierbar ist.

Bei den in Dioxan, Ethanol oder Methanol gequollenen Schläuchen fallen die addierten 0,7 µg/mL nicht so stark ins Gewicht, und auch die Messungen fanden überwiegend in einem quantifizierbaren Konzentrationsbereich statt, so dass man hier eher Aussagen über absolut freigesetzte Wirkstoffmengen treffen kann. Gedanklich kann man von den entsprechenden Werten auch 0,7 µg/mL wieder subtrahieren. In den verschiedenen Graphiken ist dies nicht geschehen, um die relative Lage der Freisetzungskurven der verschiedenen Quellmittel zueinander nicht zu verfälschen.

Bei der Fluoreszenzspektroskopie liegt die Bestimmungsgrenze deutlich niedriger: Auch bei Konzentrationen von 0,2 µg/mL sind noch klar lineare Zusammenhänge zwischen der Konzentration und der Fluoreszenzintensität nachzuweisen (vgl. Abbildung 85). Die zugehörige Fluoreszenzintensität liegt zwischen 500 und 1000 AU (in diesem Fall bei 876 AU), und erreicht damit noch lange nicht die Kapazitätsgrenzen des Messgerätes.

Die höhere Genauigkeit der Fluoreszenzspektroskopie brachte verschiedene Vorteile für die Messungen. Abgesehen davon, dass Sachverhalte aufgedeckt werden konnten, die bei den UV/Vis-Messungen verborgen geblieben waren (vgl. die Abschnitte 3.3.5.1.1, 3.3.5.1.5, 3.3.5.2.1, 3.3.5.2.5 und 4.3), waren keine Kumulativmessungen mehr erforderlich, da nun auch quantifizierbare Konzentrationen erreicht wurden, wenn man pro Messpunkt ein eigenes

Freisetzungsgefäß mit je 1 mL Freisetzungsmedium verwendete. Dadurch fiel die Beschränkung auf neun Messpunkte weg, was letztlich das Freisetzungsexperiment über ein halbes Jahr erst ermöglichte (Abschnitt 3.3.5.3). Weiterhin kann man nun mit größerer Sicherheit davon ausgehen, dass die ermittelten Konzentrationen der Realität entsprechen, obwohl auch hier die gemessenen Absorptionen häufig eher im unteren Bereich der Kalibriergerade – oder im Falle der in Aceton oder Wasser gequollenen Schläuche sogar darunter – liegen. Bei diesen beiden Lösungsmitteln sollte man also weiterhin die Zahlenwerte der freigesetzten Wirkstoffmengen nicht überbewerten, sondern eher die allgemeine Tendenz der Freisetzungskurven beurteilen.

Die Diskussion der Spültechnik lässt in drei Bereiche aufgliedern: Im Verlauf der Arbeiten wurde die Art und Weise, wie gespült wurde, mehrmals umgestellt (beschrieben in Abschnitt 2.2.1.2.2). Außerdem stellte sich die Frage, ob man zum Spülen Wasser oder ein anderes Lösungsmittel, z.B. das jeweilige Quellmittel verwenden sollte (Abschnitt 3.3.1). Weiterhin wurde untersucht, ob man die einbringbare Wirkstoffmenge steigern kann, indem man die Schläuche vor dem Spülen zunächst trocknet (Abschnitt 3.3.2).

Zu Beginn wurden die Schlauchstücke mit dreimal 20 mL Wasser (oder Lösungsmittel) bei 300 rpm gespült. Die meisten der Freisetzungsversuche wurden mit Schläuchen durchgeführt, die solchermaßen gespült worden waren. Für die Wiederholung der Freisetzungsversuche in Abschnitt 3.3.5.1, sowie für die in Abschnitt 3.3.5.2 beschriebene einwöchige Freisetzung wurden die Schläuche sechsmal in je 1 mL Wasser bei 2500 rpm gespült.

Durch das stärkere Schütteln auf dem Vortexer sollten sich Wirkstoffpartikel, die sich im Innern des Schlauches abgelagert haben, besser entfernen lassen als durch das moderate Schütteln eines Becherglases. Durch das häufigere Spülen wird sichergestellt, dass in der letzten Spüllösung kein Wirkstoff mehr enthalten ist. Bei dreimaligem Spülen ist dies nicht unbedingt gewährleistet. Das geringere Volumen ist erforderlich, weil man für das starke Schütteln bei 2500 rpm ein geschlossenes Gefäß benötigt. Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 mL) sind hierfür sehr gut geeignet.

Dass die Umstellung der Methode zu gründlicheren Spülergebnissen führte, zeigt sich besonders deutlich in Abschnitt 3.3.5.1.2, wo die Freisetzung aus unterschiedlich beschichteten, in Ethacridinlactat/Dioxan gequollenen Schläuchen untersucht wird. In Abbildung 89 wurden mit der alten Spülmethode nach sechs Stunden durchschnittlich 44 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt (davon 42 µg/mL in den ersten 60 Minuten). Die

Standardabweichungen bei den verschiedenen Messpunkten lagen dabei zwischen 36 und 150%! Mit der neuen Spülmethode (Abbildung 91) waren nach sechs Stunden durchschnittlich 2,7 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt worden; die Standardabweichungen lagen bei 4 bis 47%, also deutlich niedriger. Dabei ist noch zu beachten, dass die Angabe einer prozentualen Standardabweichung stets für den kleineren Mittelwert ungünstiger ausfällt. Bei der Angabe absoluter Standardabweichungen würde die Überlegenheit der zuletzt entwickelten Spülmethode also noch deutlicher zutage treten.

Leider wurde die Spülmethode erst sehr spät im Arbeitsverlauf entwickelt, so dass die meisten der vorhandenen Messungen noch mit der unterlegenen Methode durchgeführt wurden. Allerdings ist das in Abbildung 89 angeführte Beispiel auch dasjenige, welches am stärksten gegen die alte Spülmethode spricht. Bei vielen anderen Versuchen ergaben sich auch mit der alten Methode keine so hohen Standardabweichungen, wenngleich bei allen direkten Vergleichen der beiden Spülmethoden (Abschnitt 3.3.5.1) die freigesetzten Wirkstoffmengen bei den nach der alten Methode gespülten Proben etwas höher waren.

Schläuche, die zum Sterilisieren eingeschickt werden sollten, mussten am Stück gequollen und gespült werden. Dazu wurde der Schlauch an eine Schlauchpumpe angeschlossen, mit der bei einer Flussrate von 1 mL/min Wasser durch den Schlauch gepumpt wurde. Von außen wurde der Schlauch mit dreimal 40 mL Wasser gespült (Abbildung 19 in Abschnitt 2.2.1.2.2). Solchermaßen vorbereitete Schläuche wurden für die Freisetzungsversuche verwendet, deren Ergebnisse in den Abschnitten 3.3.5.4 und 3.3.5.6 dargestellt sind.

Die nach sechs Stunden freigesetzten Wirkstoffmengen schwanken dabei zwischen 1,5 µg/mL und 3,9 µg/mL (Messreihen 15 Tage bzw. 35 Tage in Abbildung 115). Damit liegen die freigesetzten Wirkstoffmengen mit dieser Spülmethode zwischen denen der alten Spülmethode (4,1 µg/mL, aus Abbildung 102) und der neuen Spülmethode (1,05 µg/mL, aus Abbildung 103).

Die gründlichste Spülmethode ist also die, bei der Schlauchstücke bei 2500 rpm sechsmal mit je 1 mL Wasser gespült werden. Dieses Verfahren ist für ganze Schläuche leider nicht anwendbar. Möglicherweise könnte man die Spülleistung bei diesem Aufbau jedoch noch verbessern, indem man die Anzahl der Spülschritte erhöht (z.B. ebenfalls auf sechsmal 40 mL Wasser), die Dauer des Spülens mit der Schlauchpumpe verlängert (z.B. von 5 auf 10 Minuten) und den Schlauch auch einmal anders herum an die Pumpe anschließt oder die Pumpe rückwärts laufen lässt.

Da das Verfahren zum Spülen ganzer Schläuche das Verfahren sein wird, das auch in der Zukunft angewendet werden wird, könnte es sich auch lohnen, spezielle Spül- und Quellwannen für die Schläuche zu entwickeln, in denen sie nicht zwingend zusammengerollt werden müssen. Die Wannen könnte man so konstruieren, dass sie kontinuierlich mit Wasser durchspült werden. Durch die Strömungsturbulenzen könnte dann ein guter Reinigungseffekt von außen zustande kommen.

Um die Frage zu beantworten, ob die Schläuche mit Wasser oder mit einem anderen Lösungsmittel gespült werden sollten, wurden die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Versuche durchgeführt.

Es wurden für jedes Quellmittel die Spülmittel Wasser und das jeweilige reine Quellmittel miteinander verglichen. Dabei ergab sich bei Dioxan und Methanol, dass die mit Wasser gespülten Schläuche eine niedrigere Freisetzung aufwiesen als die mit dem jeweiligen Quellmittel gespülten. Das bedeutet, dass das Spülen mit Wasser gründlicher war als das Spülen mit einem der anderen Lösungsmittel. Wie die Unterschiede im Einzelfall vermutlich zustande kamen, wurde bereits im Ergebnisteil beschrieben (Abschnitt 3.3.1.2). Bei den in Aceton bzw. Toluol gequollenen Schläuchen ergaben sich jeweils nur sehr geringfügige Überlegenheiten von Wasser als Spülmittel; bei Ethanol war kein Unterschied feststellbar, was vermutlich auf die ähnliche Polarität von Ethanol und Wasser zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 3.3.1.3). Warum sich bei den in Methanol gequollenen Schläuchen deutliche Unterschiede zwischen den beiden – ebenfalls ähnlich polaren – Spülmitteln ergaben, ist unklar (vgl. Abschnitt 3.3.1.4).

Mit den beschriebenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass in zwei von fünf Fällen Wasser deutlich besser geeignet war als die jeweiligen anderen Quellmittel, in zwei Fällen war es etwas besser geeignet und in einem Fall war kein Unterschied zu erkennen. In keinem Fall erwies sich Wasser jedoch als das schlechtere Spülmittel. Erklärbar ist dies relativ einfach dadurch, dass Wasser als polares Lösungsmittel einen als Salz vorliegenden Stoff wie Ethacridinlactat besser lösen kann als dies apolare Lösungsmittel wie Dioxan oder Toluol vermögen.

Außerdem ist ein Vergleich der Quellmittel miteinander besser möglich, wenn alle Proben auf die gleiche Weise nachbehandelt wurden.

Hinzu kommt, dass Wasser von allen verwendeten Spülmitteln am wenigsten toxisch ist. Wenn die Qualität der Spülleistung nicht dagegen spricht, ist dies eigentlich schon das

entscheidende Kriterium, um sich für Wasser als Spülmittel zu entscheiden. Da die Spülleistung sogar klar *für* die Verwendung von Wasser zum Spülen spricht, fällt die Entscheidung, im Folgenden Wasser zum Spülen zu verwenden, eindeutig aus.

Um zu untersuchen, ob mehr Ethacridinlactat in die Polyurethan-Matrix eingeschlossen werden kann, wenn die Schläuche vor dem Spülen getrocknet werden, wurden die in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Versuche durchgeführt.

Unter der Maßgabe, dass die Schläuche mit Wasser gespült werden sollten, konnte in vier von sechs Fällen eine Überlegenheit der getrockneten Schläuche nachgewiesen werden, die sich in einer höheren Freisetzung äußerte. Bei den in Ethanol bzw. Wasser gequollenen Schläuchen konnte nach Einsatz der statistischen Methoden kein Vorteil erkannt werden. Andererseits wurde aber auch kein Nachteil nachgewiesen.

Betrachtet man den Einfluss des Trocknens vor dem Spülen im Hinblick auf die verschiedenen Lösungsmittel als Spülmittel, so konnte nur noch bei den in Methanol bzw. Toluol gequollenen Schläuchen ein Vorteil nachgewiesen werden. Bei den anderen Lösungsmitteln waren statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden nachzuweisen. Zu begründen ist dies damit, dass durch das Spülen mit dem Lösungsmittel das Polyurethan vermutlich erneut aufgequollen wird, so dass der Wirkstoff schneller „entkommen“ kann.

Die Schläuche werden jedoch mit Wasser gespült, und hier war in vier von sechs Fällen ein Vorteil durch das Trocknen zu verzeichnen. In den beiden anderen Fällen war kein Nachteil für die getrockneten Schläuche nachzuweisen. Daher wurde entschieden, die Schläuche im weiteren Verlauf der Versuche zunächst zu trocknen und erst danach zu spülen.

Um die verschiedenen Quellmittel miteinander zu vergleichen, wurden jeweils am Ende eines Abschnittes die Ergebnisse des jeweiligen Abschnittes so zusammengestellt, dass eine Gegenüberstellung der Lösungsmittel, die zum Quellen der Schläuche verwendet worden waren, möglich war. Die Ergebnisse, auf die hier Bezug genommen wird, sind in den Abschnitten 3.3.1.7, 3.3.3.6, 3.3.4.6, 3.3.5.1.6 und 3.3.5.2.6 dargestellt.

Bei fast allen Freisetzungskurven zeigen die in Dioxan gequollenen Schläuche die höchste Freisetzung. Sie liegt nach sechsstündiger Freisetzung zwischen 2,5 µg/mL und 44 µg/mL und bei der siebentägigen Freisetzung zwischen 7,8 µg/mL und 27 µg/mL. Teilweise sind

diese hohen Freisetzungsmengen aber auch auf die Spültechnik zurückzuführen (vgl. die Diskussion weiter oben). Bei der optimalen Spültechnik unterschied sich die Freisetzungsmenge in der einwöchigen Freisetzung (Abschnitt 3.3.5.2.6) kaum noch von der Freisetzung der in Methanol gequollenen Schläuche. Wegen hoher initialer Freisetzungen wirkten die Kurven im späteren Verlauf oft stagnierend. Bei den Freisetzungen aus den mit der neuen Spültechnik behandelten Proben war der Verlauf jedoch – ebenso wie bei den in Ethanol oder Methanol gequollenen Schläuchen – linear. Bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen bewegten sich die nach sechs Stunden freigesetzten Wirkstoffmengen zwischen 1,1 µg/mL und 5,5 µg/mL, bei den in Methanol gequollenen Schläuchen zwischen 2,1 µg/mL und 5 µg/mL. Nach sieben Tagen wurden aus den in Ethanol gequollenen Schläuchen zwischen 5,7 µg/mL und 12,4 µg/mL Ethacridinlactat freigesetzt, bei den in Methanol gequollenen Schläuchen waren es etwa 13 µg/mL.

Die Wirkstoffmengen, die aus den in Aceton, Wasser oder Toluol gequollenen Schläuchen freigesetzt wurden, lagen größtenteils unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,2 µg/mL bis 1,1 µg/mL bei Aceton, 0,15 µg/mL bis 1,6 µg/mL bei Wasser und etwa 2 µg/mL bei Toluol, jeweils nach sechs Stunden Freisetzung). Nach sieben Tagen Freisetzung steigerte sich die aus den in Aceton gequollenen Schläuchen freigesetzte Wirkstoffmenge auf etwa 2 µg/mL und bei den in Wasser gequollenen Schläuchen auf etwa 1 µg/mL. Dabei zeigten die Freisetzungskurven der in Toluol gequollenen Schläuche einen langsam linear steigenden Verlauf, während die Kurven bei den in Aceton bzw. Wasser gequollenen eher stagnierten, und zwar im Gegensatz zu den in Dioxan gequollenen Schläuchen auf einem sehr niedrigen Niveau.

Warum durch die verschiedenen Lösungsmittel unterschiedlich viel Ethacridinlactat in das Schlauchmaterial eingebracht werden konnte, kann nur ansatzweise erklärt werden. Mit Sicherheit besteht ein Zusammenhang zum Grad des Aufquellens des Polyurethans, dies kann jedoch nicht der einzige Grund sein, denn durch das Quellen in Aceton bzw. Toluol wurde kaum mehr Ethacridinlactat immobilisiert als durch das Quellen in Wasser, obwohl sich bei den beiden erstgenannten die Schläuche um 25% in der Länge ausdehnten, während sie sich unter dem Einfluss von Wasser überhaupt nicht messbar veränderten. Auch durch das Quellen in Ethanol bzw. Methanol erfuhren die Schläuche eine reversible Längenzunahme um 25%; es wurde hier jedoch mehr Ethacridinlactat immobilisiert als durch das Quellen in Aceton oder Toluol. Bei den in Dioxan gequollenen Schläuchen ist die Korrelation jedoch ausgezeichnet. Die Längenzunahme betrug hier 225%, und es wurde deutlich am meisten Ethacridinlactat im Schlauchmaterial immobilisiert. Durch das enorm starke Aufquellen steht

der Wirkstofflösung – wie man sich leicht vorstellen kann – eine sehr viel größere Schlauchoberfläche zum Adsorbieren und Einlagern zur Verfügung als bei den anderen Lösungsmitteln.

Wodurch das unterschiedlich starke Aufquellen jedoch zustande kommt, ist unklar. Es ist entlang der Reihe Dioxan-Ethanol/Methanol-Toluol-Wasser/Aceton keine klare Tendenz z.B. hinsichtlich der Polarität zu erkennen. Die hier wirkenden Einflüsse sind nicht leicht zu durchschauen und waren auch nicht vorhersehbar; deshalb wurden die Lösungsmittel auch einfach ausprobiert, ohne dass zuvor bestimmte Erwartungen vorhanden gewesen wären.

Warum bei den gleich stark aufgequollenen Schläuchen Unterschiede hinsichtlich der eingebrachten Wirkstoffmengen beobachtet wurden, ist aber möglicherweise mit der Polarität der Lösungsmittel und/oder mit der Konzentration der Wirkstofflösungen zu begründen.

So sind die beiden polareren Lösungsmittel Ethanol und Methanol in der Lage, eine größere Wirkstoffmenge in das Polyurethan einzubringen als dies die unpolareren Lösungsmittel Aceton und Toluol vermögen. Betrachtet man die chemische Struktur von Polyurethan, so kann man nachvollziehen, dass eher polare Substanzen eine Affinität zu dem Material besitzen:

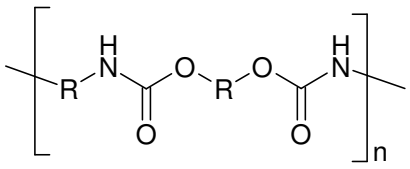


Abbildung 147: Strukturelement des Polyurethans: die Urethangruppe

Die Urethangruppe besitzt sowohl einen Wasserstoffbrückenakzeptor (Carbonylgruppe) als auch einen Wasserstoffbrückendonor (NH-Gruppe). Diese Struktur begünstigt die Anlagerung polarer Substanzen wie Ethacridinlactat oder der polaren Lösungsmittel Ethanol und Methanol. Durch die verbesserten Benetzungseigenschaften verbessert sich möglicherweise auch die Wirkstoffeinlagerung.

Außerdem sind die Ethacridinlactat-Konzentration war bei den Lösungen in Ethanol und Methanol mit 1% auch höher als bei Aceton (0,5%) und Toluol (0,01%). Allerdings wurde durch Toluol etwas mehr Ethacridinlactat in die Polymermatrix eingebracht als durch Aceton, obwohl Toluol erstens unpolarer ist und zweitens niedriger konzentriert war. Da jedoch bei beiden Lösungsmitteln unterhalb der Bestimmungsgrenze gemessen wurde, ist es auch möglich, dass der beobachtete Unterschied auf die Messungenauigkeit zurückzuführen ist. Bei

Einführung der Fluoreszenzmessungen wurden die in Toluol gequollenen Schläuche schon nicht mehr untersucht, so dass hier auch nicht so viele Daten vorliegen wie bei den Vergleichen der anderen Lösungsmittel miteinander. Es ist aber auch denkbar, dass es noch andere Einflussfaktoren gibt, die bestimmen, wie viel Wirkstoff durch das Lösungsmittel in die Matrix eingelagert werden kann.

Bei den in Wasser gequollenen Schläuchen wurde weiterhin beobachtet, dass die Schläuche sehr schlecht benetzbar waren, was sich darin äußerte, dass sie in Wasser schlechter untergingen als in anderen Lösungsmitteln. Bei den unbeschichteten Polyurethan-Schläuchen war dies ausgeprägter als bei den a:CH-beschichteten Schläuchen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der soeben beschriebenen Vermutung, dass Polyurethan durch hydrophile Lösungsmittel gut benetzbar sein müsste. Möglicherweise sind auf der Schlauchoberfläche noch hydrophobe Trennmittel aus der Schlauchherstellung vorhanden, die die Schlauchoberfläche vom Wasser abschirmen, durch die anderen (organischen) Lösungsmittel jedoch entfernt werden. Das könnte erklären, wie die Abweichung von der oben beschriebenen Theorie zustande kommt. Ebenfalls dafür spricht, dass die schlechte Benetzung bei den beschichteten Schläuchen weniger ausgeprägt ist, denn die Schläuche wurden vor der Begasung mit Ethylen mit Ethanol abgerieben. Natürlich könnte die bessere Benetzbarkeit aber auch durch die Beschichtung selbst zustande kommen.

Letztlich musste jedoch eine Entscheidung getroffen werden, welches Lösungsmittel für die weiteren Versuche zur Anwendung kommen sollte. Hierfür wurden sowohl die Ergebnisse aus den Freisetzungsversuchen einbezogen als auch toxikologische und praktische Überlegungen angestellt. Die Überlegungen kamen teilweise schon in den Abschnitten 1 und 3.3 zum Ausdruck; zur Abrundung sollen sie jedoch auch an dieser Stelle noch einmal ganz klar und abschließend dargestellt werden.

Die höchsten Freisetzungsmengen wurden mit den in Dioxan gequollenen Schläuchen erzielt, allerdings verschoben sich diese Beobachtungen bei Einführung der neuen Spültechnik, so dass vermutlich kaum ein Unterschied zu den in Ethanol oder Methanol gequollenen Schläuchen besteht. Allerdings wurden die Schläuche durch Dioxan so stark angegriffen, dass die Form der Schläuche und vermutlich auch die Reibungseigenschaften nicht den Anforderungen für Harnleiterschienen entsprechen. Ganze Schläuche konnten auch gar nicht in Dioxan gequollen werden: Durch die starke Längen- und Gewichtszunahme rissen die

Schläuche meist schon beim Quellen, spätestens jedoch beim Trocken auseinander. Dioxan scheidet als Quellmittel aus diesen Gründen aus.

Auch Toluol scheidet als Quellmittel aus, da nur sehr geringe Mengen Ethacridin immobilisiert werden konnten, wobei die Vorbereitung der Quelllösung sehr aufwändig war. Zudem ist Toluol gesundheitsschädlich. Auch wenn das Lösungsmittel entfernt sein sollte, bis die Harnleiterschiene dem Patienten implantiert wird, kommt bis dahin auch der Herstellende mit dem Lösungsmittel in Berührung. Insgesamt ist das Nutzen-Risiko-Verhältnis bei Toluol als Quellmittel so schlecht, dass es schon frühzeitig von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

Bei Wasser und Aceton als Quellmittel wurde nur sehr wenig Ethacridinlactat in die Polyurethan-Matrix eingebracht. Es war so wenig, dass die Freisetzung nicht einmal mit der notwendigen Sicherheit bestimmt werden konnte. Da sich der Sachverhalt bei den Quellmitteln Ethanol und Methanol günstiger darstellte, wurden auch Wasser und Aceton als Quellmittel ausgeschlossen.

Ob hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften Ethanol oder Methanol als Quellmittel zu bevorzugen ist, ist schwierig zu entscheiden, da einmal die in Ethanol gequollenen Schläuche die höhere Freisetzung zeigten (Abschnitte 3.3.1.7 und 3.3.5.1.6 erster Teil) und einmal die in Methanol gequollenen Schläuche (Abschnitte 3.3.5.1.6 zweiter Teil und 3.3.5.2.6). Manchmal war auch überhaupt kein Unterschied festzustellen (Abschnitte 3.3.3.6 und 3.3.4.6). Da im Hinblick auf die Freisetzungseigenschaften keine Entscheidung möglich war, mussten andere Kriterien für die Entscheidung herangezogen werden. Da auch hinsichtlich der Praktikabilität kaum Unterschiede bestehen, wurde die Entscheidung auf Grundlage der unterschiedlichen Toxizität getroffen. Metabolite von Methanol (Formaldehyd, Ameisensäure) können zur Erblindung führen. Da Methanol auch über die Haut (und Schleimhaut) aufgenommen wird, besteht hier durchaus ein – aufgrund der Mengen geringes – Risiko der Intoxikation. Deshalb wurde für die weiteren Versuche und die spätere Verwendung Ethanol als Quellmittel ausgewählt.

Im vorliegenden Abschnitt wurden die Messmethoden für die Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmengen diskutiert. Die Fluoreszenzspektroskopie erwies sich – wie erwartet – als geeigneter als die UV/Vis-Spektroskopie.

Bei der Diskussion der Spülmethoden zeigte sich, dass die neue Spülmethode (sechsmal 1 mL Wasser bei 2500 rpm) der alten (dreimal 20 mL Wasser bei 300 rpm) überlegen war. Das

Spülen ganzer Schläuche ist nur mit einer Schlauchpumpe durchgeführt worden. Es gibt aber auch hier noch einige Möglichkeiten, die Methode zu optimieren.

Weiterhin wurde begründet, warum es sinnvoll ist, die Schläuche nach dem Quellen zunächst zu trocknen und dann mit Wasser zu spülen.

Schließlich wurde noch die Auswahl von Ethanol als am besten geeignetes Quellmittel getroffen und begründet.

4.3 Vergleich von verschiedenen Beschichtungen (Freisetzungsversuche und mikrobiologische Untersuchungen)

Ähnlich wie in Abschnitt 4.2 wurden viele der hier zu diskutierenden Aspekte bereits im Ergebnisteil angesprochen. Bei der hier vorliegenden kapitelübergreifenden Diskussion kann es also gelegentlich zu Wiederholungen kommen.

Es sollen hier die verschiedenen a:CH-Beschichtungen miteinander verglichen werden. Dies soll sowohl im Hinblick auf die Freisetzungseigenschaften als auch auf die antibakterielle Wirksamkeit hin geschehen.

Bei den Freisetzungsversuchen, die mit UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt wurden, gab es zunächst noch keine Hinweise darauf, dass zwischen den verschiedenen a:CH-Beschichtungen Unterschiede bestehen könnten (Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4).

Bei den per Fluoreszenzspektroskopie vermessenen Proben ergaben sich erste Hinweise darauf, dass möglicherweise doch geringfügige Unterschiede zwischen den Beschichtungen bestehen könnten. Der einzige Hinweis, der häufiger auftauchte, war jedoch der, dass die in Aceton oder Wasser gequollenen unbeschichteten Schläuche regelmäßig (in fünf von sechs Fällen) eine geringere Freisetzung zeigten als die beschichteten Schläuche. Zu beobachten war dies in den Abschnitten 3.3.5.1.1, 3.3.5.1.5, 3.3.5.2.1 und 3.3.5.2.5.

Bei anderen Lösungsmitteln und a:CH-Beschichtungen traten vereinzelt ebenfalls Unterschiede auf (Abschnitte 3.3.5.1.2, 3.3.5.1.3, 3.3.5.1.4, 3.3.5.2.2 und 3.3.4.4); da es sich jedoch um Einzelfälle handelte, bei denen teilweise im Wiederholungsversuch genau das gegenteilige Ergebnis erzielt wurde (Abschnitt 3.3.5.1.2), handelt es sich hier wahrscheinlich eher um Messungenauigkeiten als um wirkliche Unterschiede zwischen den Beschichtungen. Die einzige Beobachtung, die man vielleicht im Hinterkopf behalten sollte, ist die aus Abschnitt 3.3.5.1.3, bei der sich eine Überlegenheit der DLC-NH3-beschichteten und in Ethanol gequollenen Schläuche andeutet, die allerdings im Wiederholungsversuch und in der einwöchigen Freisetzung (Abschnitt 3.3.5.2.3) nur noch visuell zu erkennen war, durch den t-Test aber nicht bestätigt wurde. Eine schlüssige Begründung, warum gerade die DLC-NH3-Beschichtung den anderen Beschichtungen überlegen sein sollte, kann hier nicht gegeben werden, ebenso wenig, wie erklärt werden kann, warum diese Beobachtung nur bei Ethanol als Quellmittel gemacht wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich auch hier nur um eine Messungenauigkeit handelt.

Dafür, dass bei den unbeschichteten Schläuchen regelmäßig eine niedrigere Freisetzung beobachtet wurde als bei den beschichteten Schläuchen, die aber nur bei den in Aceton oder Wasser gequollenen Schläuchen auftrat, gibt es jedoch eine Erklärung. Genau genommen gibt es sogar zwei Erklärungsansätze. Entweder wird durch Aceton und Wasser tatsächlich weniger Ethacridinlactat in die unbeschichteten Schläuche eingebracht als in die anderen, weil die beiden Lösungsmittel die Oberfläche der unbeschichteten Schläuche nicht so gut benetzen können wie die der beschichteten Schläuche, z.B. weil noch Trennmittel aus der Schlauchproduktion auf der Oberfläche vorhanden ist, welches vor der Beschichtung mit amorphem Kohlenstoff durch Abreiben mit Ethanol entfernt wurde. Es ist auch möglich, dass die der Beschichtung innewohnenden Eigenschaften die Benetzung durch Aceton und Wasser erleichtern (vgl. hierzu auch Abschnitt 4.2).

Warum die Beobachtung der niedrigeren Freisetzung aus den unbeschichteten Schläuchen bei den anderen Quellmitteln nicht gemacht wurde, kann zwei Gründe haben. Entweder tritt das Problem, das die verringerte Wirkstoffeinlagerung zur Folge hat, nicht auf. Das wäre z.B. der Fall, wenn die Ursache noch vorhandenes Trennmittel auf der Oberfläche wäre, und die anderen Quellmittel dieses einfach lösen würden. Es ist aber auch sehr gut denkbar, dass auch bei den in den anderen Lösungsmitteln gequollenen Schläuchen die Freisetzung aus den unbeschichteten Schläuchen im Vergleich zu den beschichteten Schläuchen niedriger ist. Da jedoch durch diese Quellmittel soviel mehr Ethacridinlactat in der Polymermatrix immobilisiert wird, wird der geringe Unterschied durch die hohe Freisetzung überlagert, die aus ganz anderen Gründen, die unabhängig von der Beschichtung sind, viel stärker schwankt.

Die Beurteilung der verschiedenen a:CH-Beschichtungen im Hinblick auf ihr Abschneiden beim mikrobiologischen Test (Abschnitt 3.4.6) fiel ebenfalls nicht eindeutig aus. Bei den wirkstofffreien Schläuchen (Abschnitt 3.4.6.1) waren kaum Unterschiede zwischen den Beschichtungen auszumachen. Nur bei der zweiten Spüllösung waren die Keimzahlen bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen gegenüber verringert. Bei den wirkstoffhaltigen Schläuchen (Abschnitt 3.4.6.2) waren die Keimzahlen bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen höher als bei den anderen Schläuchen, und in der zweiten Spüllösung zeigten wiederum die DLC-O-beschichteten Schläuche geringere Keimzahlen. Bei den sterilisierten Schläuchen (Abschnitt 3.4.6.3) waren die Keimzahlen in der Inkubationslösung der DLC-O-beschichteten Schläuche niedriger als bei den unbeschichteten und den DLC-NH3-

beschichteten Schläuchen. In der zweiten Spüllösung waren die Keimzahlen der unbeschichteten Schläuche am niedrigsten.

Die DLC-O-beschichteten Schläuche waren also bei drei von neun Vergleichen den übrigen Schläuchen überlegen, die unbeschichteten Schläuche in einem von neun Fällen. Die DLC-NH3-beschichteten Schläuche waren in drei von neun Fällen unterlegen. Diese gehen alle auf die wirkstoffhaltigen Schläuche zurück (Abschnitt 3.4.6.2), während sich die Überlegenheit der DLC-O-beschichteten Schläuche über alle drei Probenarten erstreckt.

Wenn die entsprechenden Hinweise nur in einem Drittel der Fälle auftreten, so ist dies nicht ausreichend, um dieser Tendenz große Bedeutung beimessen zu können. Bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen konzentriert sich die Unterlegenheit auf eine einzige Schlauchart, nämlich die Schläuche, die in Ethacridinlactat/Ethanol gequollen, aber nicht sterilisiert wurden. Wenn man aus dieser Beobachtung eine Schlussfolgerung ziehen wollte, so müsste sie lauten, dass die Wirkstoffeinbringung dazu führt, dass die Beschichtung mit aminofunktionalisierten Kohlenstoff schlechter wird. Wäre dies tatsächlich der Fall, so müssten die entsprechenden Beobachtungen auch bei den sterilisierten DLC-NH3-Schläuchen gemacht werden. Es ist nämlich sehr unwahrscheinlich, dass die Sterilisation den Nachteil wieder wettmachen würde. Sehr viel wahrscheinlicher ist es, dass die Unterlegenheit durch zufällige Schwankungen zustande gekommen ist, die bei der verwendeten Bestimmungsmethode sehr hoch sind. Die Schwankungen kommen z.B. sehr leicht dadurch zustande, dass sich Bakteriensuspension im Schlauchlumen einlagert. Diese wird dann erst beim Schütteln in den Spüllösungen entfernt und erhöht die Keimzahlen dort in nicht unerheblichem Ausmaß. Möglicherweise ist auch schon beim Animpfen eine größere Bakterienmenge in die Inkubationslösung gelangt, z.B. weil zum Animpfen Bakteriensuspension vom Boden des Reagenzglases aufgenommen wurde, nachdem sich dort schon mehr Bakterien abgesetzt hatten, obwohl versucht worden war, derartiges Vorgehen zu vermeiden.

Die Vermutung, dass die DLC-NH3-Beschichtung den anderen Beschichtungen unterlegen sein könnte, deckt sich auch nicht mit den Ergebnissen aus den Freisetzungsversuchen (s.o., sowie Abschnitt 3.3.5.1.3), in denen aus den in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen DLC-NH3-beschichteten Schläuchen größere Wirkstoffmengen freigesetzt wurden als aus den anders beschichteten Schläuchen.

Aus diesen widersprüchlichen Ergebnissen kann man weder eine Überlegenheit noch eine Unterlegenheit der DLC-NH3-Beschichtung oder der DLC-O-Beschichtung ableiten; es ist

also davon auszugehen, dass zwischen den Beschichtungen keine Unterschiede hinsichtlich der antibakteriellen Eigenschaften bestehen. Um solche Unterschiede aufzudecken – sofern es welche geben sollte – bedarf es demnach einer anderen Bestimmungsmethode.

Weder durch die Freisetzungsexperimente noch durch die mikrobiologischen Experimente konnten wesentliche Unterschiede zwischen den Beschichtungen eindeutig aufgedeckt werden.

Ein geringfügiger Vorteil der beschichteten gegenüber den unbeschichteten Schläuchen wurde in den Freisetzungsexperimenten gezeigt, jedoch nicht bei denen, die mit dem Quellmittel der Wahl – Ethanol – behandelt worden waren.

Die Hoffnung, die hinter diesen Experimenten stand, war die, dass man aus den entsprechenden Ergebnissen eine Entscheidung herleiten könnte, welche Beschichtung letztlich für die Harnleiterschienen verwendet werden sollte. Dass diese Experimente eine solche Entscheidung nicht ermöglichen, muss oder kann sie auf der Basis anderer Kriterien getroffen werden, z.B. anhand der Reibungseigenschaften, die von der Abteilung Experimentelle Urologie des Universitätsklinikums in Bonn ermittelt wurden.

Durch die Versuche wurde die Theorie über die Nanolöcher widerlegt, von der das Projekt BioMinMed zu Beginn ausgegangen war. Sie besagte, dass kleine Risse und Löcher in den amorphen Kohlenstoffschichten die Freisetzungseigenschaften steuern sollten. Da die freigesetzten Wirkstoffmengen bei den beschichteten Schläuchen eher höher waren als bei den unbeschichteten, kann man ausschließen, dass die Kohlenstoffschicht die Freisetzung in irgendeiner Weise behindert. Die Regulation der Freisetzung muss demnach durch die Polyurethan-Matrix selbst gesteuert werden.

4.4 Mikrobiologische Experimente zum Nachweis der Wirksamkeit der entwickelten Modifizierung der Proben

Der vorliegende Abschnitt beschäftigt sich mit den Ergebnissen der verschiedenen mikrobiologischen Untersuchungen. So wird zunächst der modifizierte Agardiffusionstest (Abschnitt 3.4.1) diskutiert. Danach soll der Erfolg des neu entwickelten mikrobiologischen Assays (Abschnitte 3.4.2 bis 3.4.5, sowie Abschnitt 3.4.8) besprochen werden. Dies soll im Hinblick auf die ursprüngliche Ausrichtung des Tests geschehen aber auch im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf andere Fragestellungen. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.6 wurden bereits in die Diskussion in Abschnitt 4.3 einbezogen. Die Ergebnisse des Abschnitts 3.4.7 wurden schon direkt im Ergebnisteil diskutiert.

Der einfachste Ansatz, die Wirksamkeit der Ethacridinlactat-Immobilisierung in den Schläuchen nachzuweisen, wäre ein abgewandelter Agardiffusionstest gewesen, wie er in Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.4.1.2 dargestellt.

Wäre die hemmende Wirkung auf Bakterien stärker, so hätte man mit diesem Versuchsaufbau auch gute Ergebnisse erzielen können. Da die freigesetzten Mengen an Ethacridinlactat jedoch sehr gering sind, kommen oft nur sehr schwach ausgeprägte Hemmhöfe zustande, manchmal sind sie auch gar nicht zu erkennen. Besonders interessant wäre ein deutliches Ergebnis bei den in Ethanol gequollenen Schläuchen gewesen, da Ethanol ja das letztlich ausgewählte Quellmittel ist. Leider lag gerade hier die Grenze des Agardiffusionstests. So waren einige Hemmhöfe gerade noch zu identifizieren (Proben 4, 6 und 7 mit einem Hemmhof von je 0,3 mm). Bei Probe 5 hätte ein ebenso großer Hemmhof entstehen müssen, dieser war jedoch nicht zu erkennen. Die Proben für den Agardiffusionstest wurden nach der alten Spülmethode (vgl. die Abschnitte 2.2.1.2.2 und 4.2) vorbereitet, d.h. bei Verwendung der neuen Spülmethode wären sehr wahrscheinlich gar keine Hemmhöfe mehr zu sehen, da diese neue Spülmethode noch gründlicher ist.

Der Agardiffusionstest ist demnach als Methode für den Nachweis der Wirksamkeit der Immobilisierung von Ethacridinlactat nicht geeignet, weil er nicht empfindlich genug ist.

Daher war es erforderlich, eine andere Methode zu entwickeln, mit der dieser Nachweis möglich sein würde. Dies ist mit der in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Methode geschehen.

Mit dieser Methode wurde in Abschnitt 3.4.2 die Überlegenheit von wirkstoffhaltigen Schläuchen gegenüber wirkstofffreien Schläuchen gezeigt. Einzig bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen war der Nachweis nicht eindeutig: in der zweiten Spüllösung konnte die Überlegenheit nicht gezeigt werden.

Es wurde versucht, möglichst viele Störfaktoren auszuschalten. Hierzu erfolgte die Animpfung der Inkubationslösung mit einem bestimmten Volumen. Außerdem wurde an jedem Tag eine Inkubationslösung ohne Probe bebrütet, um einen internen Standard einzuführen. Trotz des hohen Arbeitsaufwandes wurde eine große Anzahl von Proben untersucht, und es wurde jede Probenlösung dreimal auspipettiert. Weiterhin wurde die Bakteriensuspension vor jedem Pipettierschritt geschüttelt, um kein Konzentrationsgefälle an Bakterien innerhalb des Reagenzglases durch zu Boden gesunkene Bakterien zu verursachen.

Trotzdem weisen die Ergebnisse teilweise noch sehr hohe Schwankungen auf; die höchste relative Standardabweichung lag bei 134%! Trotz aller Normierungsversuche konnte es noch immer zu unregelmäßigem Wachstum der Bakterien kommen; im Schlauchlumen konnten sich Tropfen der Bakteriensuspension sammeln, die dann in die folgenden Spüllösungen überführt wurden, obwohl der Umfang diesen Transfers nicht mit den eigentlichen Oberflächeneigenschaften der jeweiligen Proben zusammenhängt. Auch ist das Schlauchmaterial sonst nicht von absolut gleichartiger Beschaffenheit, so dass z.B. an unregelmäßigen Schnittstellen vielleicht ein stärkeres oder schwächeres Bakterienwachstum stattfindet als an glatten Schnittflächen.

Für den Nachweis der Wirksamkeit der wirkstoffhaltigen Schläuche im Vergleich mit den wirkstofffreien Schläuchen waren die starken Schwankungen nicht entscheidend; es wurden trotzdem klare Ergebnisse mit dieser Methode erzielt. Problematischer waren die starken Schwankungen bei der Übertragung des Versuchsaufbaus auf andere Fragestellungen, insbesondere bei der Übertragung auf den Vergleich der beiden Beschichtungsmethoden (Abschnitt 3.4.5). Bei der Übertragung auf die Beurteilung der Wirkstoffschädigung durch die Sterilisierung sowie bei der Beurteilung der Wirksamkeit nach einem halben Jahr simulierter Freisetzung waren eher methodische Fehler für den Misserfolg des Versuches verantwortlich.

Bei der Übertragung des Assays auf die Beurteilung der Schädigung von Ethacridinlactat durch Gassterilisation fielen die Ergebnisse zunächst nicht aus wie erwartet (Abschnitt 3.4.3). Nur in der Inkubationslösung waren die Keimzahlen bei den sterilisierten Schläuchen regelmäßig geringer als bei den wirkstofffreien Proben. Bei den Spüllösungen konnten meist keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, bei den DLC-O-beschichteten

Schläuchen war die Keimzahl bei den sterilisierten Proben sogar höher als bei den Proben ohne Ethacridinlactat (vgl. Abbildung 134). Im Vergleich zu den unsterilisierten Proben mit Ethacridinlactat ergaben sich häufig hochsignifikante Unterlegenheiten der sterilisierten Schläuche. Nur bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen waren die Unterschiede der Keimzahlen in der Inkubationslösung und der zweiten Spüllösung nicht signifikant (vgl. Abbildung 135).

Aus diesen Ergebnissen müsste man den Schluss ziehen, dass die Sterilisierung durch Ethylenoxid den Wirkstoff so sehr schädigt, dass er deutlich an Wirksamkeit verliert. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so wäre dies für den weiteren Projektverlauf sehr kritisch.

Wie bereits weiter oben angesprochen, ist die entwickelte Methode sehr anfällig gegenüber Schwankungen, z.B. weil sich Bakteriensuspension ins Schlauchlumen einlagert, oder weil sich durch Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit (Schnittkanten) das Ausmaß des Bakterienwachstums ändert. Hinzu kommen jedoch zwei Fehler, die bei der Durchführung dieses Versuches begangen wurden. Es wurden nämlich die Proben zum Positivvergleich – also die unsterilisierten Schläuche mit Ethacridinlactat – direkt vor dem Versuch frisch hergestellt, während die sterilisierten Schläuche schon mehrere Wochen alt waren. In den Freisetzungsversuchen (Abschnitt 3.3.5.4) ergaben sich jedoch keine Hinweise darauf, dass durch die Alterung die freigesetzte Wirkstoffmenge abnimmt. Nichtsdestotrotz ist es natürlich möglich, dass Ethacridinlactat bei der Alterung zwar seine analytischen Eigenschaften wie Fluoreszenz behält, seine antibakteriellen Eigenschaften aber dennoch abnehmen. Der in Abschnitt 3.4.4 beschriebene Wiederholungsversuch weist darauf hin. Hier wurde der Positivvergleich am selben Tag hergestellt wie die zu sterilisierenden Proben. Die Keimzahlen von sterilisierten und unsterilisierten Proben waren dann in etwa gleich. In der zweiten Spüllösung war die Keimzahl bei den sterilisierten Schläuchen sogar geringer.

Allerdings sind die Keimzahlen bei den sterilisierten Schläuchen im Verhältnis zu den wirkstofffreien Schläuchen deutlich zurückgegangen. Das spricht dagegen, dass das schlechte Abschneiden der sterilisierten Schläuche auf Alterungsprozesse zurückzuführen war, denn dann hätte das Verhältnis von sterilisierten zu wirkstofffreien Schläuchen gleich bleiben müssen, während sich die Keimzahlen bei den unsterilisierten Proben mit Ethacridinlactat hätten erhöhen müssen. Folglich muss es einen anderen Grund für das schlechte Abschneiden der sterilisierten Schläuche im ersten Anlauf geben.

Es wurde tatsächlich bei der Probenvorbereitung ein weiterer Fehler begangen. Um auszuschließen, dass sich vor dem Versuch noch Fremdkeime auf den Proben befinden,

wurden die Proben einen Tag vor dem Versuch für zehn Minuten in Ethanol inkubiert und bis zum Versuch getrocknet. Bei den sterilisierten Proben wurde dies für entbehrlich gehalten, da ja durch den Sterilisationsprozess bereits alle Keime abgetötet sein sollten. Die Proben wurden also im ersten Versuch nicht alle gleich behandelt. Beim Wiederholungsversuch wurden dann auch die sterilisierten Proben einen Tag vor dem eigentlichen Versuch noch einmal in Ethanol inkubiert. Die Korrektur dieses Fehlers würde die Abnahme der Keimzahlen bei den sterilisierten Proben dann auch schlüssig erklären.

Derselbe Fehler wurde bei der Durchführung des in Abschnitt 3.4.8 beschriebenen Versuches begangen, wo beurteilt werden sollte, ob die Proben auch nach sechs Monaten Freisetzung noch aktiv genug sind, um die Besiedlung mit Bakterien zu verringern. Hier wurde keine der Proben vor dem Versuch in Ethanol inkubiert, abgesehen natürlich von den wirkstofffreien Proben, die ja 3,5 Stunden in reinem Ethanol gequollen worden waren. Entsprechend waren die Keimzahlen bei allen Proben unverhältnismäßig hoch.

Es waren trotzdem noch Tendenzen zu erkennen, dass die Keimzahlen der Proben aus der Langzeitfreisetzung (Abschnitt 3.3.5.3) etwas niedriger waren als die Keimzahlen der wirkstofffreien Schläuche. Die Größenordnung der Keimzahlen der frisch hergestellten, sowie der sterilisierten Schläuche passte jedoch nicht zu den bisherigen Ergebnissen. Wenn die Proben alle einen Tag vor dem Versuch in Ethanol inkubiert worden wären, wäre das Ergebnis wahrscheinlich deutlicher ausgefallen. So kann man leider nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob die Proben auch nach sechs Monaten noch genügend Ethacridinlactat freisetzen, um die Anlagerung von Bakterien an die Oberfläche zu verringern; es besteht jedoch eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass es so ist.

Beim in Abschnitt 3.4.5 dargestellten Vergleich der Immobilisierungsmethoden wurden die zuvor beschriebenen Fehler nicht begangen. Allerdings scheint die Methode nicht empfindlich genug zu sein, um Unterschiede zwischen den mit Spacer versehenen Proben und den wirkstofffreien Proben aufzudecken.

Die Unterlegenheit der Immobilisierungsmethode über einen Spacer gegenüber der Wirkstoffeinbringung durch Quellen konnte dagegen in der Regel klar belegt werden. Lediglich in der zweiten Spüllösung der DLC-NH3-beschichteten Schläuche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Schläuchen und den übrigen Proben (vgl. Abbildung 139). Dass die besagte Probe

hinsichtlich der Keimzahl aus dem Rahmen fällt, wurde jedoch schon hinlänglich diskutiert (s.o.).

Beim Vergleich der Proben mit Spacer ergeben sich bei den DLC-NH3-beschichteten Schläuchen keine signifikanten Unterschiede zu den wirkstofffreien Schläuchen; nur in der Inkubationslösung ist eine geringfügige, aber statistisch signifikante Unterlegenheit der Schläuche mit Bernsteinsäure ohne Ethacridinlactat zu erkennen. Bei den DLC-O-beschichteten Schläuchen dagegen ergibt sich bei den Proben mit Spacer ohne Ethacridinlactat in der zweiten Spüllösung eine hochsignifikante Unterlegenheit gegenüber den wirkstofffreien Schläuchen, allerdings sind weder bei der ersten Spüllösung noch bei der Inkubationslösung signifikante Unterschiede nachweisbar. Bei den Proben mit Spacer und Ethacridinlactat ergibt sich in der Inkubationslösung kein Unterschied zu den wirkstofffreien Schläuchen, in der ersten Spüllösung deutet sich eine Überlegenheit an, die jedoch in der zweiten Spüllösung in eine Unterlegenheit umschlägt.

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass man mit immobilisierten Carboxyl- und Aminogruppen Bakterien anreichern kann [Holländer et al., 2006]. Dies könnte erklären, warum die Keimzahlen der Proben mit Spacer (Carboxylgruppe) in der zweiten Spüllösung der DLC-O-beschichteten Proben soviel höhere Keimzahlen zeigen als dies die wirkstofffreien Proben tun. Andererseits dürften auch schon auf der Oberfläche ohne Spacer Carboxylgruppen vorhanden sein, denn zur Herstellung der DLC-O-Beschichtung wurde Sauerstoff in das Ethylengas eingeleitet. Dabei müssten sich u.a. Carboxylgruppen an der Oberfläche ausbilden. Wäre dies nicht der Fall, so wäre eine Bindung des Spacers Bernsteinsäure ohnehin nicht möglich, denn dieser benötigt zur Ankopplung eine Amino- oder Säuregruppe. Bei der anderen betrachteten Beschichtung (DLC-NH3) sind Aminogruppen an der Oberfläche vorhanden, für die die Bakterienanreicherung ebenfalls von Holländer et al. beobachtet wurde. Daher dürften ohnehin keine Unterschiede zwischen den wirkstofffreien Proben und den Proben mit Spacer auftreten. Dass solche Unterschiede trotzdem beobachtet wurden, dürfte den starken Schwankungen der Methode zuzuschreiben sein, zumal die Tendenz bei der ersten Spüllösung genau in die entgegengesetzte Richtung weist, nämlich auf eine Überlegenheit der Schläuche mit Spacer (vgl. Abbildung 138).

In Abschnitt 3.4.6.1 wurden die verschiedenen DLC-Beschichtungen miteinander verglichen (s. auch Abschnitt 4.3). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den funktionalisierten Beschichtungen DLC-O bzw. DLC-NH3 und der unfunktionalisierten Beschichtung DLC2

gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die hier entwickelte Methode nicht empfindlich genug ist, um die von Holländer et al. gefundenen Phänomene zu bestätigen.

Der Nachweis der Wirksamkeit des in der Schlauchmatrix immobilisierten Ethacridinlactats ist mit Hilfe eines neu entwickelten mikrobiologischen Spülassays gelungen. Der zunächst verwendete modifizierte Agardiffusionstest zeigte für diesen Nachweis als nicht die erforderliche Sensitivität.

Eine Übertragung des entwickelten Assays auf andere Problemstellungen war aus verschiedenen Gründen nicht immer erfolgreich, konnte aber zumindest Hinweise darauf liefern, dass immobilisiertes Ethacridinlactat vermutlich sterilisierbar ist, dass auch nach sechs Monaten wahrscheinlich noch genug Ethacridinlactat für eine Bakterien abweisende Wirkung freigesetzt wird, und dass die Methode der Immobilisierung von Ethacridinlactat in der Schlauchmatrix der Methode der Immobilisierung über einen Spacer überlegen ist.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch SPI-Messungen wurde aus einer Auswahl der drei antibakteriellen Wirkstoffe Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Ethacridinlactat der letztere ausgesucht. Er war der einzige der drei Stoffe, bei dem eine stabile Bindung beobachtet wurde, und zwar sowohl auf einer carboxylierten Oberfläche als auch auf Polyurethan. Bei der Bindung an Polyurethan wurden wesentlich höhere Signale beobachtet; deshalb lag beim weiteren Vorgehen der Schwerpunkt auf der Immobilisierung in der Polyurethan-Matrix, nicht auf der Immobilisierung über einen Spacer.

Die Übertragung der Versuche auf die RIfS war bislang noch nicht erfolgreich. Offenbar ist das verwendete Beschichtungsprotokoll nicht für die gegebenen Glasträger geeignet. Sobald eine geeignete Methode gefunden sein wird, die Oberfläche vorzubehandeln, können hier eine Vielzahl von Messungen durchgeführt werden: Abgesehen von den Messungen, die bereits mit SPI durchgeführt wurden, kann man die Bindung der Wirkstoffe bei verschiedenen pH-Werten untersuchen. Es können mehr als zwei Volumina der Polyurethan-Lösung untersucht werden, so dass man hier ein Optimum bestimmen kann. Auch bei der Bindung der Wirkstoffe an Polyurethan kann der Einfluss des pH-Wertes untersucht werden. Weiterhin kann man sich anschauen, ob eine stärkere Schichtdickenzunahme stattfindet, wenn man statt wässriger Ethacridinlactat-Lösung eine ethanolische Ethacridinlactat-Lösung verwendet. Und schließlich kann man die Bindung von Bakterien an die Oberfläche beobachten, und ob dabei Unterschiede auftreten zwischen der Bindung an eine reine Polyurethan-Oberfläche, an eine Polyurethan-Oberfläche mit Ethacridinlactat, an eine Oberfläche mit a:CH-Beschichtung oder an eine carboxylierte Oberfläche mit und ohne Ethacridinlactat.

Durch die Freisetzungsversuche wurde ermittelt, dass Ethanol und Methanol gleichermaßen dazu geeignet sind, Polyurethan aufzuquellen, um Ethacridinlactat in die Matrix einzulagern. Aufgrund der geringeren Toxizität fiel die Wahl auf Ethanol.

Um den Gehalt an freigesetztem Ethacridinlactat zu bestimmen, ist die Fluoreszenzspektroskopie besser geeignet als die UV/Vis-Spektroskopie, da sie wesentlich empfindlicher ist.

Zwischen den verschiedenen a:CH-Beschichtungen wurden so gut wie keine Unterschiede festgestellt. Nur bei den Proben die in Ethacridinlactat/Aceton bzw. Ethacridinlactat/Wasser gequollen worden waren, waren die freigesetzten Wirkstoffmengen aus den unbeschichteten Schläuchen regelmäßig etwas geringer als aus den beschichteten Proben. Die in

Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Proben mit DLC-NH3-Beschichtung zeigten in einigen Fällen eine höhere Freisetzung als die anderen in Ethacridinlactat/Ethanol gequollenen Proben.

Die Sterilisation mit Ethylenoxid schadet dem in den Harnleiterschienen immobilisierten Wirkstoff Ethacridinlactat vermutlich nicht. Dies konnte sowohl in den Freisetzungsversuchen als auch in einem neu entwickelten mikrobiologischen Assay (s.u.) gezeigt werden.

Ebenso sind durch Alterungseffekte zumindest in den ersten drei Monaten keine Einschränkungen zu erwarten, solange die Lagerung lichtgeschützt erfolgt. Bei Proben, die einige Stunden einer Bestrahlung mit UV-Licht ausgesetzt worden waren, wurde in den Freisetzungsversuchen ein Absinken der gemessenen Freisetzungsmengen beobachtet. Es könnte interessant sein, sowohl die Versuche zur Alterung über einen längeren Zeitraum durchzuführen als auch die Dauer der Bestrahlung mit UV-Licht zu erhöhen und diesen Effekt zu beobachten.

In einer Langzeitfreisetzung konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff über einen Zeitraum von einem halben Jahr freigesetzt wird. Die Freisetzungsrate zu Beginn ist deutlich höher als gegen Ende, doch auch die Wirkstoffmengen, die nach sechs Monaten noch freigesetzt werden, reichen anscheinend aus, um die bakterielle Besiedelung der Katheter zu verringern.

Weiterhin wurde in einem klassischen Agardiffusionstest eine Ethacridinlactat-Konzentration von 0,5% als minimale Hemmkonzentration gegen *Escherichia coli* bestimmt. In einer Variation des Agardiffusionstests, in dem unterschiedlich vorbehandelte Schläuche als antibakterielle Quelle verwendet wurden, konnten keine ausreichend präzisen Ergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit des immobilisierten Ethacridinlactats erzielt werden.

Daher wurde – wie bereits erwähnt – ein anderer mikrobiologischer Assay entwickelt. Dieser hatte zum Ziel nachzuweisen, dass die Einbringung von Ethacridinlactat in das Kathetermaterial die Verkeimung der Katheter tatsächlich verringert. Der Assay läuft auf der Basis eines Spülversuches unter der Annahme, dass Proben mit einer bakterienfeindlichen Oberfläche weniger Bakterien in die Spüllösung einschleppen als Proben mit einer bakterienfreundlichen Oberfläche.

Dieser Test war erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Besiedelung bei Ethacridinlactat-haltigen Proben im Vergleich zu wirkstofffreien Proben erheblich vermindert wird.

Der Assay konnte auf die Untersuchung der Wirksamkeit von Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid übertragen werden. Auch hier wurde die Wirksamkeit belegt.

Ebenfalls übertragen wurde der Assay auf die Untersuchung der Schädlichkeit der Sterilisation. Eine endgültige Aussage lässt sich hier noch nicht mit letzter Sicherheit treffen. Die ersten Versuche schienen auf eine fast vollständige Inaktivierung des Wirkstoffes durch die Sterilisation hinzudeuten. In einem Wiederholungsversuch, in dem zwei Fehlerquellen ausgeschaltet wurden, die die ersten Versuche noch beeinflusst hatten, war keine Unterlegenheit gegenüber den unsterilisierten Schläuchen mehr zu erkennen.

Beim Vergleich der verschiedenen untersuchten a:CH-Beschichtungen und den unbeschichteten Proben wurden auch hinsichtlich der Verkeimungsneigung keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Es wurde auch keine Überlegenheit der Proben festgestellt, auf denen Ethacridinlactat über einen Spacer an die Oberfläche gebunden war. Der Assay ist nicht empfindlich genug, um die Effekte, die durch so geringe Wirkstoffmengen verursacht werden, zu detektieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Methode der Immobilisierung in der Polyurethan-Matrix der Methode der Immobilisierung über einen Spacer überlegen ist.

Die Anwendung dieses mikrobiologischen Assays auf Basis eines Spülversuches kann auf vielfältige andere Fragestellungen übertragen werden. Im Rahmen dieses Projektes könnte man z.B. noch untersuchen, inwiefern sich Unterschiede zwischen Proben ergeben, die unterschiedlich lange mit UV-Licht bestrahlt wurden. Dabei sollten aber längere Zeiträume ausgewählt werden als dies in den Freisetzungsexperimenten der Fall war, da der Assay erwiesenermaßen geringe Unterschiede zwischen Proben nicht gut erfasst.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer antibakteriell beschichteten Harnleiterschiene. Dies soll dazu dienen, Komplikationen im Zusammenhang mit der Bildung von Biofilmen zu vermeiden oder zu verringern.

Aus einer Auswahl verschiedener antibakteriell wirksamer Arzneistoffe wurde Ethacridinlactat als geeignet ausgewählt. Dieser Entschluss wurde mit Hilfe von Spektralphaseninterferenz (SPI) getroffen, eine Methode bei der man Bindungsereignisse auf einem Messchip in Echtzeit beobachten kann.

Es standen zwei Immobilisierungsansätze zur Auswahl. Nach den SPI-Messungen wurde entschieden, sich auf die Immobilisierung direkt im Material der Harnleiterschiene (Polyurethan) zu konzentrieren, da über Spacer-Moleküle keine größeren Wirkstoffmengen immobilisiert werden können.

Ethacridinlactat wurde im Polyurethan immobilisiert, indem das Polymer durch wirkstoffhaltige Lösungsmittel aufgequollen wurde. Beim Trocknen des Polymers wurde Ethacridinlactat dann in die Matrix eingeschlossen.

Der Erfolg wurde mit Hilfe von Freisetzungsversuchen beurteilt. Die Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmengen erfolgte dabei zu Beginn durch die UV/Vis-Spektroskopie, später wurde auf die Fluoreszenzspektroskopie gewechselt. Die höhere Empfindlichkeit der letzteren Methode brachte eine Vielzahl von Vorteilen mit sich.

Von den per Freisetzung untersuchten Lösungsmitteln erwiesen sich sowohl Ethanol als auch Methanol als geeignet. Wegen der geringeren Toxizität wurde schließlich Ethanol ausgewählt.

Bei der Untersuchung verschiedener Beschichtungen aus amorphem Kohlenstoff konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Freisetzungseigenschaften zwischen den Beschichtungen festgestellt werden. Aus den unbeschichteten Schläuchen wurden geringfügig niedrigere Wirkstoffmengen freigesetzt als aus den beschichteten Proben. Dies konnte jedoch nur bei Proben detektiert werden, aus denen extrem wenig Ethacridinlactat freigesetzt wurde.

In weiteren Freisetzungsexperimenten wurde gezeigt, dass die Harnleiterschienen mit dem Wirkstoff im Dunkeln zumindest drei Monate haltbar sind, möglicherweise auch länger. Bei der Bestrahlung durch UV-Licht wird Ethacridinlactat jedoch zerstört. Mit Ethylenoxid sterilisierte Proben zeigten kein schlechteres Freisetzungsprofil als unsterilisierte Proben.

Zum Nachweis der Wirksamkeit der veränderten Harnleiterschienen wurde ein mikrobiologischer Assay entwickelt. Dieser beruht auf der These, dass durch Proben mit einer

bakterienfeindlichen Oberfläche weniger Mikroorganismen in eine Spüllösung eingeschleppt werden als durch Proben mit einer bakterienfreundlichen Oberfläche. Die Keimzahlen in den Spüllösungen der verschiedenen Proben wurden ausgezählt und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Durch diesen Assay konnte bestätigt werden, dass an den Ethacridinlactat-haltigen Proben weniger Bakterien anhaften als an Proben ohne Wirkstoff. Der Assay wurde mit unterschiedlichem Erfolg auf andere Problemstellungen übertragen.

So konnte nachgewiesen werden, dass auch Proben, in denen Benzalkoniumchlorid oder Cetylpyridiniumchlorid durch Quellen in Ethanol immobilisiert worden waren, eine geringere Verkeimungstendenz zeigten als Proben ohne Wirkstoff.

Der Nachweis, dass die Sterilisation mit Ethylenoxid den immobilisierten Wirkstoff nicht schädigt, wurde nicht eindeutig erbracht. Wahrscheinlich tritt jedoch keine Schädigung ein.

Auch der Nachweis, dass die Mengen an Ethacridinlactat, die nach sechs Monaten Freisetzung noch aus dem Schlauchmaterial abgegeben werden, noch ausreichen, um eine bakterielle Besiedelung zu verringern, ist nicht so eindeutig ausgefallen wie erhofft. Ein schwacher Hinweis auf diese Wirksamkeit ist jedoch vorhanden.

Der Vergleich der Immobilisierungsmethoden hinsichtlich der Wirkung auf die bakterielle Besiedelung des Harnleiterschienen-Material ergab eine deutliche Überlegenheit der Methode, die die Immobilisierung durch Quellen des Polyurethans herbeiführt gegenüber der Methode, bei der Ethacridinlactat über Spacer an die Oberfläche gebunden wird. Um einen Unterschied zwischen den Proben ohne Wirkstoff und den Proben mit Spacer aufzudecken, war der hier entwickelte Assay jedoch nicht empfindlich genug.

Sollte es Unterschiede zwischen den verschiedenen Kohlenstoffbeschichtungen und den unbeschichteten Proben hinsichtlich der Verkeimungsneigung geben, so wurden diese durch diesen Assay ebenfalls nicht aufgedeckt.

7 Literaturverzeichnis

Auge, B. K., Ferraro, R. F., Madenjian, A. R., Preminger, G. M.: "Evaluation of a Temporary Dissolvable Ureteral Drainage Stent in a Swine Model", *The Journal of Urology* 2002; **168**; 808-812.

Auge, B. K., Preminger, G. M.: „Ureteral stents and their use in endourology", *Current Oppinion in Urology* 2002; **12**; 217-222.

Baggio, B., Priante, G., Brunati, A. M., Clari, G., Bordin, L.: „Specific modulatory effect of arachidonic acid on human red blood cell oxalate transport: clinical implications in calcium oxalate nephrolithiasis", *Journal of the American Society of Nephrology* 1999; **10** Suppl. 14; 381-384.

Bayston, R., Penny, S. R.: „Excessive Production of Mucoid Substance in Staphylococcus SIIa: a Possible Factor in Colonisation of Holter Shunts", *Developmental Medicine and Child Neurology* 1972; **14** Supp. 27; 25-28.

Blenkinsopp, S. A., Khoury, A. E., Costerton, J. W.: „Electrical Enhancement of Biocide Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms", *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58**; 3770-3773.

Borboroglu, P. G., Amling, C. L., Schenkman, N. S., Monga, M., Ward, J. F., Piper, N. Y., Bishoff, J. T., Kane, C. J.: „Ureteral Stenting after Ureteroscopy for Distal Ureteral Calculi: a Multi-Institutional Prospective Randomized Controlled Study Assessing Pain, Outcomes and Complications", *The Journal of Urology* 2001; **166**; 1651-1657.

Breau, R. H., Norman, R. W.: "Optimal prevention and management of proximal ureteral stent migration and remigration", *The Journal of Urology* 2001; **166**; 890-893.

Cao, L. C., Boevé, E. R., de Bruijn, W. C., Kok, D. J., de Water, R., Deng, G., Schröder, F. H.: „Glycosaminoglycans and semisynthetic sulfated polysaccharides: an overview of their potential application in treatment of patients with urolithiasis", *Urology* 1997; **50**; 173-183.

Cauda, F., Cauda, V., Fiori, C., Onida, B., Garrone, E.: „Heparin Coating on Ureteral Double J Stents Prevents Encrustation: An in Vivo Case Study", *Journal of Endourology* 2008; **22**; 465-472.

Cho, Y. H., Lee, S. J., Lee, J. Y., Kim, S. W., Kwon, I. C., Chung, S. Y., Yoon, M. S.: „Prophylactic efficacy of a new gentamicin-releasing urethral catheter in short-term catheterized rabbits", *BJU International* 2001; **87**; 104-109.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., Beachey, E. H.: „Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces“, *Infection and Immunity* 1982, **37**, 318-326.

Cormio, L., La Forgia, P., La Forgia, D., Siitonen, A., Ruutu, M.: “Bacterial Adhesion to Urethral Catheters: Role of Coating Materials and Immersion in Antibiotic Solution“, *European Urology* 2001; **40**; 354-359.

Curhan, G. C., Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J.: „A Prospective Study Of Dietary Calcium And Other Nutrients And The Risk Of Symptomatic Kidney Stones“, *The New England Journal of Medicine* 1993, **328**(12), 833-838.

Denstedt, J. D., Reid, G., Sofer, M.: „Advances in ureteral stent technology“, *World Journal of Urology* 2000; **18**; 237-242.

DiTizio, V., Ferguson, G. W., Mittelman, M. W., Khoury, A. E., Bruce, A. W., DiCosmo, F.: „A liposomal hydrogel fort he prevention of bacterial adhesion to catheters“, *Biomaterials* 1998; **19**; 1877-1884.

Donat, S. M., Russo, P.: „Ureteral Decompression in Advanced Nonurologic Malignancies“, *Annals of Surgical Oncology* 1996; **3**; 393-399.

Fachinformation Allergodil® Augentropfen, Stand Februar 2006.

Fachinformation Dobendan® 5 mg/mL Lösung, Stand Mai 2008.

Fachinformation Dobendan® Cetylpyridiniumchlorid 1,4 mg Lutschpastillen, Stand Juli 2007.

Fachinformation Dobendan Strepsils® zuckerfrei 2,5 mg Lutschtabletten, Stand Mai 2008.

Fachinformation Dorithricin® Halstabletten, Stand Februar 2008.

Fachinformation Gingicain® D, Stand Dezember 2007.

Fachinformation Metifex® 200 mg, Stand Februar 2008.

Fachinformation Rivanol® 0,1 g, Rivanol® 1,0 g, Stand Dezember 2007.

Fachinformation Tannacomp®, Stand März 2008.

Fletcher, M.: „A Microautoradiographic Study of the Activity of Attached and Free-Living Bacteria“, *Archives of Microbiology* 1979; **122**; 271-274.

Gauglitz, G., Brecht, A., Kraus, G., Nahm, W.: „Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers“, *Sensors and Actuators B* 1993; **11**; 21-27.

Getliffe, K. A., Hughes, S. C., Le Claire, M.: „The dissolution of urinary catheter incrustation“, *BJU International* 2000; **85**; 60-64.

Ghiselli, R., Giacometti, A., Cirioni, O., Mocchegiani, F., Orlando, F., Del Prete, S. F., D'Amato, G., Scalise, G., Saba, V.: „Quinopristin/dalfopristin Bonding in Combination with Intraperitoneal Antibiotics Prevent Infection of Knitted Polyester Graft Material in a Subcutaneous Rat Pouch Model Infected with Resistant *Staphylococcus epidermidis*“, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2002; **24**; 230-234.

Giddens, J. L., Grasso, M.: „Retrograde Ureteroscopic Endopyelotomy Using the Holmium:YAG Laser“, *The Journal of Urology* 2000; **164**; 1509-1512.

Gorman, S. P., Woolfson, A. D.: „Novel Biomimietic and Bioactive Silicones“, *Medical Device Technology* 2002; **13**(September); 14-15.

Graiver, D., Durall, R. L., Okada, T.: „Surface morphology and friction coefficient of various types of Foley catheter“, *Biomaterials* 1993; **14**; 465-469.

Grill, A.: „Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials – an overview“, *Diamond and Related Materials* 2003; **12**; 166-170.

Hartmann, M.: „Neue Ansätze in der biomolekularen Interaktionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung pharmazeutischer und lebensmittelchemischer Fragestellungen“, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2004; 49-52.

Hauert, R.: „A review of modified DLC coatings for biological applications“, *Diamond and Related Materials* 2003; **12**; 583-589.

Holländer, A., Keusgen, M., Krämer, J., Ferner, A.: „Verfahren zur spezifischen Separation von Zellen und/oder Viren aus flüssigen Medien und dessen Verwendung“; Patent; Int. AZ: PCT/EP2006/000105; Int. Veröffentlichungsnummer: WO 2006/077020 A2.

Holmes, S. A. V., Cheng, C., Whitfield, H. N.: „The Development of Synthetic Polymers that Resist Encrustation on Exposure to Urine“, *British Journal of Urology* 1992; **69**; 651-655.

Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E., Kaneshima, H.: „Formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxin from 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan® DP300) and ist chlorinated derivatives by exposure to sunlight“, *Journal of Chromatography A* 1988; **454**; 145-155.

Kemppainen, E., Talja, M., Riihelä, M., Pohjonen, T., Törmälä, P., Alfthan, O.: „A bioresorbable stent“, *Urological Research* 1993; **21**; 235-328.

Kohler-Ockmore, J., Feneley, R. C.: „Long-term catheterization of the bladder: prevalence and morbidity“, *British Journal of Urology* 1996; **77**; 347-351.

Laube, N., Kleinen, L., Bradenahl, J., Meissner, A.: „Diamond-Like Carbon Coatings on Ureteral Stents – A New Strategy for Decreasing the Formation of Crystalline Bacterial Biofilms?“, *The Journal of Urology* 2007; **177**; 1923-1927.

Leventhal, E. K., Rozanski, T. A., Crain, T. W., Deshon, G. E. Jr., Dretler, S. P.: „Indwelling Ureteral Stents as Definitive Therapy for Distal Ureteral Calculi“, *The Journal of Urology* 1995; **153**(1); 34-36.

López, M., Hoppe, B.: „History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis“, *Pediatric Nephrology* 2008; DOI 10.1007/s00467-008-0960-5.

Manual BIAffinity, Analytik Jena, Stand August 2006.

Marrie, T. J., Costerton, J. W.: „Prolonged Survival of Serratia mercescens in Chlorhexidine“, *Applied and Environmental Microbiology* 1981; **42**; 1093-1102.

Masai, M., Ito, H., Kotake, T.: „Effect of dietary intake of urinary oxalate excretion in calcium renal stone formers“, *British Journal of Urology* 1995; **76**(6); 692-696.

Morris, N. S., Stickler, D. J.: „The effect of urease inhibitors on the encrustation of urethral catheters“, *Urological Research* 1998; **26**; 275-279.

Morris, N. S., Stickler, D. J.: „Does drinking cranberry juice produce urine inhibitory to the development of crystalline, catheter-blocking *Proteus mirabilis* biofilms?“, *BJU International* 2001; **88**; 192-197.

Mott, I. E. C., Stickler, D. J., Coakley, W. T., Bott, T. R.: „The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound“, *Journal of Applied Microbiology* 1998; **84**; 509-514.

Naya, Y., Ito, H., Masai, M., Yamaguchi, K.: „Effect of Dietary Intake on Urinary Oxalate Excretion in Calcium Oxalate Stone Formers in Their Forties“, *European Urology* 2000; **37**; 140-144.

Naya, Y., Ito, H., Masai, M., Yamaguchi, K.: „Association of dietary fatty acids with urinary oxalate excretion in calcium oxalate stone-formers in their fourth decade“, *British Journal of Urology* 2002; **89**; 842-846.

Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., Costerton, J. W.: „Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; **27**; 619-624.

Nikitin, P. I., Gorshkov, B. G., Valeiko, M. V., Rogov, S. I.:“Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface“, *Quantum Electronics* 2000; **30**; 1099-1104.

Pearle, M. S., Pierce, H. L., Miller, G. L., Summa, J. A., Mutz, J. M., Beth, A., Roehrborn, C. G., Kryger, J. V., Nakada, S. Y.: „Optimal Method of Urgent Decompression of the Collecting System for Obstruction and Infection due to Ureteral Calculi“, *The Journal of Urology* 1998; **160**(4); 1260-1264.

Porkert, U. A.: “Zyto- und genotoxische Wirkung von Benzalkoniumchlorid in vitro und in vivo”, Dissertation an der Medizinischen Fakultät in Ulm 2006; Kapitel 3.1. Weblink: http://vts.uni-ulm.de/docs/2007/5826/vts_5826_7764.pdf

Rediske, A. M., Roeder, B. L., Brown, M. K., Nelson, J. L., Robison, R. L., Draper, D. O., Schaalje, G. B., Robison, R. A., Pitt, W. G.: „Ultrasonic Enhancement of Antibiotic Action on *Escherichia coli* Biofilms: an In Vivo Model“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; **43**; 1211-1214.

Reid, G., Tieszer, C., Foerch, R., Busscher, H. J., Khoury, A. E., Bruce, A. W.: „Adsorption of ciprofloxacin to urinary catheters and effect on subsequent bacterial adhesion and survival“, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1993; **1**; 9-16.

Reid, G., Sharma, S., Advikolanu, K. Tieszer, C., Martin, R. A., Bruce, A. W.: „Effects of Ciprofloxacin, Norfloxacin, and Ofloxacin on In Vitro Adhesion and Survival of *Pseudomonas aeruginosa* AK1 on Urinary Catheters“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; **38**(7); 1490-1495.

Reid, G., Busscher, H. J., Sharma, S., Mittelman, M. W., Mc Intyre, S.: „Surface properties of catheters, stents and bacteria associated with urinary tract infections“, *Surface Science Reports* 1995; **21**; 251-273.

Reid, G., Potter, P., Delaney, G., Hsieh, J., Nicosia, S., Hayes, K.: „Ofloxacin fort he treatment of urinary tract infections and biofilms in spinal cord injury“, *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; **13**; 305-307.

Reid, G., Hsiehl, J., Potter, P., Mighton, J., Lam, D., Warren, D., Stephenson, J.: „Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients“, *Spinal Cord* 2001; **39**; 26-30.

Riedl, C. R., Plas, E., Hübner, W. A., Zimmerl, H., Ulrich, W., Pflüger, H.: „Bacterial Colonization of Ureteral Stents”, *European Urology* 1999; **36**; 35-59.

Riedl, C. R., Witkowski, M., Plas, E., Pflueger, H.: „Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a prelimenary report“, *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002; **19**; 507-510.

Robertson, J.: „Diamond-like amorphous carbon“, *Materials Science and Engineering R: Reports* 2002; **37**; 129-281.

Roemer, F. D.: „There isn’t an ideal smooth-surface material - yet: the history and future of urologic materials“, *Journal of Endourology* 2000; **14**(1); 1-4.

Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G.: “Instrumentelle pharmazeutische Analytik”, 3. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH* Stuttgart 2001; 120.

Sabbuba, N. Hughes, G., Stickler, D. J.: „The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters“, *BJU International* 2002; **89**; 55-60.

Saint, S., Elmore, J. G., Sullivan, S. D., Emerson, S. S., Koepsell, T. D.: „The Efficacy of Silver Alloy-coated Urinary StentCatheters in Preventing Urinary Tract Infection: A Meta Analysis“, *The American Journal of Medicine* 1998; **105**; 236-241.

Saint, S.: „Clinical and economic consequences of nosocomial catheter-related bacteruria“, *American Journal of Infection Control* 2000; **28**; 68-75.

Savage, S. J., Streem, S. B.: „Simplified Approach to Percutaneous Endopyelotomy“, *Urology* 2000; **56**(5); 848-850.

Shaw, G. L., Choong, S. K., Fry, C.: „Encrustation of biomaterials in the urinary tract“, *Urological Research* 2005; **33**; 17-22.

Soboh, F., Khoury, A. E., Zamboni, A. C., Davidson, D., Mittelman, M. W.: “Effects of Ciprofloxacin and Protamine Sulfate Combinations against Catheter-Associated *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; **39**(6); 1281-1286.

Sofer, M., Denstedt, J. D.: „Encrustation of biomaterials in the urinary tract“, *Current Opinion in Urology* 2000; **10**; 563-569.

Stickler, D. J., Evans, A., Morris, N., Hughes, G.: „Strategies for the control of catheter encrustation“, *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002; **19**; 499-506.

Stickler, D., Hewitt, P.: „Activity of Antiseptics against Biofilms of Mixed Bacterial Species Growing on Silicone Surfaces“, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1991; **10**(3); 157-162.

Stickler, D. J., Jones, G. L., Russell, A. D.: „Control of encrustation and blockage of Foley catheters“, *The Lancet* 2003; **361**; 1435-1437.

Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.: „Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen“, 5. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 1999; 407-441.

Tieszer, C., Reid, G., Denstedt, J.: „Conditioning film deposition on ureteral stents after implantation“, *The Journal of Urology* 1998; **160**; 876-881.

Tunney, M. M., Gorman, S. P.: „ Evaluation of a poly(vinyl pyrillidone)-coated biomaterial for urological use“, *Biomaterials* 2002; **23**; 4601-4608.

Van der Wall, E., Verkooyen, R. P., Mintjes-de Groot, J., Oostinga, J., van Dijk, A., Hustinx, W. N. M., Verbrugh, H. A.: „Prophylactic ciprofloxacin for catheter-associates urinary-tract infection“, *The Lancet* 1992; **339**; 946-951.

Velraeds, M. M. C., van de Belt-Gritter, B., Busscher, H. J., Reid, G., van der Mei, H. C.: „Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber in human urine by lactobacilli – a teleologic approach“, *World Journal of Urology* 2000; **18**; 422-426.

Vornicescu, G.: “Mikrosystemkomponenten aus Polymermaterialien für biochemische Analysensysteme”, Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Philipps-Universität Marburg 2007; 45-46.

Wan, L. S. C., Poon, P. K. C.: “Effects of Salts on the Surface/Interfacial Tension and Critical Micelle Concentration of Surfactants”, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1969; **58**; 1562-1567.

Wang, Y. H., Grenabo, L., Hedelin, H., McLean, R. J. C., Nickel, J. C., Pettersson, S.: „Citrate and urease-induced crystallization in synthetic and human urine“, *Urological Research* 1993; **21**; 109-115.

Watterson, J. D., Cadieux, P. A., Beiko, D. T., Cook, A. J., Burton, J. P., Harbottle, R. R., Lee, C., Rowe, E., Sidhu, H., Reid, G. Denstedt, J. D.: „Oxalate-Degrading Enzymes from

Oxalobacter formigenes: A Novel Device Coating to Reduce Urinary Tract Biomaterial-Related Encrustation“, *Journal of Endourology* 2003; **17**(5); 269-274.

Wickham, J. E., Kellett, M. J.: „Percutaneous pyelolysis“, *European Urology* 1983; **9**(2); 122-124.

Yoshida, O., Okada, Y.: „Epidemiology of urolithiasis in Japan: a chronological and geographical study“, *Urologia internationalis* 1990; **45**(2); 104-111.

Webadressen:

http://www.antibiotika-strategien.at/fileadmin/ABS/abs-leitlinien.pdf am 31.03.2009

http://www.bfr.bund.de/cm/217/triclosan_nur_im_aerztlichen_bereich_anwenden_um_resistenzbildungen_vorzubeugen.pdf am 20.04.2009

http://www.ic.sunysb.edu/Stu/sumusso/webquest.htm am 18.02.2009

http://www.urotech.info/de/produkte/files/urotech_katalog.pdf S. 5 am 27.02.2009

http://www.urotech.info/de/produkte/ureterschienen.php am 23.02.2009

Lebenslauf

von Elvira Belz
geb. am 16. September 1981
in Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988-07/1992	**Grundschule** Elsa-Brandström-Schule Frankfurt
08/1992-05/2001	**Gymnasium** Hohe Landesschule Hanau Abschluss: Abitur

Studium

10/2001-09/2005	**Studium der Pharmazie** Philipps-Universität Marburg Abschluss: 2. Staatsexamen

Praktische Ausbildung

02/2002-03/2002	**Famulatur in der Metropolitan Pharmacy** im Frankfurter Flughafen
08/2002-09/2002	**Famulatur in der Krankenhausapotheke** des Stadtklinikums Hanau
11/2005-04/2006	**Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Keusgen** Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg Thema: Synthese von wasserlöslichen Quantum Dots
05/2006-11/2006	**Praktikum in der Zeiger'schen Stadtapotheke Hanau**
12/2006	**3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin**

Promotionsstudium

Seit 01/2007	**Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Keusgen** Institut für Pharmazeutische Chemie Philipps-Universität Marburg Thema: Entwicklung einer antibakteriell beschichteten Harnleiterschiene