

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Über die Perigraftreaktion von unbeschichteten und antibakteriell  
beschichteten Silber- und Rifampicin-Dacron-Gefäßprothesen –  
Eine quantitative Analyse am tierexperimentellen Rückenhautkam-  
mermodell der Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2017

vorgelegt von Georg Dominik Santiago Schlachtenberger  
geboren am 15.04.1989 in Santiago de Chile

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis:.....	4
2. Zusammenfassung.....	5
2.1 Summary.....	7
3. Einleitung .....	9
3.1 Übersicht über die Periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).....	9
3.2 Therapie der pAVK.....	10
3.3 Möglichkeiten des Gefäßersatzes .....	11
3.4 Gefäßprotheseninfektionen .....	13
3.5 Das Keimspektrum bei Gefäßprotheseninfektionen.....	13
3.6 Antibakterielle Beschichtung von Dacron™ Prothesen .....	15
3.7 Die Inkorporation von Gefäßprothesen.....	20
3.8 Fragestellung .....	22
4. Material und Methoden:.....	23
4.1 Versuchstiere: .....	23
4.2 Präparation der Rückenhautkammer:.....	23
4.3 Implantation Alloplastischer Materialien:.....	26
4.3.1 Dacron™: (Polyethylenterephthalat kurz PET) .....	26
4.3.2 Dacron Silber+™:.....	26
4.3.3 Rifampicin: .....	26
4.3.4 Beschichtung von Dacron™ und Dacron Silber+™ mit Rifampicin:.....	27
4.4 Implantation der Gefäßprothesen.....	27
4.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	29
4.5.1 Analyse der Mikrohämodynamik .....	30
4.5.2 Funktionelle Kapillardichte .....	32
4.5.3 Gefäßdurchmesser (d).....	32
4.5.4 Blutzellgeschwindigkeit (v).....	32
4.5.5 Mikrovaskulärer Blutfluss (Q).....	33
4.5.6 Sheerrate (y).....	33
4.5.7 Leukozyten Interaktion .....	33
4.6 Immunhistochemie und Histologie.....	34
4.6.1 Konventionelle Histologie .....	34
4.6.2 Immunhistochemie .....	34
4.7 Versuchsprotokoll.....	37
4.7.1 Versuchsgruppen .....	37
4.7.2 Versuchsablauf .....	37
4.8 Statistik .....	38

5. Ergebnisse .....	39
5.1 Vaskularisierung der Gefäßprothesen .....	39
5.1.1 Vergleich von Dacron Silber <sup>+TM</sup> + Rifampicin mit Dacron <sup>TM</sup> und Dacron <sup>TM</sup> + Rifampicin .....	39
5.2 Mikrohämodynamik .....	44
5.2.1 Vergleich von Dacron Silber <sup>+TM</sup> + Rifampicin mit Dacron <sup>TM</sup> und Dacron <sup>TM</sup> + Rifampicin .....	44
5.3 Leukozyten-Endothel Interaktion .....	46
5.3.1 Vergleich von Dacron Silber <sup>+TM</sup> + Rifampicin mit Dacron <sup>TM</sup> und Dacron <sup>TM</sup> + Rifampicin .....	46
5.3.2 Immunhistochemische Analyse der Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen-Interaktion.....	49
5.4 Inkorporation der verwendeten Prothesen.....	52
5.5 Zellproliferation und Apoptose:.....	53
6. Diskussion.....	56
6.1 Das Rückenhautkammermodell der Maus.....	56
6.2 Vergleich von Dacron <sup>TM</sup> + Rifampicin mit Dacron Silber <sup>+TM</sup> + Rifampicin und Dacron <sup>TM</sup> .....	57
6.3 Fazit.....	66
7. Literaturverzeichnis .....	69
8. Abbildungsverzeichnis.....	79
9. Publikationen und Fachvorträge.....	80
9.1 Publikationen.....	80
9.2 Fachvorträge.....	80
10. Danksagung.....	81
11. Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis:

ABI	Ankle-Brachial-Index
GPI	Gefäßprotheseninfektion
DGG	Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie
EVAR	Endovaskuläre Aortenreparatur
HPF	High Power Field
IVM	Intravitale Mikroskopie
MPO	Myeloperoxidase
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PTFE	Polytetrafluorethylen
RHK	Rückenhautkammer
ROI	Region of Interest
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
VEGF	Vascular endothelial growth factor



## 2. Zusammenfassung

### **Über die Perigraftreaktion von unbeschichteten und antibakteriell beschichteten Silber- und Rifampicin-Dacron-Gefäßprothesen. Eine quantitative Analyse am tierexperimentellen Rückenhautkammermodell der Maus**

Um geschädigte Arterien zu ersetzen muss häufig auf synthetische Gefäßprothesen zurückgegriffen werden, obwohl diese mit einer deutlich höheren Inzidenz an Infekten einhergehen als dies für autologe Venen der Fall ist. Bei vielen gefäßchirurgischen Patienten stehen zum Beispiel aufgrund von Alter oder Begleiterkrankungen keine entsprechenden Venen zur Verfügung die für einen Gefäßersatz notwendig wären. Für diese Patienten ist die Verwendung von Gefäßprothesen oft die einzig alternative Therapie. Das Risiko eines Gefäßprotheseninfekts liegt bei ungefähr 5% und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Zur Behandlung einer solchen Gefäßprotheseninfektion reicht eine systemische Antibiose alleine oft nicht aus.

Teilweise müssen infizierte Prothesen entfernt und gegeben falls sehr aufwendig rekonstruiert werden. Als Ersatz der infizierten Prothese und zur direkten Therapie in situ haben sich Dacron™ Prothesen etabliert, die mit antibakteriellen Eigenschaften ausgestattet sind. Das verbreitetste Konzept ist die Beschichtung einer Dacron™ Prothese mit dem Antibiotikum Rifampicin. Ebenfalls ist die Beschichtung mit Silber erhältlich und auch eine Kombinationsbeschichtung aus Rifampicin und Silber auf einer Dacron™ Prothese ist möglich. Diese speziellen Prothesen werden zunehmend auch zur Prophylaxe eingesetzt. Bei Rifampicin wird jedoch seit längerer Zeit eine antiangiogene und proliferationshemmende Wirkung beschrieben. Eine ausreichende Angiogenese, Proliferation und eine adäquate Inflammation sind jedoch für die suffiziente Integration einer Prothese in das umliegende Gewebe enorm wichtig, hierdurch können auch Gefäßprotheseninfektionen vermieden werden. Insofern wollten wir in unserer Studie untersuchen, ob sich eine Rifampicinbeschichtung negativ auf das Integrationsverhalten von Gefäßprothesen auswirkt. Hierfür wurden Rifampicinbeschichtete und unbeschichteten Dacron™ sowie mit Rifampicinbeschichtete Dacron Silber+™ Prothesen verglichen.

Für die Studie nutzen wir das Rückenhautkammermodell an C57BL/6 Mäusen. Durch diese Methode war eine in vivo Analyse über 14 Untersuchungstage mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) möglich.

Hier konnten die Neoangiogenese und Inflammation als dynamische Prozesse beobachtet werden. Nach Ende der in vivo Messungen folgten immunhistochemische Auswertungen der Neoangiogenese und Inflammation sowie von Proliferation und Apoptose. Wir konnten feststellen, dass Rifampicinbeschichtete Dacron™ Prothesen verglichen mit unbeschichteten Dacron™ Prothesen die Neoangiogenese und Inflammation signifikant hemmten. Diese Ergebnisse, eine signifikante Hemmung der Proliferation sowie eine signifikant erhöhte Apoptose, ausgelöst durch Rifampicin, konnte immunhistochemisch bestätigt werden. Der Vergleich von Rifampicinbeschichteten und unbeschichteten Prothesen mit Rifampicinbeschichteten Dacron Silber+™ Prothesen ergab eine signifikant niedrigere Inflammation und Angiogenese verglichen mit unbeschichteten Prothesen. Im Vergleich mit Rifampicinbeschichteten Dacron™ Prothesen war eine erhöhte Angiogenese und Inflammation im späten Verlauf des Versuchs messbar. Darüber hinaus konnten signifikant höhere Werte für Proliferation und signifikant niedrigere Werte für Apoptose im Vergleich mit Rifampicinbeschichteten Dacron™ Prothesen erhoben werden.

Dieses signifikant schwächere Integrationsverhalten von Rifampicinbeschichteten Gefäßprothesen könnte im direkten Zusammenhang mit der Hemmung des Vascular endothelial growth factor (VEGF) und der bekannten immundepressiven Wirkung von Rifampicin stehen.

Vor allem eine frühe Neoangiogenese und eine adäquate Inflammation sind für die Inkorporation von Gefäßprothesen wichtig. Eine suffiziente Inkorporation trägt zu einer verbesserten Offenheitsrate bei und senkt die Gefahr eines Protheseninfekts. Insofern sollte der Einsatz von Rifampicinbeschichteten Gefäßprothesen jeweils abgewägt werden. Insbesondere der prophylaktische Einsatz dieser Prothesen sollte überdacht werden.

## 2.1 Summary

### **Perigraftreaction of uncoated and antibacterial coated Silver- and Rifampicin-Dacron-vascular grafts. A quantitative analysis using the dorsal skinfold chamber of mice.**

Synthetic vascular grafts are frequently used to replace damaged arteries, although they have higher incidences for vascular infections than autogenic used veins. Because of increasing age and comorbidities there are a lot of patients in vascular surgery who do not possess suitable veins to perform proper bypass surgery. For those patients, the use of synthetic vascular grafts is an alternative treatment. The risk for vascular prosthetic graft infections is approximately 5% and results in high rates of morbidity and mortality. For the treatment of a vascular prosthetic graft infection a single antibiotic therapy is often not effective. In some extent, the infected graft should be removed and the vessels should be reconstructed. For the substitution of the infected graft besides to have an antibacterial therapy directly in the contaminated tissue Dacron™ vascular grafts are well established which show antibacterial properties. In this regard, the most used concept is the use of Rifampicin coated Dacron™ grafts. Furthermore, there are silver acetate coated vascular grafts available and the combination of Rifampicin soaked, silver acetate coated vascular grafts. These particular grafts are also increasingly used for antibacterial prophylaxis. Rifampicin is known to reduce vascularization and proliferation. An adequate vascularization and proliferation besides a suitable inflammation of vascular prostheses during the early healing process is essential for a proper integration in addition for the prevention of perioperative or late graft infection. Thus, in this experimental study we analyzed whether this coating affects the early tissue incorporation of the grafts. Therefore we matched uncoated and Rifampicin coated grafts with Rifampicin soaked silver acetate coated vascular grafts.

For our studies, we used the dorsal skinfold chamber model of C57BL/6 mice. This model permits an in vivo survey over an observation period of 14 days by using repetitive intravital fluorescence microscopy. With this method neovascularization and inflammation were examined as dynamical processes. After the in vivo experiments neoangiogenesis and inflammation as well as cell proliferation and apoptosis were analyzed immunohistochemically.

Our results show that Rifampicin coated Dacron™ vascular grafts compared to uncoated Dacron™ grafts exhibit a significant reduced neovascularization and inflammation. Furthermore, a significant impaired proliferation and an enhanced count of apoptotic cells.

The comparison between Rifampicin coated and uncoated Dacron™ grafts with Rifampicin soaked Dacron Silver+™ grafts yielded a significant reduced inflammation and neovascularization compared to uncoated Dacron™ grafts. Compared to Rifampicin coated Dacron™ grafts we measured increased neovascularization and inflammation. In addition, we examined a significant increased proliferation and enhanced apoptosis compared to Rifampicin coated Dacron™ grafts.

The significant impaired incorporation of Rifampicin coated vascular grafts could be cohesive with the immune depressive effect of Rifampicin and in addition eventually with the down regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) by Rifampicin.

Especially the rapid graft vascularization and inflammation are thought to be highly important for the incorporation of vascular grafts. Thus a sufficient Incorporation contributes to a higher patency rate and lower risks of vascular graft infections. On this account, the use of Rifampicin coated vascular grafts should reconsidered. Exceedingly the use of Rifampicin coated grafts for antibacterial prophylaxis should be reevaluated particularly in cases of elective arterial reconstruction in noninfected environments.

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Übersicht über die Periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)**

Atherosklerotische Gefäßveränderungen und die daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen (WHO. 2016). Die pAVK ist zu 95% eine Folgeerkrankung einer Atherosklerose und befällt die unteren Extremitäten. Das Risiko an einer pAVK oder anderen atherosklerotischen Gefäßveränderungen, wie an einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) zu erkranken, korreliert mit dem Lebensstil der westlichen Welt. Adipositas, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie, chronischer Bewegungsmangel, Nikotinabusus und Diabetes mellitus gehören zu den Risikofaktoren (Grundy et al. 1999). Da unser westlicher Lebensstil auch für Entwicklungsländer ein Vorbild ist, muss weltweit von einer steigenden Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen und damit auch der pAVK ausgegangen werden (Fowkes et al. 2013). Die Prävalenz der pAVK in der Altersgruppe zwischen 60 und 70 Jahre liegt in Deutschland über 10% (Diehm, Kareem, Lawall. 2004; Criqui, Aboyans. 2015). Die pAVK zeichnet sich durch einen langsamen und oft asymptomatischen Verlauf aus. Hierdurch bedingt ist die pAVK eine unterdiagnostizierte Erkrankung und es muss von einer deutlich höheren Prävalenz in der Bevölkerung ausgegangen werden. Eine dauerhafte mangelnde Perfusion kann langfristig zu einer chronisch kritischen Ischämie führen. Patienten mit einer solchen Ischämie gehören zu einer Hochrisikogruppe mit hoher Mortalitäts- und Amputationsrate (Gulati, Botnaru, Garcia. 2015). Die typische Symptomatik einer chronisch kritischen Ischämie ist eine Claudicatio Intermittens. Durch eine chronische Minderperfusion klagen die Patienten über bewegungsabhängige Beinschmerzen. Diese bessern sich anfangs in Ruhe. Bei höhergradigen Stenosen bestehen im Verlauf auch bewegungsunabhängige Schmerzen in Ruhe. In letzter Instanz können Ulzerationen auftreten. Die Prognose einer symptomatischen pAVK ist schlecht. Die fünf Jahres Mortalität nach Beginn der Symptome liegt bei 20%. 70% dieser Patienten versterben an begleitenden kardiovaskulären Erkrankungen, wie einem akuten Koronar-Syndrom oder einer Cerebralen Ischämie (getABI Study group, 2002). Für die Diagnose einer pAVK ist die Erfassung der Risikofaktoren und der subjektive Gehstrecke der Patienten sehr wichtig. Ferner gehört die Messung des Ankle-brachial-Index (ABI) zur Standarddiagnostik (Lawall, Pittrow, Diehm. 2009).

Durch die getABI Study Group 2002 konnte gezeigt werden, dass insbesondere eine rasche Verschlechterung des ABI-Wertes ein Marker für eine rasche Progredienz des Krankheitsverlaufes ist (Diehm et al. 2004).

### **3.2 Therapie der pAVK**

Die Stadieneinteilung der pAVK richtet sich nach der maximalen beschwerdefreien Gehstrecke der Patienten und lässt sich nach Fontaine oder im angloamerikanischen Raum nach Rutherford einteilen. Im Stadium I nach Fontaine kann eine Veränderung des Lebensstils, eine Nikotinkarenz, ein strukturiertes Gehtraining und eine medikamentöse Therapie den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen und zu einer langsameren Progredienz der Erkrankung führen (Andrew et al. 2001).

Ab dem Stadium II nach Fontaine, einer chronisch kritischen Ischämie oder einer stark eingeschränkten Lebensqualität ist eine interventionelle Therapie beziehungsweise ein gefäßchirurgischer Eingriff meist unumgänglich (Lawall, Pittrow, Diehm. 2009). Sowohl die operative als auch die interventionelle Therapie sind symptomatische Behandlungen. Die zugrundeliegende progressive atherosklerotische Gefäßveränderung kann dadurch nicht behoben werden. In den letzten Jahren kommt es, wie auch in anderen chirurgischen Fachbereichen, auch in der Gefäßchirurgie zu einem deutlichen Anstieg an interventionellen Therapieformen. Diese sind oft deutlich schonender für die Patienten als ein chirurgischer Eingriff und damit auch mit kürzeren Hospitalisierungszeiten verbunden. Insofern benötigen Patienten mit einem interventionell beherrschbaren Gefäßverschluss kaum mehr einen operativen Eingriff. Jene Läsionen aber, die interventionell nicht mehr beherrschbar oder bei denen eine interventionelle Therapie nicht erfolversprechend ist, gehören zum operativen Kollektiv (Böckler et al. 2005). Die Operationen werden somit schwieriger und die Patienten haben eine schlechtere Prognose. Aufgrund der Überalterung, den häufigen multiplen Begleiterkrankungen wie Diabetes, COPD und weiteren kardiovaskulären Erkrankungen wird die peri- und postoperative Morbidität und Mortalität bei chirurgischen Revaskularisationen steigen (Conte et al. 2001). Die operative Revaskularisierung ist trotzdem nach wie vor die effektivste Therapieform der pAVK (Siracuse et al. 2012). Patienten bei denen sowohl eine operative als auch eine interventionelle Therapie nicht erfolversprechend ist, können noch mit vasoaktiven Substanzen, wie

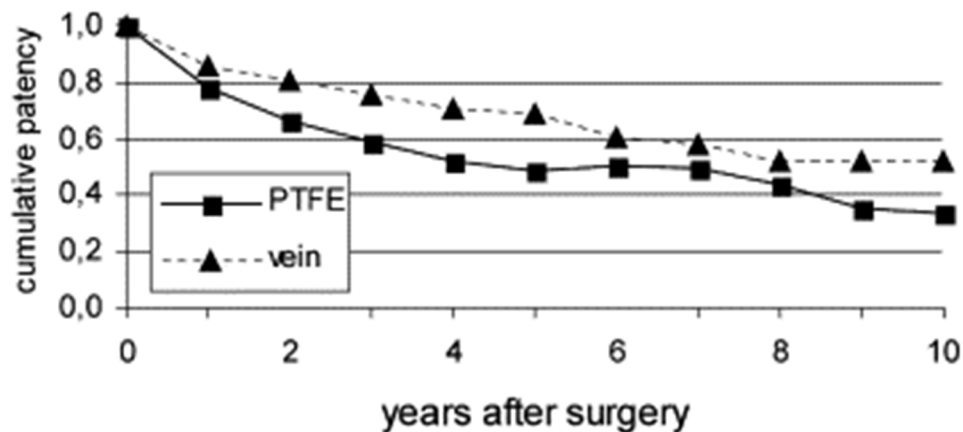
Prostaglandinen behandelt werden. Eine positive Wirkung dieser Therapie wird noch kontrovers diskutiert (Altstaedt et al. 1993; The Oral Iloprost in Severe Leg Ischaemia Study Group, 2000; Creutzig, Lehmacher, Elze. 2004).

### **3.3 Möglichkeiten des Gefäßersatzes**

In der Gefäßchirurgie gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten eine geschädigte Arterie zu ersetzen. Hierbei können biologische und alloplastische Materialien unterschieden werden. Unter den biologischen Materialien haben autologe Venen insbesondere die Vena saphena magna oder parva den größten Stellenwert. Seltener werden die Vena cephalica, Vena basilica oder körpereigene Arterien verwendet.

Xenogene (bovine/porcine Prothesen) werden im klinischen Alltag eher selten eingesetzt. Allogene Gefäßersatzmaterialien oder Homografts haben wegen der sehr hohen Kosten und der seltenen Verfügbarkeit bisher weniger Relevanz. Unter den alloplastischen Materialien haben sich Gefäßprothesen aus Polyethylenterephthalat (PET) (Markenname Dacron™) und Polytetrafluorethylen (PTFE) durchgesetzt. Im Prinzip werden die beiden Materialien gleichwertig bei jeweils verschiedenen Indikationen eingesetzt.

Wenn möglich wird ein Gefäßbypass mit autologer Vene bevorzugt, da dieser im Vergleich zu alloplastischen Materialien eine geringere Infektions- und eine bessere Offenheitsrate aufweist (Klinkert et al. 2004). In den ersten Monaten nach Implantation ist die Offenheitsrate bei alloplastischen Materialien ähnlich gut wie die von autologen Venen. Im Verlauf jedoch neigen Bypässe aus alloplastischen Materialien häufiger zu Re-Stenosen als autologe Venenbypässe (Pereira et al. 2006).



**Abbildung 1:** Gewichteter Mittelwert der kumulativen Offenheitsrate von autologen Venen im Vergleich zu PTFE Gefäßprothesen in Abhängigkeit von den Jahren nach einem gefäßchirurgischen Eingriff (Klinkert et al. 2004).

Klinkert et al. 2004 zeigten, dass alloplastische Bypässe nach zwei Jahren deutlich schlechtere Offenheitsraten aufweisen als venöse Bypässe (Abbildung 1). Insofern wird in den Leitlinien der Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie (DGG) das Bypassverfahren mit der Verwendung von autologen Venen empfohlen (Lawall, Pittrow, Diehm. 2009). Nicht bei allen Patienten stehen jedoch geeignete Venen zur Verfügung. Oftmals leiden Gefäßpatienten zusätzlich an einer chronisch venösen Insuffizienz oder anderen venösen Erkrankungen. Darüber hinaus kann eine geeignete Vene bereits für die Behandlung einer KHK in Form eines Aortocoronarenvenenbypasses verwendet worden sein oder soll für eine solche Therapie geschont werden. Für dieses Patientenkollektiv sind alloplastische Materialien eine gute Alternative (Debus et al. 2013). Sie stehen im Prinzip in unbegrenzter Zahl und in unterschiedlichsten Größen und Längen zur Verfügung. Durch den Einsatz von alloplastischen Gefäßprothesen lässt sich außerdem sowohl die Operationszeit als auch das Operationstrauma verringern, da keine geeigneten Venen präpariert und transplantiert werden müssen (Park et al. 2014). Aufgrund dessen ist der Einsatz von alloplastischen Materialien in der Gefäßchirurgie trotz schlechterer Eigenschaften sehr häufig (Rychlik et al. 2014).



### **3.4 Gefäßprotheseninfektionen**

Neben der schlechteren Offenheitsrate kommt es beim Einsatz von Bypässen aus synthetischen Materialien verglichen mit autologen Venen häufiger zu Gefäßinfektionen (Edwards et al. 1987; Klinkert et al. 2004). Das Risiko eines Protheseninfekts liegt zwischen 0,5-5% in 24 Monaten (Jensen, Kimose, 1985; Chang et al. 2003; Leroy et al. 2012). Patienten mit einer chronisch kritischen Ischämie sind besonders prädisponiert einen Gefäßinfekt zu entwickeln (Rychlik et al. 2014). Siracus et al. 2013 beschrieben spezielle Risikofaktoren für eine Gefäßprotheseninfektion:

- Revisionsoperation im selben Gefäßbett
- perioperative generalisierte Infektion
- weibliches Geschlecht
- schlecht eingestellter Diabetes mellitus

Diese Protheseninfekte können eine langwierige antibiotische Therapie erforderlich machen, oft reicht eine systemische Antibiose alleine nicht aus. Als weitere Behandlungsmöglichkeit können die infizierten Prothesen entfernt und rekonstruiert werden. Als Ersatz der infizierten Prothese und zur direkten Therapie in situ haben sich Dacron™ Prothesen etabliert, die mit antibakteriellen Eigenschaften ausgestattet sind. Diese Revisionsoperationen sind mit einem deutlich erhöhten Operationsrisiko und einer Mortalität von bis zu 10% verbunden. (Ehsan, Gibbons. 2009; de Donato et al. 2014; Revest et al. 2015).

### **3.5 Das Keimspektrum bei Gefäßprotheseninfektionen**

Protheseninfektionen nach Gefäßersatz können nach wenigen Tagen oder vielen Jahren klinisch apparent werden. Die Infektionen können je nach Infektionszeitpunkt in eine Früh- und eine Spätphase eingeteilt werden (FitzGerald, Kelly, Humphreys, 2005). Je nach Zeitpunkt liegt der Infektion ein unterschiedliches Keimspektrum zugrunde. Bei einer Infektion in den ersten vier Monaten wird von einer Frühinfektion gesprochen. 80% der GPI in dieser Zeit werden durch koagulase-positive Staphylokokken ausgelöst (KochInstitut, 2007). Durch den massiven Einsatz von Antibiotika in der Therapie und anderen Bereichen, wie der Tierzucht, bilden sich immer mehr resistente Bakterien. In den nächsten Jahren wird die Anzahl an resistenten Keimen vermutlich weiter steigen.

Auch bei Gefäßprotheseninfektionen muss mit einer steigenden Inzidenz von multi-resistenten Keimen gerechnet werden. Für die Gefäßchirurgie am relevantesten sind Infektionen durch Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Murphy et al. 2013; Mallios et al. 2014). Nach ungefähr vier Monaten verändert sich das Erregerspektrum. Eine Kontamination ab diesem Zeitpunkt wird als Spätinfektionen bezeichnet. Häufigste Erreger sind *Staphylokokkus epidermidis* (Homer, Vanniasinkam, 2007) oder *Escherichia coli* (Lachapelle, Graham, Symes, 1994). Auch Pilzinfektionen können die Ursache für Spätinfektionen sein, diese Infektionen sind sehr schlecht zu therapieren (Doscher, Krishnasastry, Deckoff. 1987; Motte et al. 1993). In der Regel liegen einer Spätinfektion verschiedene Erreger als Mischkulturen zugrunde, die eine gezielte antibiotische Therapie erschweren (Wooster, Louch, Krajde. 1985).

Die häufigsten Gefäßinfekte sind ausgelöst durch Staphylokokken Spezies. Staphylokokken kommen sehr häufig vor und rund 20% der Bevölkerung sind asymptome Träger von Staphylokokken auf der Haut (Kluytmans et al. 1997). Staphylokokken können intraoperativ über die Haut in das Operationsfeld eindringen oder sich im Rahmen einer postoperativen passageren Bakteriämie im Operationsgebiet ansiedeln. Sie adhären bevorzugt an synthetischen Materialien. Ein wichtiger Virulenzfaktor der meisten Staphylokokken ist die Möglichkeit auf synthetischen Materialien Biofilme auszubilden (Loughran et al. 2014). Diesen Erregern ist es möglich irreversibel an der Implantatoberfläche zu haften und sich zu Bakterienkolonien zusammenzuschließen. Der Bakterienverband bildet daraufhin ein extrazelluläres Polysaccharid (Costerton, Montanar, Arciola. 2005). Eingebettet in diese Matrix können die Erreger der körpereigenen Abwehr entgehen und sind somit besonders geschützt. Die meisten Antibiotika können Biofilme schlecht oder gar nicht penetrieren. Eine 100- oder sogar 1000-fache Konzentration von eigentlich gut wirksamen Antibiotika kann für eine erfolgreiche Eradikation der Erreger unter einem Biofilm nötig sein (Ceri et al. 1999). Vermutlich ist eine komplette Eradikation nur durch eine definitive Entfernung des betroffenen Implantats zu erreichen (Stewart, Costerton. 2001).

### 3.6 Antibakterielle Beschichtung von Dacron™ Prothesen

Bei einer Gefäßprotheseninfektion ist die alleinige antibiotische Therapie oft nicht effektiv. Nicht selten müssen die Patienten einer Revisionsoperation unterzogen werden. Nach der Entfernung der infizierten Prothese kann eine in-situ Rekonstruktion erfolgen. Um die Ergebnisse einer in situ Rekonstruktion zu verbessern, werden seit längerer Zeit Möglichkeiten untersucht Gefäßprothesen mit antibakteriell wirksamen Substanzen auszustatten. Ebenfalls wird nach Konzepten gesucht, Gefäßprothesen prophylaktisch antibakteriell zu beschichten (Hardman et al. 2004; Menger, Hammersen, Messmer. 1992). Dacron™ und PTFE Rohrprothesen werden in der Gefäßchirurgie seit dem Ende der 1950er Jahre eingesetzt (Belio et al. 1959). Das höhere Risiko einer Infektion bei der Verwendung von synthetischen Materialien im Vergleich zum autologen Venenbypass wurde früh erkannt (Helbing, Hohf. 1962) und eine Behandlung oder sogar eine Prävention einer GPI versucht. Die ersten Versuche einer Prävention wurden mit systemischer Antibiose durchgeführt (Lindenauer et al. 1967). Diskussionen, die Prothese selbst antibakteriell zu beschichten und so eine antibakterielle Wirkung direkt am Implantat zu erreichen, folgten (Moore et al. 1981). Greco und Harvey führten 1982 eine tierexperimentelle Arbeit durch, in der sie Oxacillin beschichteten und unbeschichteten PTFE Rohrprothesen in die Aorta abdominales von Hunden einsetzten und diese mit  $1 \cdot 10^7$  Staphylokokkus aureus Erregern kontaminierten. Nach sechs Wochen konnten sie feststellen, dass Oxacillin beschichtete PTFE Rohrprothesen im Vergleich zu unbeschichteten Prothesen eine erhöhte Offenheitsrate und ein geringeres bakterielles Wachstum aufwiesen (Greco, Harvey. 1982). Muhl et al. 1996 diskutierten die antiinfektiöse Wirkung von Vancomycin auf Rohrprothesen. Aboshady et al. 2012 behandelte Dacron™ Rohrprothesen mit einer antibakteriellen Triplekombination aus Chlorhexidin, Rifampin und Minocyclin (Aboshady et al. 2015).

Bei den antibiotischen Beschichtungen setzte sich Rifampicin gegenüber anderen antibiotischen Beschichtungen wie Oxacillin (Greco, Harvey. 1982), Vancomycin (Muhl et al. 1996) oder Gentamycin (Ginalska et al. 2005) durch. Die Rifampicinbeschichtung zeigte besonders gute Ergebnisse in der Wirkung gegenüber Staphylokokkus aureus sowie gegen die von ihm gebildeten Biofilme (Hayes et al. 1999; Hernández-Richter et al. 2003; Rose et al. 2015).

Ein weiterer Vorteil dieses Konzepts ist es, dass die Beschichtung von Dacron™ Prothesen mit Rifampicin klinisch sehr gut umsetzbar ist. Es wird lediglich eine 15-minütige Einwirkzeit bei 37°C benötigt. Für eine Gentamycinbeschichtung von Dacron™ Prothesen ist eine deutlich komplexere Vorbereitung nötig, um eine gleichmäßige Abgabe ins Gewebe zu gewährleisten (Ginalska et al. 2005). Die gute, gleichmäßige und rasche Bindung von Rifampicin an Dacron™ ist auf ionische Bindungen zurückzuführen (Freyrie et al. 1992; Lachapelle, Graham, Symes. 1994; Mallasiney et al. 1996).

Rifampicin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine und wirkt stark bakterizid. Es wirkt über eine Hemmung der DNA-abhängigen  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase, die die bakterielle Proteinbiosynthese beeinflusst. Rifampicin ist nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin in der Tuberkulose-Therapie gegen *Mycobacterium tuberculosis* in Kombination mit Ethambutol, Isoniazid und Pyrazinamid als Vierfachkombination zugelassen (Schaberg et al. 2012). Ebenfalls zeigt Rifampicin auch eine gute Aktivität gegenüber anderen Erregern, vor allem gegen *Staphylokokkus aureus* und *epidermidis*, *Enterokokken* und *Meningokokken*. Es sollte jedoch aufgrund der Resistenzbildung bis auf begründete Ausnahmen für die Tuberkulosetherapie vorbehalten werden. Die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind ein Transaminasenanstieg, gastrointestinale Beschwerden und eine orange-rote Färbung von Urin, Schweiß, Sputum und anderen Körperausscheidungen. Rifampicin ist über Cytochrom P einer der stärksten Enzyminduktoren und beschleunigt dadurch den Stoffwechsel zahlreicher anderer Medikamente (Stahlmann, Lode. 2009). Diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Rifampicin treten bei lokaler Anwendung auf Gefäßprothesen nicht auf (Goëau-Brissonnière et al. 1991). Inwieweit eine Rifampicinbeschichtung von Gefäßprothesen zu einer Resistenzbildung von Bakterien führen kann, ist momentan noch unklar. Eine ähnlich schnelle Resistenzbildung, wie bei systemischem Einsatz, gilt jedoch als unwahrscheinlich (Sardelic, Ao, Fletcher 1995; Koshiko et al. 2002).

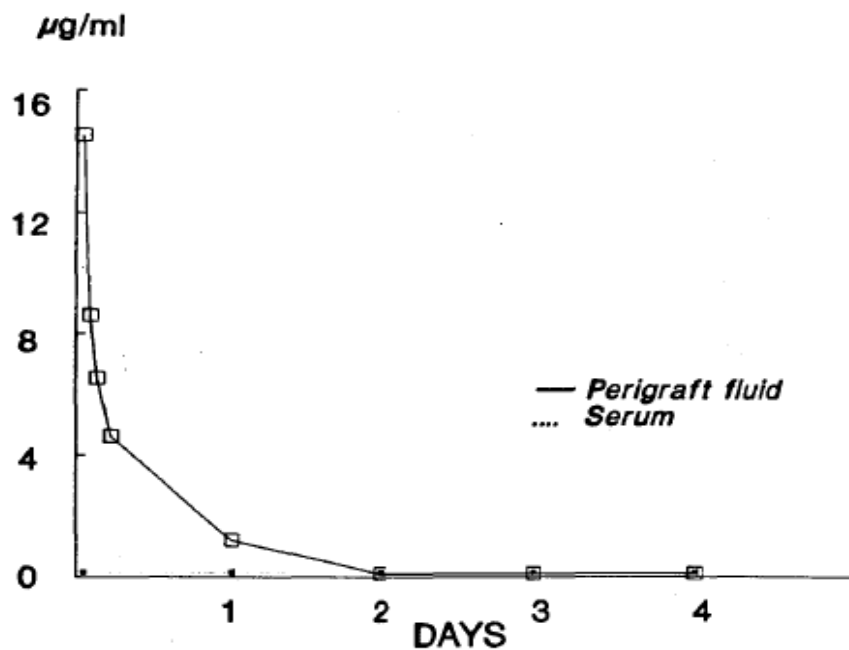
Lachapelle, Graham, Symes. 1994 beschäftigten sich detaillierter mit einer Rifampicinbeschichtung von Dacron™ Rohrprothesen im Tierexperiment. Sie untersuchten die Rifampicinabgabe ins Gewebe pro Zeiteinheit. Hierfür wurde die Rifampicinkonzentration auf der Prothese, im periprothetischen Gefäßbett und im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Auf den Prothesen war Initial eine mittlere Rifampicinkonzentrationen von  $57,6\mu\text{g/g}$  messbar. Diese Konzentration fiel bereits nach 4 Stunden deutlich ab. Drei Tage nach Implantation waren nur noch Konzentrationen von  $< 2\mu\text{g/g}$  messbar (Abbildung 5). Auch im periprothetischen Blutstrom war ein schneller Abfall der Rifampicinkonzentration nachweisbar (Abbildung 2). Eine systemische Konzentration von Rifampicin war zu keiner Zeit messbar. In vitro wurde die Wirkung von Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Rorprothesen auf eine Kontamination mit Staphylokokkus aureus, -epidermidis und Escherichia coli analysiert. Das Wachstum von Staphylokokkus aureus und epidermidis konnte durch die beschichteten Prothesen über den gesamten Versuchszeitraum von 3 Tagen verhindert werden. Ein Wachstum von Escherichia coli hingegen setzte nach zwei Tagen ein. Darüber hinaus wurde die postoperative Infektionsrate in vivo in drei Versuchsgruppen am Schweinemodell untersucht (Lachapelle, Graham, Symes. 1994).

- Dacron<sup>TM</sup>+ Prothesen plus Rifampicin
- unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup> Prothesen plus systemische Rifampicingabe
- unbeschichtete Dacron<sup>TM</sup> Prothesen (Kontrollgruppe)

Das Operationsgebiet wurde mit Staphylokokkus aureus kontaminiert, woraufhin 100% der unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup> kolonisiert waren. Bei unbeschichtete Dacron<sup>TM</sup> und einer intravenösen Rifampicintherapie wurde bei 57,4% eine Kolonisierung der Prothese mit Staphylokokkus aureus festgestellt. Bei den Dacron<sup>TM</sup>+Rifampicin Rohrprothese kam es zu einer signifikant niedrigeren Infektionsrate der Prothesen von 15,4% ( $p<0.001$ ). Die gute antiinfektiöse Wirkung von Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin wurde auch durch andere Studien (Hayes et al. 1999; Hernández-Richter et al. 2003) belegt. Jedoch sind diese sehr guten Ergebnisse kritisch zu bewerten. Fraglich ist, ob diese provozierten Infektionen, mit ausgesuchten Erregerstämmen überhaupt vergleichbar sind mit klinischen Infektionen bei Menschen (Stewart, Evers, Earnshaw. 2007; Zilla., Bezuidenhout, Human. 2007). Darüber hinaus wurde bereits in einigen Studien ein negativer Einfluss von Rifampicin auf zelluläre Abläufe wie Angiogenese (Shichiri, Tanaka. 2010), Proliferation (Hughes et al. 1978), Apoptose (Enriquez-Cortina et al. 2013) und Inflammation (An et al. 2008) diskutiert. Inwieweit die angesprochenen Prozesse einen Einfluss auf die Inkorporation einer Rifampicin beschichteten Dacron<sup>TM</sup> Prothese, beziehungsweise einer Rifampicin beschichteten Dacron

Silber<sup>+</sup><sup>TM</sup> haben, ist bisher unklar. Diese Einflüsse wurden bisher in den Studien über Rifampicinbeschichtung von Gefäßprothesen nicht berücksichtigt.



**Abbildung 2:** Die Abbildung beschreibt die mittlere Rifampicinkonzentration im periprothetischen Blutstrom und im Serum in µg/ml in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 30 Minuten wurde eine Konzentration von 14,8µg/ml gemessen. Nach vier Stunden konnten nur noch 4,6µg/ml gemessen werden. Eine messbare Rifampicinkonzentration im Serum war nicht nachweisbar. (Lachapelle, Graham Symes. 1994). Diese Abbildung zeigt das sehr starke Konzentrationsgefälle von Dacron<sup>TM</sup>+ Rifampicin Prothesen.

Neben der Beschichtung von Gefäßprothesen mit Antibiotika wurde auch die Möglichkeit anderer antibakterieller Agenzien in Betracht gezogen. Neben der Verwendung von antiseptischen Lösungen, wie Chlorhexidin (Aboshady et al. 2012), hat sich die Silberbeschichtung von Dacron<sup>TM</sup> Prothesen durchgesetzt. Die antibakterielle Wirkung von Silber ist schon lange bekannt und wird in der Medizin seit Jahrzehnten eingesetzt (Schierholz et al. 1998). Silber entwickelt in seiner oxidierten ionisierten als positiv geladene Kation Ionen (Ag<sup>+</sup>) sowohl bakterizide als auch bakteriostatische Wirkung (Kumar, Münstedt. 2005). Diese Wirkung besteht sowohl auf Gram positive als auch Gram negative Bakterien (Hardman et al. 2004). Dacron Silber<sup>+</sup><sup>TM</sup> Gefäßprothesen, die mit Silberazetat beschichtet sind, geben ionisiertes Silber von der Oberfläche ab. Silberkationen reagieren mit Thiolgruppen in Proteinen, dadurch werden bakterielle Proteine inaktiviert. Außerdem führt der Kontakt mit Silberionen dazu, dass die DNA der Bakterien in einer kondensierten Form vorliegt. Hierdurch ist die Replikation nicht mehr möglich (Feng et al. 2000).

Darüber hinaus wurde eine Beschichtung von Dacron™ mit Heparin in einige Studien untersucht. Heparin hat zwar kaum einen Einfluss auf GPI, jedoch diskutierten Devine, McCollum. 2004 und Lambert et al. 1999 eine signifikant bessere Offenheitsrate durch die Heparinbeschichtung. Diese Ergebnisse führten dazu, dass heparinbeschichtete Dacron™ Prothesen prophylaktisch eingesetzt und von Herstellern vertrieben werden (2015 Maquet Holding B.V. & Co. KG).

Die größte klinische Relevanz haben heutzutage Gefäßprothesen mit Silber- und Rifampicin Beschichtung. Beide Beschichtungen sind Teil der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (Lawall, Pittrow, Diehm. 2009). Schmachet et al. 2005 verglichen Dacron™ + Rifampicin mit Dacron Silber+™ Rohrprothesen auf GPI durch eine Kontamination mit MRSA. Sie konnten zeigen, dass sowohl Dacron™ + Rifampicin als auch Dacron Silber+™ Prothesen eine Kolonisation durch MRSA nicht suffizient verhindern konnten. Schmachet stellte in Aussicht, dass eine Kombination beider antibakterieller Wirkstoffe, als Dacron Silber+™ + Rifampicin eine bessere Wirkung gegen MRSA haben könnte. Gao et al. 2012 untersuchten die Wirkung von Rifampicinbeschichteten PTFE Silber Prothesen im Vergleich zu unbeschichteten PTFE Prothesen auf Staphylokokkus aureus. Sie stellten eine signifikant bessere Wirkung der Kombinationsbeschichtung im Vergleich zur unbeschichteten PTFE Prothese fest (Gao et al. 2012). Ebenfalls wurde ein synergetischer Effekt von Rifampicin mit Silber Nanopartikeln festgestellt. Diese gute Wirkung wurde besonders gegenüber Acinetobacter baumannii untersucht und von einer guten Wirkung gegen Echerischia coli wurde ausgegangen (Wan et al. 2016). Die Studie wurde insbesondere in Hinblick auf eine Therapiemöglichkeit gegenüber multiresistenten Keimen durchgeführt.

Die Kombination von Rifampicinbeschichteten Dacron Silber+™ Prothesen ist für den klinischen Gebrauch zwar zugelassen jedoch nicht etabliert. Für die Beschichtung einer Dacron Silber+™ Prothese mit Rifampicin wird analog zur Standard-Dacron™ Prothese eine 15-minütige Einwirkzeit bei 37°C benötigt. Prothesen mit dieser Kombinationsbeschichtung werden bislang meist bei Patienten mit Gefäßprotheseninfektionen der Aorta verwendet. Dies gilt sowohl für GPI nach klassischem Aortenersatz als für Infektionen eines Stentgrafts im Rahmen einer interventionellen Endovaskulären Aortenreperatur (EVAR) (Capoccia et al. 2016).

Menna et al. 2015 setze eine kombinierte Rohrprothese bei Patienten ein, bei denen sich der Stentgraft nach EVAR infizierte. Helleman et al. 2007 setzte diese Kombinationsprothese bei einem Patienten mit thorakalem Aortenaneurysma und einer begleitenden Escherichia coli Sepsis ein, Van der Vliet et al. 2014 bei einem Aortofemoralen Bypass. Gefäßprotheseninfektionen nach Aortenersatz und der Infekt eines Stentgrafts sind selten. Revisionsoperationen in diesem Bereich jedoch besonders schwierig und mit einer großen Mortalität verbunden (Cernohorsky et al. 2011; Capoccia et al. 2016;).

Dies könnte erklären, warum große kontrollierte randomisierte klinische Studien für Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin bisher fehlen. Die von Gao et al 2012 beschriebene sehr gute Wirkung gegenüber Staphylokokkus aureus und die von Schmacht et al. 2005 vermutete- und von Hardman et al. 2004 bestätigte gute Wirkung gegenüber MRSA könnte jedoch in Zukunft zu einer Verbreitung dieses Konzeptes beitragen.

### **3.7 Die Inkorporation von Gefäßprothesen**

Die Integration einer Gefäßprothese in das umliegende Gewebe ist für Langzeitstabilität, Offenheitsrate und als Prävention von Infektionen von großer Bedeutung (Menger, Hammersen, Messmer. 1992). Die Inkorporation der Prothesen beginnt bereits kurz nach Implantation. In den ersten Stunden kommt es zu einer endo- und extravaskulären Adhäsion von Fibrin und Proteinen. Besonders viel Fibrin sammelt sich um die Gefäßanastomosen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer sterilen Entzündungsreaktion mit Anreicherung von Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. Dies ist Ausdruck einer unspezifischen Fremdkörperreaktion (Müller, Dasbach. 1994). Der Einfluss der zellulären beziehungsweise humoralen Immunantwort auf das Einwachsen einer Gefäßprothese ist nicht abschließend geklärt, von einem synergetischen Effekt von Inflammation auf die Inkorporation von Prothesen ist auszugehen (Davis et al. 2003; Zippel et al. 2008). Nach ungefähr einem Tag bildet sich ein periprothetisches Granulationsgewebe. Dieses entwickelt sich zu Gefäßnetzwerken die in das periprothetische Gewebe einwachsen (Wu et al.1996; Popa et al. 2007). Das Anwachsen von Gefäßen am Prothesenrand wird als Neoangiogenese bezeichnet. Darüber hinaus besteht das Granulationsgewebe aus Fibrin, Proteinen, dem von Willebrandfaktor und Erythrozyten (Müller, Dasbach. 1994).



Durch die Entwicklung eines suffizienten Granulationsgewebes kann die Ansiedelung von pathologischen Keimen auf- und um die Prothese effektiv verhindert werden (Menger, Hammersen, Messmer. 1992). Nach einigen Wochen kommt es zur endovaskulären Auskleidung der Gefäßprothese mit Endothel und zur Bildung einer Neointima (Dal Ponte et al. 2002). Besonders eine ausreichende und frühe Neoangiogenese mit einem suffizienten Granulationsgewebe ist für die Inkorporation von Gefäßprothesen und anderen synthetischen Materialien essentiell. Einwachsende Gefäßnetzwerke in das Implantationsgebiet sind für eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen entscheidend (Novosel et al. 2011).

Eine insuffiziente Neoangiogenese und ein damit schlecht ausgebildetes Granulationsgewebe, können neben einer erhöhten Infektionsgefahr zu der Entstehung eines Seroms beitragen. Ein Serom ist eine Ansammlung von sterilem Exsudat in Pseudozysten und kann sich postoperativ im Bereich von Wundrändern und somit auch an Gefäßanastomosen bilden (Ladenheim et al. 2012). Serome können die Integration von extrakorporalem Material deutlich verlängern oder sogar unmöglich machen (Pascual et al. 2015).

### 3.8 Fragestellung

Sowohl Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin als auch Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin sind laut der deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie für den Gefäßersatz zugelassen (Lawall, Pittrow, Diehm. 2009). Gerade Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin ist für Revisionsoperationen nach Gefäßprotheseninfektion etabliert. Die Kombination der beiden antibakteriellen Wirkstoffe Rifampicin und Silber zu Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin ist, wie bereits beschrieben, bisher weniger beachtet aber insbesondere aufgrund der potentiell besseren Wirkung gegenüber MRSA und Escherichia coli eine Option. Inwieweit eine Rifampicinbeschichtung von Gefäßprothesen einen Einfluss auf frühe Neoangiogenese, Inflammation, Proliferation und Apoptose im periprothetisches Gewebe hat ist jedoch unklar. Ein negativer Einfluss von Rifampicin auf manche dieser zellulären Prozesse ist durch einige Studien bereits beschrieben. Wir beschäftigten uns mit dem speziellen Einfluss einer Rifampicinbeschichtung von Gefäßprothesen auf deren Integrationsverhalten.

Durch die bereits bekannten Arbeiten zu den zytotoxischen Einflüssen von Rifampicin stellten wir die These auf, dass Rifampicin die Integration von Gefäßprothesen verschlechtert.

Wir verglichen also die Biokompatibilität von unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup> Kontrollprothesen mit Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin und mit Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Prothesen.

Eine signifikant bessere Biokompatibilität durch Dacron Silber<sup>+TM</sup> verglichen mit Dacron<sup>TM</sup> bewiesen bereits Jeanmonod et al. 2014. Welchen Einfluss auf das Integrationsverhalten die Rifampicinbeschichtung einer Dacron<sup>TM</sup> beziehungsweise einer Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothese hat, wurde bisher nicht untersucht.

Für das Tierexperiment verwendeten wir das Rückenhautkammermodell der Maus. Dieses Modell erlaubte eine detaillierte quantitative Analyse von Neoangiogenese und Inflammation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Zur Untersuchung von Zellproliferation und Apoptose wurden immunhistochemische Schnitte angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht.

## **4. Material und Methoden:**

### **4.1 Versuchstiere:**

Die experimentelle Arbeit wurde an 12-16 Wochen alten, 24-26g schweren männlichen Mäusen der Spezies C57BL/6 durchgeführt. Dies sind Standard Labormäuse von einem Stamm der Charles River Laboratorien GmbH aus Sulzfeld. Mäuse dieses Stammes wurden bereits durch unsere und andere Forschungsgruppen für die Durchführung von Rückenhautkammern erfolgreich eingesetzt. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit unter Einhaltung eines 12 stündigen Tag-Nacht-Zyklus einzeln in Käfigen gehalten. Während der gesamten Versuchszeit hatten sie freien Zugang zu Trinkwasser und Standardtrockenfutter (Altromin, Lage Deutschland). Sämtliche Eingriffe und Untersuchungen wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz §10 durchgeführt und wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt.

### **4.2 Präparation der Rückenhautkammer:**

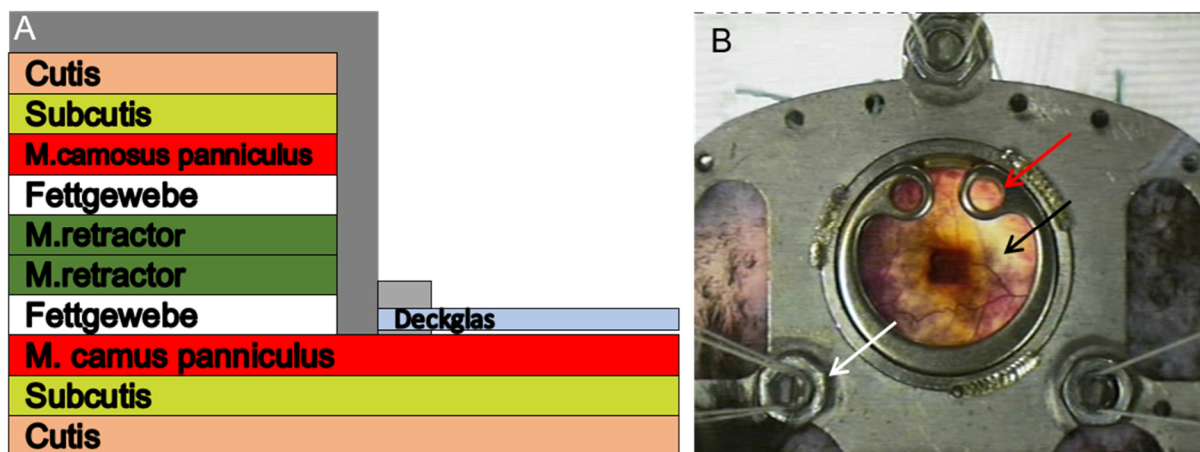
Eine Rückenhautkammer (RHK) besteht aus zwei symmetrischen Rahmen, die durch drei Schrauben miteinander verbunden sind. Verschlussen wird die RHK durch eine Deckplatte aus Plexiglas und einen Sperring (Abbildungen 3 und 4) mit einem Gesamtgewicht von 3,2g und besteht aus einer Titanlegierung.



**Abbildung 3:** C57BL/6 Maus nach der Präparation der RHK.

Die Tiere wurden entsprechend ihres exakten Körpergewichts analgosediert. Verwendet wurde hierfür eine Lösung bestehend aus 75mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavest™; Parke Davis, Freiburg, Deutschland), 75mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun™; Bayer, Leverkusen, Deutschland) gelöst in 8,5ml steriles NaCl. Dieses so hergestellte Betäubungsmittel wurde mit einer 26 G Injektionskanüle intra-peritoneal appliziert. Der Wirkungseintritt der Narkose wurde durch Überprüfung des Reflexstatus am Hinterlauf der Tiere sichergestellt. Diese Prüfung der Narkosetiefe erfolgte auch regelmäßig während des Eingriffs. Bei nicht ausreichend tiefer Narkose wurde in 0,1ml Schritte Narkoselösung appliziert. Zum Schutz der Horn- und Bindehäute der Tiere, wurde eine feuchtigkeitsspendende Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe™; Bayer, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Das Fell und die Haare wurden zunächst mit einem Elektrorasierer grob entfernt. Anschließend folgte eine chemische Depilation mit einer Enthaarungscreme (asid®-med; Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland). Daraufhin wurde die Rückenhaut der Tiere desinfiziert (74,1% Ethanol, 10% 2-Propanolol) (Softasept®N™; Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Um ein perioperatives Auskühlen der Mäuse zu verhindern, wurde die Präparation unter einer Wärmelampe (Osram Siccatherm 150W, 240V HG) durchgeführt. Die Rückenhaut der Tiere wurde unter Transillumination auf die Verläufe der Stammgefäße untersucht und so ausgerichtet, dass die Gefäße auf beiden Seiten kongruent verliefen. Die Maus wurde kranial und kaudal mit Haltefäden entlang ihrer Medianlinie senkrecht in eine Haltevorrichtung gespannt. Die erste Komponente des Gestells wurde mit sechs Einzelknopfnähten an der Umschlagsfalte der elastischen Rückenhaut befestigt. Hierfür wurden handelsüblicher Bindfaden und eine chirurgische gebogene Nadel verwendet. Zwei Stichinzisionen wurden vorsichtig an der Rückenhaut vorgenommen. Durch die entstandenen Inzisionen konnten die beiden Schrauben durch die Haut geführt werden (Abbildung 4B). An den Schrauben wurde die zweite Komponente der Rückenhautkammer befestigt. Mit mikrochirurgischem Operationsbesteck wurde ein 15mm im Durchmesser großes Beobachtungsfenster kreisrund exzidiert und bis zum M. camosus panniculus freipräpariert (Abbildung 4A). Hierfür wurde das Tier in Seitenlage unter einem Operationsmikroskop positioniert. Nach Präparation und dem Einsatz des Sperrrings verkleinerte sich das Beobachtungsfenster auf 11mm im Durchmesser für die weiteren Untersuchungen. Es war jedoch sehr wichtig das gesamte Fenster von 15mm im Durchmesser frei zu präparieren um eine Komprimierung und damit einhergehende Gewebeirritation zu

vermeiden (Abbildung 4B). Daraufhin konnte die zweite Komponente des Titanrahmens an den Schrauben befestigt und mit Stahlmuttern mit diesem verschraubt werden. Mit einem Plastikdeckgläschen und einem Sprengring wurde das Beobachtungsfenster luftdicht und blasenfrei verschlossen (Abbildung 4B). Die überstehenden Schrauben wurden mit einer Zange gekürzt um die Bewegungseinschränkung der Mäuse auf ein Minimum zu reduzieren. Die gesamte Präparation nahm ungefähr 30-40 Minuten in Anspruch. Im Anschluss an den Eingriff wurden die Tiere in einen Einzelkäfig gelegt. Während der Aufwachphase wurde eine Wärmelampe (Osram Siccatherm 150W, 240V HG) auf die Maus gerichtet und sie in etwas Käfigstreu eingebettet. Diese Maßnahmen sollten ein postoperatives Auskühlen des Tieres verhindern. Erst nach völligem Abklingen der Narkose wurde die Maus in die Versuchstierhaltung zurückgebracht. 48 Stunden nach dem Eingriff hatten sich die Tiere in der Regel gut an das Gestell auf ihrem Rücken gewöhnt und auch das Operationstrauma überstanden. Dies konnte durch ein normales Fressverhalten und einen wieder einsetzenden Bewegungsdrang beurteilt werden.



**Abbildung 4:** A: Schematische Darstellung der Gewebeschichten an einer C5BL/6 Maus, B: Darstellung einer RHK in 10-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop. Weißer Pfeil: Schraube mit Stahlmutter, schwarzer Pfeil: Beobachtungsfenster 11mm im Durchmesser, roter Pfeil: Sperring: Das zu Präparierende Fenster beträgt 15mm im Durchmesser, 4mm werden durch den Sperring verdeckt.

### **4.3 Implantation Alloplastischer Materialien:**

#### **4.3.1 Dacron™: (Polyethylenterephthalat kurz PET)**

Gefäßprothesen aus gewirktem Polyesterenterephthalat und an der Außenseite mit Kollagen gewirkt. Zur Förderung einer optimalen Einheilung und langfristigen Durchgängigkeit haben die Prothesen eine Flachprofil-Velours-Beschichtung auf der Außenfläche um Flussturbulenzen zu minimieren und die Bildung einer Neointima zu verstärken (2015 Maquet Holding B.V. & Co. KG).

#### **4.3.2 Dacron Silber<sup>+</sup>™:**

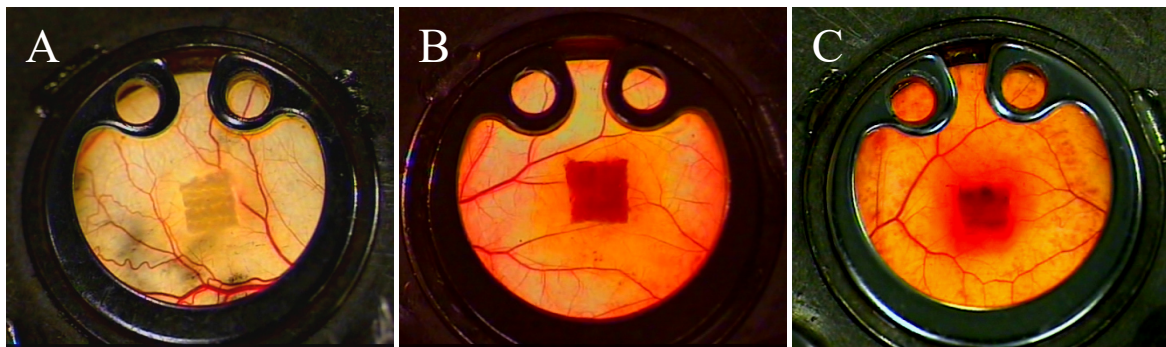
Bei diesen Gefäßprothesen handelt es sich auch um eine kollagen gewirkte Prothese aus Polyethylenterephthalat. Sie werden vom Hersteller (2015 Maquet Holding B.V. & Co. KG) zusätzlich mit Silberazetat beschichtet. Somit können die antibakteriellen Eigenschaften des Silbers direkt im Operationsfeld wirken. Die Abgabe der Silberionen erfolgt kontinuierlich über 30 Tage. Nach 30 Tagen ist die Prothese wie eine ungeschützte Dacron™ Prothese zu beurteilen (Ricco, Group. 2006).

#### **4.3.3 Rifampicin:**

Rifampicin (60mg/mL Rifadine® in 0,9% NaCl gelöst, Sanofi-Aventis, Berlin, Germany) ist ein halbsynthetisches, bakterizides Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycinantibiotik. Es hemmt die DNA-abhängige RNA Polymerase und dadurch die Proteinbiosynthese. Es ist gut wirksam gegen Mykobakterium tuberculosis zu dessen Therapie es hauptsächlich eingesetzt wird. Ferner ist eine gute Wirksamkeit gegen Staphylokokkus aureus, Meningokokken und auch Legionellen beschrieben (Vesely, Pien, Pien. 1998). Wegen guter Diffundierbarkeit, kann es bei schwer sanierbaren Infektionen, wie zum Beispiel Biofilmen eingesetzt werden (Schaberg et al. 2012).

#### 4.3.4 Beschichtung von Dacron™ und Dacron Silber<sup>+</sup>™ mit Rifampicin:

Die sterilen Gefäßprothesen wurden bei einer Temperatur von 37 °C für 15 Minuten in einer Rifampicin-NaCl Lösung gewirkt. Dieses Vorgehen entspricht der gängigen klinischen Praxis (Lachapelle, Graham, Symes. 1994; Gahtan, et al. 1995; Coggia et al. 2001). Mit dieser Methode kann eine Rifampicinkonzentration von 0,06 mg/mm<sup>2</sup> auf der Gefäßprothese erreicht werden.



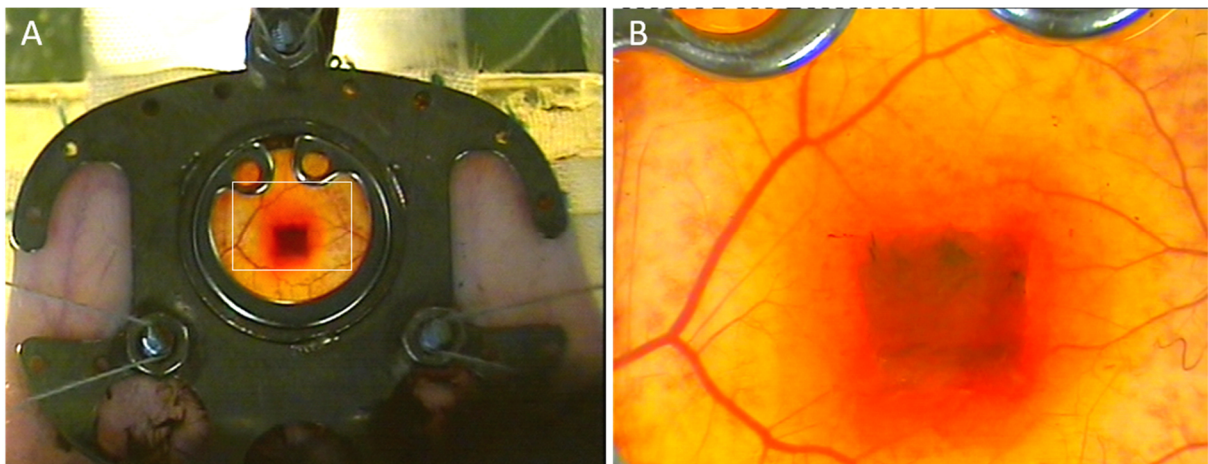
**Abbildung 5:** A-C: Zeigt Gefäßprothesen in der RHK in 16-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung nach Implantation. A: Dacron™; B: Dacron™ + Rifampicin; C: Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin. Nach anfangs hohen Konzentrationen von 57,6µg/g fällt die Konzentration auf der Prothese bereits nach 4 Stunden ab. Drei Tage nach Implantation ist nur noch eine Konzentration < 2µg/g messbar (Lachapelle, Graham, Symes. 1994).

#### 4.4 Implantation der Gefäßprothesen

Die verwendeten Gefäßprothesen wurden zuerst in eine Form gebracht, die eine Implantation in Rückenhautkammern bei Mäusen erlaubte. Grundsätzlich sollten die in eine Rückenhautkammer eingesetzten Materialien nicht dicker als 1mm sein, um eine hermetische Versiegelung der Kammer zu gewährleisten. Ferner sollten die implantierten Substanzen generell ein Format von 2x2mm nicht überschreiten, da sonst eine korrekte Analyse mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) nicht mehr möglich ist (Laschke, Vollmer, Menger. 2011). Dies bedeutet, dass ein Großteil der Interponate die in eine Rückenhautkammer eingesetzt werden, nicht in der im klinischen Alltag verwendeten Originalgröße entspricht. Für die Untersuchung von Angiogenese und Leukozyten-Endothel Interaktion ist die Größe der Materialien jedoch nicht signifikant relevant (Laschke, Vollmer, Menger. 2011).



Insofern wurden die hier verwendeten Gefäßprothesen unter einem Operationsmikroskop zu 2 mm<sup>2</sup> großen quadratischen Interponaten zugeschnitten. 48 Stunden nach der Präparation der Rückenhautkammer erfolgte die Implantation der vorbereiteten Gefäßprothesen. Die Mäuse wurden hierfür erneut analgosediert und unter dem Operationsmikroskop in Seitenlage platziert. Für die Wiedereröffnung der Kammer mussten Sperring und Deckglas entfernt werden. Nun erfolgte der Einsatz der Gefäßprothesen auf die Schicht des M. camus paniculus (Abbildung 6). Danach erfolgte der erneute Verschluss der Rückenhautkammer mit Deckglas und Sperring. Wie bereits bei der Präparation, musste das Deckglas hermetisch aufgesetzt werden. Darüber hinaus musste sehr sorgsam vorgegangen werden, um eine bakterielle Kontamination und eine mechanische Irritation der Kammer während der Implantation zu vermeiden. Unmittelbar nach der Implantation erfolgte die erste Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.



**Abbildung 6:** RHK nach Implantation einer Dacron Silber<sup>+</sup> + Rifampicin A: In 6-facher Vergrößerung weißes Rechteck: in B gezeigter Ausschnitt. B: 40-fache Vergrößerung des weißen Rechtecks.



#### 4.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Darstellung der Neoangiogenese, Mikrozirkulation und Leukozyteninteraktion angewendet. Diese mikroskopischen Untersuchungen konnten mit einem DVD-Recorder (DVD-R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) aufgezeichnet werden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Aufzeichnungen mit dem Bildanalyseprogramm Cap-Image (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Für die Detektion von Zellen und Gefäßen in der IVM wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und FITC (5% Fluoreszein-Isothiocyanatmarkiertes Dextran (FITC-Dextran, Molekulargewicht 150.000 Da, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Rhodamin 6 eignete sich zum direkten Anfärben von Granulozyten und Monozyten. Dieser Farbstoff ermöglichte eine Beurteilung der Leukozyteninteraktion mit dem Gefäßendothel. FITC führte zu einer Kontrastverstärkung des Blutplasmas. Hiermit ließen sich die intravasalen Räume darstellen. Nach einer ausreichenden Analgosedierung wurde der Maus 0,1 ml dieses Fluoreszenzfarbstoffgemischs retrobulbär in den Venenplexus injiziert. Daraufhin wurden die Tiere auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert und auch dem Objektisch eines Zeiss Axiotech Mikroskops (Zeiss; Oberkochen, Deutschland) positioniert. Dieses Mikroskop war zusätzlich um eine 100W HBO Quecksilberhöchstdrucklampe, einen Auflichtilluminator und einen Reflektorschieber erweitert.

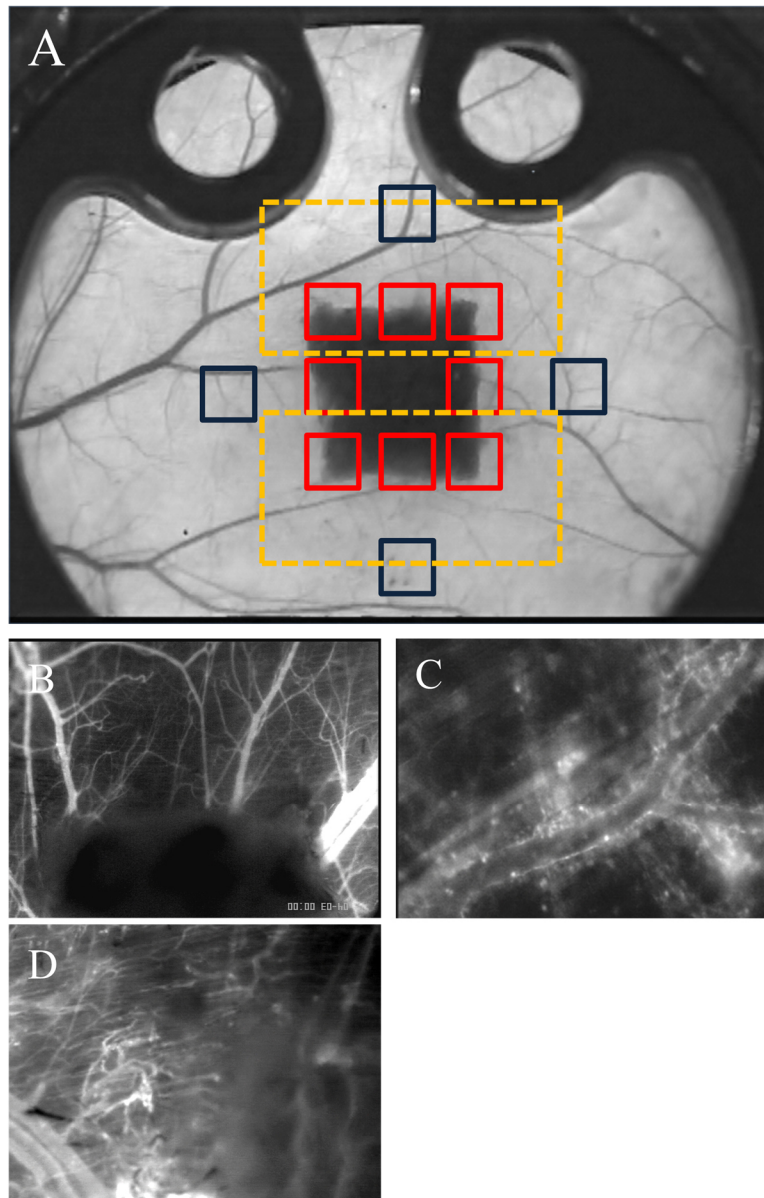
Der Reflektorschieber bestand aus drei unterschiedlichen Filtern die eine Anregung mit blauem (450-490nm Anregungswellenlänge / 520nm Emissionswellenlänge), grünem (530-560nm Anregungswellenlänge / 580nm Emissionswellenlänge) und ultraviolettem Licht (330-390nm Anregungswellenlänge / 430nm Emissionswellenlänge) ermöglichten. Die durch Rhodamin 6 angefärbten Granulozyten und Monozyten wurden in Grünlicht-Epi-Illumination dargestellt. Die Kontrastverstärkung des Blutplasmas durch FITC erfolgte in Blaulicht-Epi-Illumination. Darüber hinaus wurden ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Limited, Tokio, Japan) und eine CCD Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) an das Mikroskop angeschlossen. Der Videotimer diente der Anzeige der Versuchstiernummer und des Untersuchungstages.

#### 4.5.1 Analyse der Mikrohämodynamik

Die Aufnahmen aus der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden mit dem in der Mikrozirkulationsforschung etablierten Bildanalyseprogramm Cap-Image (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Mit diesem Programm ist eine quantitative Messung der Angiogenese, der Leukozyten-Endothelinteraktion und der Mikrohämodynamik möglich. Die Auswertungen unterlagen einem standardisierten Schema. (Abbildung 7).

Die Analyse der Neoangiogenese erfolgte in acht sogenannte „Regions of Interest“ (ROI) mit einer Größe von  $0,4 \text{ mm}^2$  und wurde als funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  angegeben. Die ROI befanden sich am unmittelbaren Prothesenrand (Abbildung 7A, D).

Für die Untersuchung der Mikrohämodynamik und der Leukozyten-Endothel-Interaktion wurden vier ROI in gewissen Abstand um die Prothese ausgesucht. In diesen ROI sollten sich ausgewählte postkapilläre Venolen oder Sammelvenolen befinden. An den ausgewählten Venolen wurden mikrohämodynamischen Messungen durchgeführt. Außerdem erfolgte die Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Reaktion an den gleichen Venolen (Abbildung 7A, C).



**Abbildung 7:** Schema der standardisierten Auswertung mit Hilfe der IVM. A: ROI der Übersichtsaufnahmen (gelbe Quadrate), Angiogenese (rote Quadrate), der Leukozyten-Endothelinteraktion und der Mikrohämodynamik (schwarze Quadrate in A) B: Übersichtsaufnahmen in Blaulicht-Epi-Illumination in 5-facher Vergrößerung (gelbe Quadrate in A) C: Darstellung der Leukozyteninteraktion und Mikrohämodynamik an Venolen in 40-facher Vergrößerung Leukozyteninteraktion in Grünlicht-Epi-Illumination (schwarze Quadrate in A) D: Bestimmung der funktionellen Kapillardichte durch 8 Analysefelder am Prothesenrand Vergrößerung in Blaulicht-Epi-Illumination in 40-facher Vergrößerung (rote Quadrate in A)

#### **4.5.2 Funktionelle Kapillardichte**

Neugebildete Kapillaren, sogenannte „Sprouts“ wurden in acht ROI im Rahmen der Cap-Image Bildanalyse mit der Computermaus nachgezeichnet. Die Berechnung der funktionellen Kapillardichte erfolge durch eine Division der gemessenen Gesamtlänge der neugebildeten Kapillaren durch die zu analysierende Fläche des Beobachtungsfeldes ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) (Menger, Hammersen, Messmer. 1992; Debergh, Pattyn, Cee-len. 2015)

#### **4.5.3 Gefäßdurchmesser (d)**

Der Gefäßdurchmesser von postkapillären Venolen wurde mit Hilfe von Cap-Image gemessen. Der Gefäßdurchmesserstrecke  $d$  sollte möglichst senkrecht zum Gefäßverlauf ausgerichtet sein und wurde in  $\mu\text{m}$  angegeben.

#### **4.5.4 Blutzellgeschwindigkeit (v)**

Eine Bestimmung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten war durch die Line-Shift-Diagramm-Methode möglich. Mit Cap-Image konnte eine zur Flussrichtung parallel verlaufende Linie in das Gefäßlumen der Venole gezeichnet werden. Danach wurde die auf DVD aufgezeichnete Mikroskopie für 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während dieser Messperiode erstellte die Software zu verschiedenen Messzeitpunkten unterschiedliche Graustufen. Mithilfe dieser Graustufen ließ sich ein sogenanntes Line-Shift-Diagramm erstellen und es konnte dann die Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) aus diesem Diagramm berechnet werden (Amon, Menger, Vollmar. 2003).

#### 4.5.5 Mikrovaskulärer Blutfluss (Q)

Die Berechnung des Mikrovaskulären Blutflusses (Q) erfolgte mit folgender Formel:

$$Q = \pi \times (d/2)^2 \times v/1,6 \text{ [pl/s]}$$

d= Gefäßdurchmesser, 1,6(pl/s) = Baker-Wayland-Faktor

Innerhalb von Blutgefäßen ist die Blutzellgeschwindigkeit im Zentrum des Gefäßes höher ist als in den Randbereichen. Bei diesem spezifischen Flusstrom handelt es sich um ein so genanntes parabolisches Geschwindigkeitsprofil. Baker und Wayland entwickelten einen Faktor der dieses parabolische Geschwindigkeitsprofil korrigiert. (Baker, Wayland. 1974)

#### 4.5.6 Sheerrate ( $\gamma$ )

Die Berechnung der Sheerrate ( $\gamma$ ) wurde in Anlehnung an das erste Newtonsche Gesetz mit folgender Formel berechnet:

$$\gamma = 8 \times v/d \quad d = \text{Gefäßdurchmesser, } v = \text{Blutzellgeschwindigkeit}$$

#### 4.5.7 Leukozyten Interaktion

Leukozyten wurden nach der Bewegung am Gefäßendothel in adhärenz- und rollende Zellen eingeteilt. Adhärenz Leukozyten sind solche, die sich während einer Beobachtungszeit von 20 Sekunden nicht bewegten. Die Anzahl der adhärenz Leukozyten wurde in Zellen pro  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche angegeben (Anzahl Zellen/ $\text{mm}^2$ ). Berechnet wurde die Endotheloberfläche aus Durchmesser und Länge der Venole, als zylindrisches Gefäß. Rollende Leukozyten wurden als jene definiert, die mit einer Geschwindigkeit von weniger als  $2/5$  der gemessenen Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) einen Referenzpunkt in der Venole passierten. Die Angabe erfolgte als Anzahl der Zellen/min (Hoffmann et al. 2002; Laschke et al. 2007; Laschke, Vollmer, Menger. 2011).

## **4.6 Immunhistochemie und Histologie**

16 Tage nach Präparation der Rückenhautkammern und 14 Tage nach Implantation der Gefäßprothesen wurde das Implantat mit umliegendem Gewebe exzidiert. Hierfür wurden die Tiere in tiefer Narkose mittels Genickbruch geopfert. Nach der Explantation wurde das Gewebe in Formaldehyd 4% gelegt und 24 Stunden später in Paraffin fixiert und im Folgenden wurden Serienschritte mit Schichtdicken von 3 µm angefertigt. Die Auswertung der immunhistochemischen sowie histologischen Präparate erfolgte sowohl im Hell- als auch im Dunkelfeld. Die Analyse wurden an einem konventionellen Durchlichtmikroskop (BX 60; Olympus, Hamburg, Deutschland) in 20 und 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

### **4.6.1 Konventionelle Histologie**

Die Gewebeschnitte wurden zur lichtmikroskopischen Analyse mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt saure Strukturen blau und Eosin basische Strukturen rot an.

### **4.6.2 Immunhistochemie**

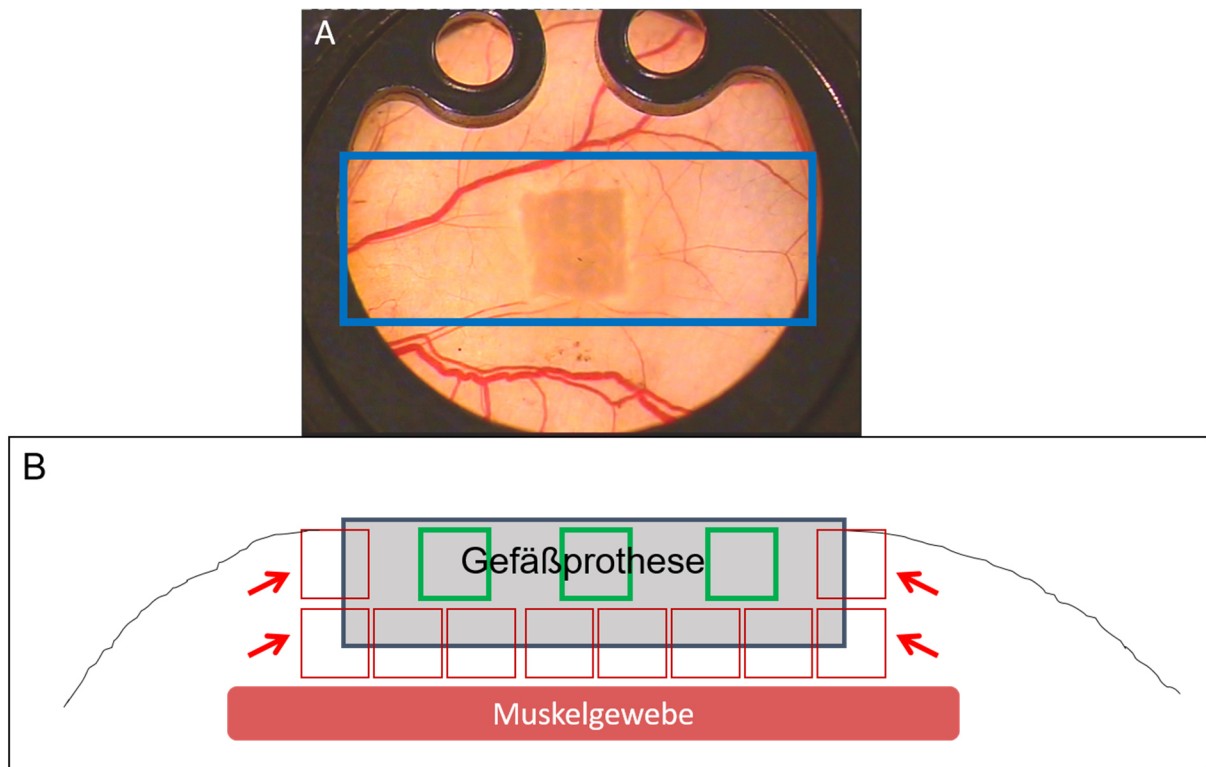
Für den immunhistochemischen Nachweis von CD-31 positiven Gefäßen wurde das exzidierte Gewebe mit einem monoklonalen Ratten anti-Maus Antikörper (1:30; Dianova GmbH, Hamburg, Germany) gegen CD-31 inkubiert. Für das Anfärben von endothelialen Zellen wurde als Sekundärantikörper ein Ziege anti-Ratten Cy 3 (Cyanine Dyes) (1:50; Dianova GmbH) Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:500; Sigma-Aldrich) dargestellt.

Für die Identifikation von Myeloperoxidase (MPO) positiven Leukozyten, CD-3 positiven Lymphozyten, KI-67 positiven proliferierenden Zellen und Caspase 3 positiven apoptotischen Zellen wurde mit avidin-biotin Komplex immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Es wurden ein polyklonaler Kaninchen anti-MPO Antikörper

(1:100; Abcam, Cambridge, UK), ein polyklonaler Kaninchen anti-CD3 Antikörper (1:100; Abcam) ein polyklonaler Kaninchen anti-KI-67 Antikörper (1:100; Abcam) und ein polyklonaler Kaninchen anti-caspase-3 Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt, Germany) verwendet. Danach folgte die Inkubation mit einem Ziege anti-Ratte IgG biotin Antikörper (ready to use; Abcam). Nun folgte die Inkubation mit einem Peroxidase gebundenes Avidin (1:50; Sigma-Aldrich). Makrophagen wurden mit einem monoklonalen Mäuse anti-MAC387 Antikörper (1:50; Abcam) behandelt. Danach wurden sie mit einem Ziege anti Maus IgG Peroxidase Antikörper (1:200; Dianova GmbH) inkubiert. Bei allen Schnitten wurde 3,3' Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich) als Chromogen verwendet. Alle Gewebeschnitte wurden nach Mayer mit Hemalaun gegengefärbt (Merck, Darmstadt, Germany).

Die Caspase-3 und KI-67-positiven Zellen wurden in 10 verschiedenen Analysefeldern den High Power Fields (HPF) in 40-facher Vergrößerung beurteilt.

Die Anzahl der positiven Zellen wurde als Prozent der absoluten Zellzahl eines HPF angegeben. Die quantitative Analyse der CD-31 positiven Gefäße erfolgte bei 20-facher Vergrößerung in 7 HPF. Die Anzahl der positiven Gefäße wurden mit der Fläche des jeweiligen Ausschnitts ins Verhältnis gesetzt und Gefäßdichte  $\text{mm}^2$  angegeben. MPO positive Leukozyten, CD-3 positive Lymphozyten und MAC387 positive Makrophagen wurden in 40-facher Vergrößerung in 4 HPF untersucht. Angegeben wurden MPO, CD-3 und MAC387 in positiven Zellen pro Fläche in  $\text{mm}^2$  (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schema der Lichtmikroskopischen Auswertung: A: gekennzeichnete Areal (blaues Rechteck) der RHK wurde exzidiert und histologisch/immunhistochemisch angefärbt. B: Schematische Darstellung der lichtmikroskopischen Auswertung. Innerhalb des Gewebeschnitts wurden HPF (rote und grüne Quadrate) auf der Prothese und deren unmittelbarer Nachbarschaft ausgewertet. Rote Quadrate HPF für die Analyse von KI 67 und Caspase 3 Schnitten. Grüne Quadrate und mit Pfeilen markierte rote Quadrate HPF für die Analyse der CD-31 Schnitte. Für die Auswertung der MPO, CD-3 und MAC387 Schnitte wurden jeweils zwei HPF an den Seiten der Prothese gewählt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten HPF.



## **4.7 Versuchsprotokoll**

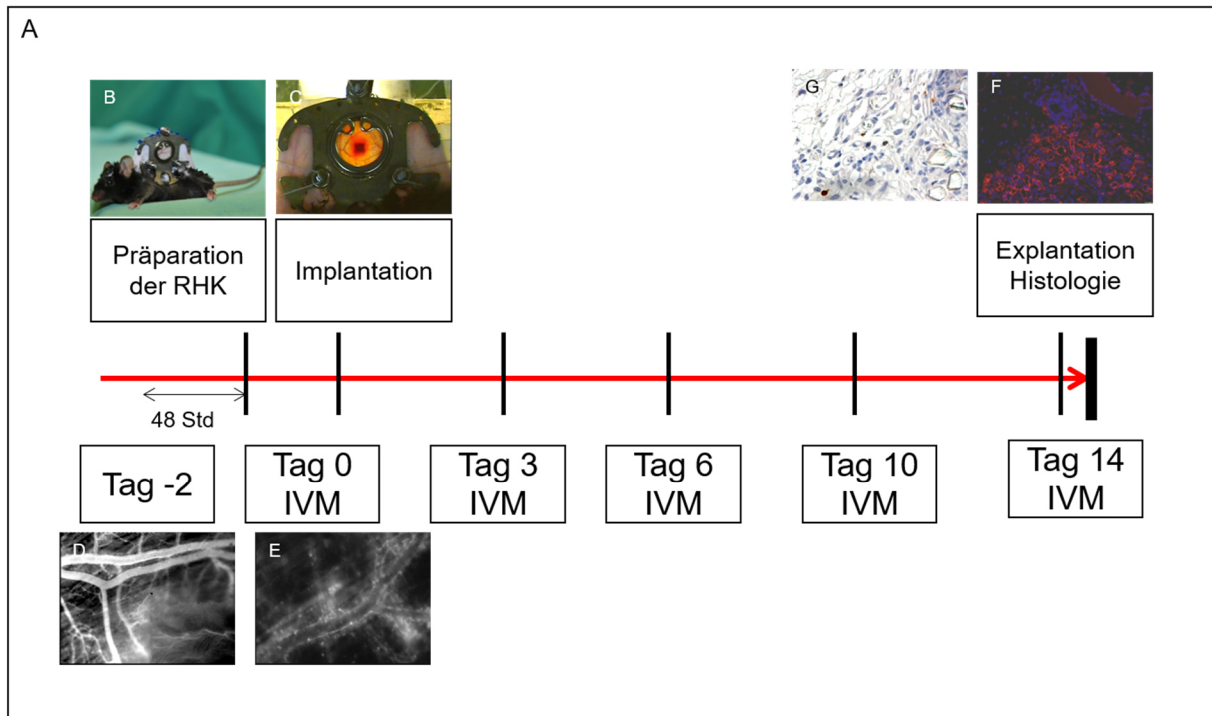
### **4.7.1 Versuchsgruppen**

24 männliche C57BL/6-Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden, abhängig von der implantierten Gefäßprothese, in drei Gruppen eingeteilt

1. Gruppe Dacron™ (n=8)
2. Gruppe Dacron™ + Rifampicin (n=8)
3. Gruppe Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin (n=8)

### **4.7.2 Versuchsablauf**

Zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammer, wurde im direkten Anschluss an die Implantation der Prothesen mit der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie begonnen. Dieser Tag wurde als Tag 0 definiert. Die IVM wurde an den darauffolgenden Tagen 3, 6, 10 und 14 wiederholt und konnte später mithilfe des Bildanalyseprogramms Cap-Image quantitativ ausgewertet werden. Nach dem Ende der in-vivo Experimente wurden die Tiere geopfert. Danach wurden die Implantate mit umliegendem Gewebe exzidiert, immunhistochemisch angefärbt und konnten mikroskopisch ausgewertet werden.



**Abbildung 9:** A: Schema des Versuchsablaufs. B: Tag -2 Präparation der RHK. C: Tag 0 Implantation der Gefäßprothesen. D, E: Tage 0, 3, 6, 10, 14 IVM Auswertung D: Auswertung der funktionellen Kapillardichte. E: Auswertung der Leukozyten-Endothel Interaktion. Tag 14 Explantation der Gefäßprothesen und immunhistochemische Darstellung F: CD-31 Färbung zur Auswertung der Gefäßdichte. G: Caspase-3 Färbung für die Analyse apoptotischer Zellen.

#### 4.8 Statistik

Nach der Kontrolle der Daten auf Normalverteilung und Varianz, wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem einfachen Anova-Test (SigmaStat; Jandel Corporation, San Rafael, CA). analysiert. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Eine statistische Signifikanz lag ab einem p-Wert  $<0,05$

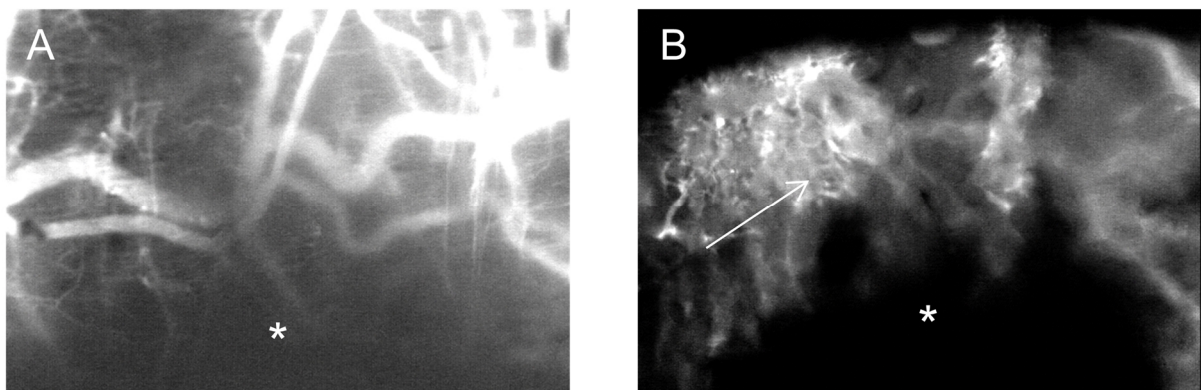
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vaskularisierung der Gefäßprothesen

#### 5.1.1 Vergleich von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin mit Dacron™ und Dacron™ + Rifampicin

Die Neoangiogenese zeigte sich durch die Ausbildung eines Granulationsgewebes und konnte bei den Dacron™, Dacron™ + Rifampicin und Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin beobachtet werden

Bereits drei Tage nach der Implantation konnten Sprouts ausgehend von Venolen und Kapillaren nachgewiesen werden und wurde als funktionelle Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> gemessen. An den folgenden Untersuchungstagen kam es sowohl zu einer Mengen- als auch zu einer Größenzunahme der Sprouts und es bildeten sich Netzwerke aus neugebildeten Gefäßen im Granulationsgewebe. Auf der Prothese selber kam es bei keiner der Versuchsgruppen zu einer Gefäßneubildung.

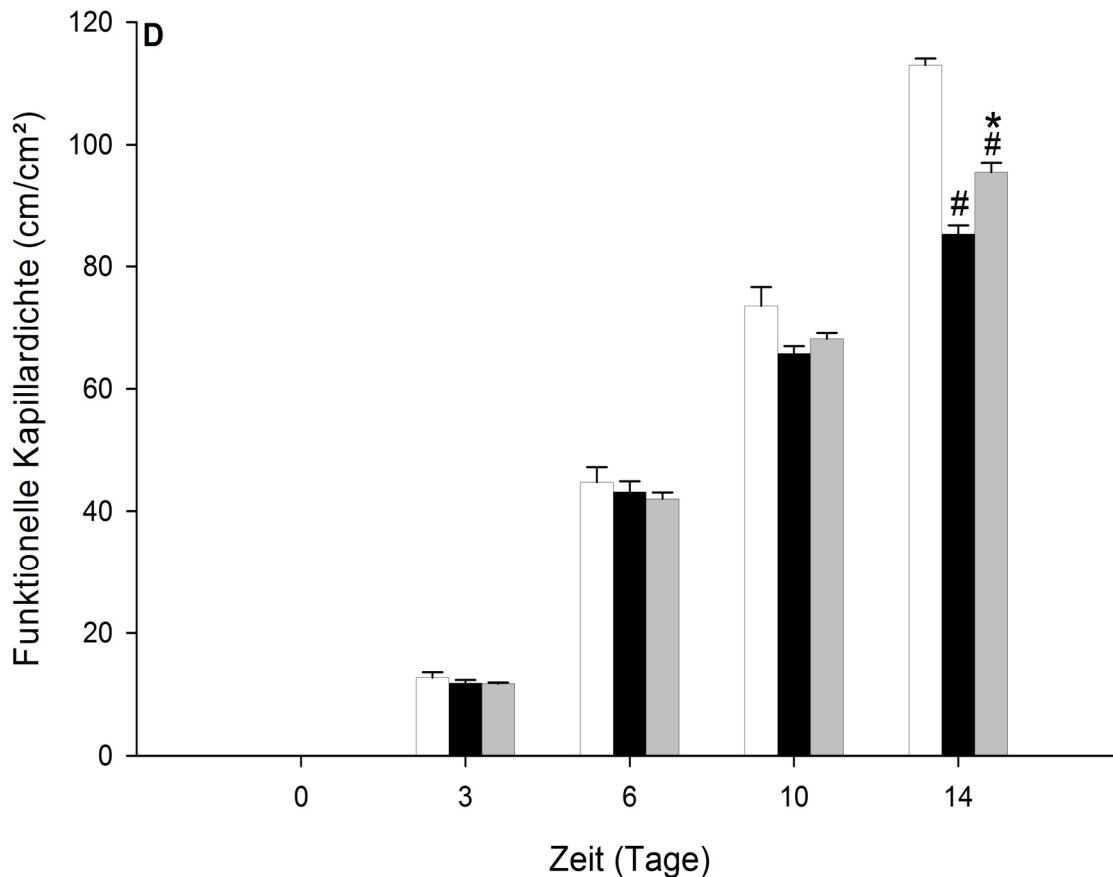
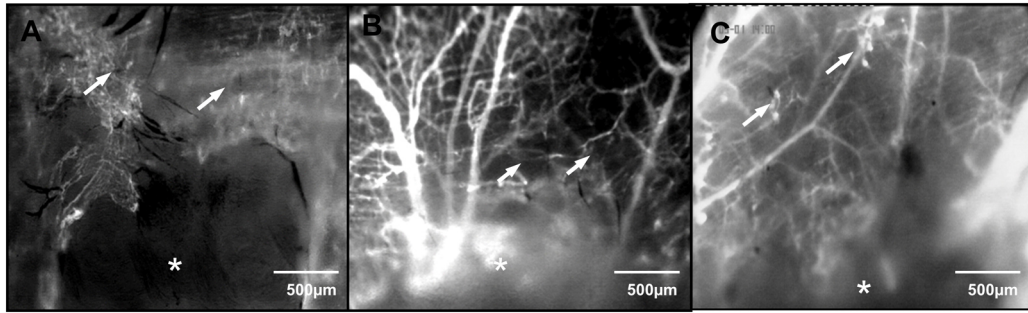


**Abbildung 10:** IVM Aufnahmen einer Dacron™-Prothese an den Tagen A: 0 und B: 14. B: Tag 14 Bildung eines Granulationsgewebes mit Netzwerken aus Neoangiogenese (weiße Pfeile).

Während der gesamten in-vivo Beobachtungszeit war die Neoangiogenese bei den Dacron™ + Rifampicin Prothesen verglichen mit unbeschichteten Dacron™ Prothesen geringer ausgeprägt. Am Tag 14 konnte eine signifikant höhere funktionelle Kapillardichte nachgewiesen werden. ( $85 \pm 1,4 \text{ cm/cm}^2$  gegenüber  $113 \pm 1 \text{ cm/cm}^2$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 11).

An sämtlichen Untersuchungstagen war die Neoangiogenese der unbeschichteten Dacron™- stärker ausgeprägt als der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen. Am Tag 14 mit dem Nachweis einer Signifikants ( $96 \pm 1,5 \text{ cm/cm}^2$  gegenüber  $113 \pm 1 \text{ cm/cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 11).

An den Untersuchungstagen 3 und 6 war die Neoangiogenese der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen geringer ausgeprägt als die der Dacron™ + Rifampicin Prothesen ohne den Nachweis einer Signifikants. Ab dem Untersuchungstag 10 konnte eine stärkere Neoangiogenese der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen verglichen mit den Dacron™ + Rifampicin Prothesen verzeichnet werden, am Tag 14 konnte dann eine signifikant stärkere Neoangiogenese gemessen werden. ( $85 \pm 1,4 \text{ cm/cm}^2$  gegenüber  $96 \pm 1,5 \text{ cm/cm}^2$ ,  $p < 0,05$  Abbildung 11).



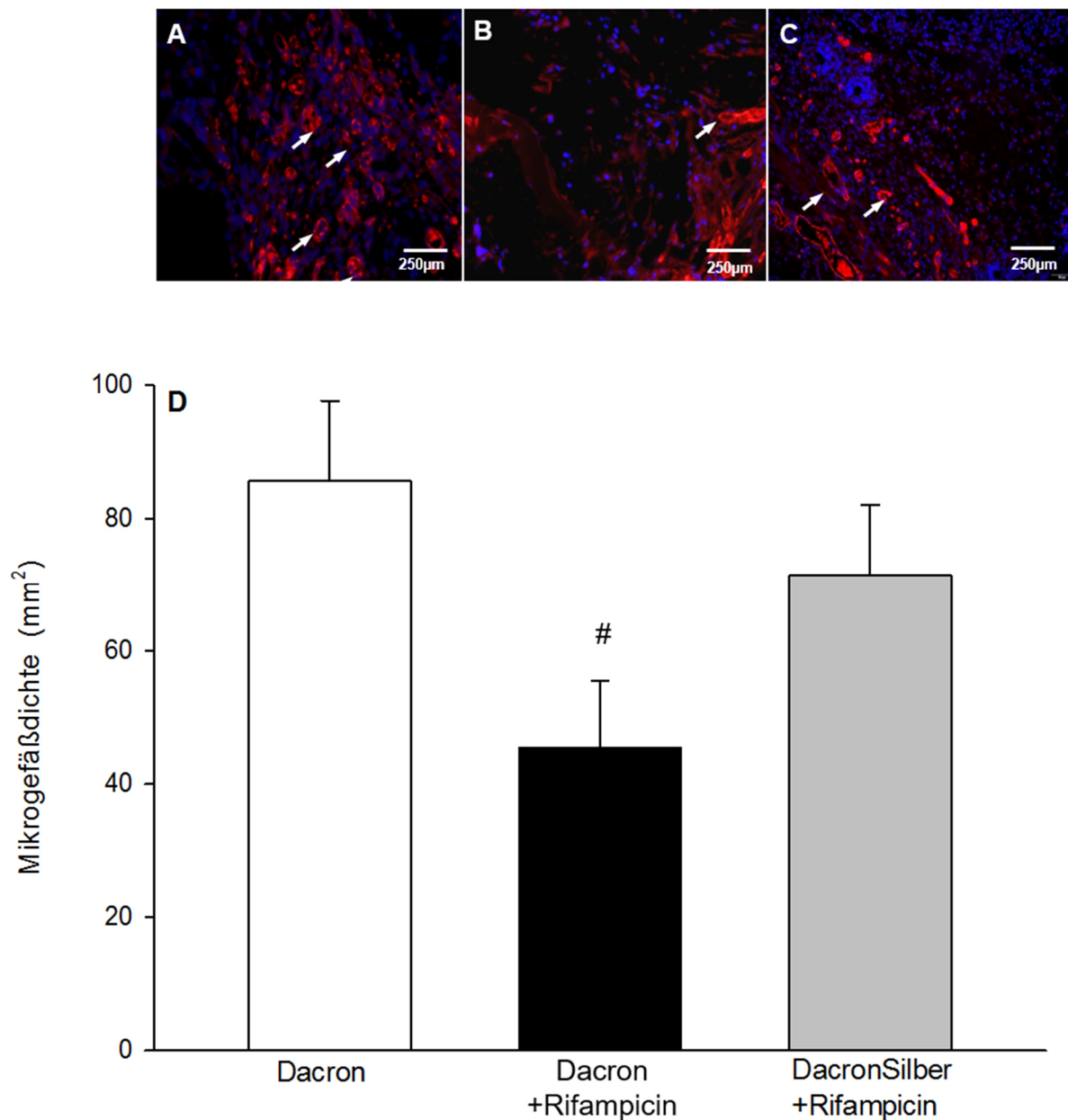
**Abbildung 11:** A, B, C zeigen IVM Aufnahmen in Blaulicht-Epi-Illumination unter Kontrastverstärkung mit 5% FITC-markiertem Dextran. Auf den Abbildungen sind periprosthetische Areale am Untersuchungstag 14 abgebildet. Weiße Pfeile: Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes mit der Bildung von Sprouts A: Dacron™, B: Dacron™ + Rifampicin, C: Dacron Silver+™ + Rifampicin D: Balkendiagramm der computergestützten Auswertung der funktionellen Kapillardichte (cm/cm<sup>2</sup>) an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, 10, 14. Weißer Balken: Dacron™, schwarzer Balken: Dacron™ + Rifampicin grauer Balken: Dacron Silver+™ + Rifampicin. Es liegt eine signifikant niedrigere funktionelle Kapillardichte in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe am Untersuchungstag 14 im Vergleich zu der Dacron™ Kontrollgruppe vor. Die Kapillardichte in der Dacron Silver+™ + Rifampicin Gruppe war verglichen mit der Dacron™ Kontrollen an allen Tagen schwächer ausgeprägt. Am Tag 14 konnten signifikant niedrigere Werte gemessen werden. Im Vergleich von Dacron Silver+™ + Rifampicin mit Dacron™ + Rifampicin konnte an den Tagen 3 und 6 eine geringere funktionelle Kapillardichte gemessen werden. Ab dem Tag 10 konnte ausgeprägtere Kapillardichten nachgewiesen werden. Am Tag 14 konnten signifikante Werte gemessen werden. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p<0,05 vs. Dacron™ + Rifampicin, Dacron Silver+™ + Rifampicin

Ergänzend zu den Ergebnissen der intravitalen Fluoreszenz Mikroskopie wurde eine immunhistochemischen Analyse der Kapillardichte durchgeführt und diese Dichte als  $\text{mm}^2$  pro Bildausschnitt ausgewertet. Hierfür wurden Gefäße mittels einer CD-31 Färbung dargestellt und untersucht.

Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Dichte von CD-31 positiven Gefäßen bei der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe im Vergleich zu den unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup> Prothesen ( $45,2 \pm 10\text{mm}^2$  gegenüber  $86 \pm 12\text{mm}^2$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 12).

Außerdem zeigte sich eine höhere aber jedoch nicht signifikante Gefäßdichte bei der Untersuchung der unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup> Prothesen gegenüber der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe ( $71 \pm 11\text{mm}^2$  gegenüber  $86 \pm 12\text{mm}^2$ ,  $p = 0,32$  Abbildung 12).

Ferner konnte eine höhere nicht signifikante Dichte an CD-31 positiven Gefäßen in der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe nachgewiesen werden, allerdings ohne den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes. ( $45,2 \pm 10\text{mm}^2$  gegenüber  $71 \pm 11\text{mm}^2$ ,  $p = 0,10$ ; Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Immunohistochemische Analyse der Neangiogenese. Darstellung im Dunkelfeldmikroskop A: Dacron™ B: Dacron™ + Rifampicin C: Dacron Silber+™ + Rifampicin. Die histologischen Schnitte wurden mit Hoechst (1:500; Sigma-Aldrich) zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD-31 zur Sichtbarmachung von Mikrogefäßen (rot) behandelt. D: Das Balkendiagramm zeigt die Dichte von Mikrogefäßen (Gefäße/mm<sup>2</sup>). Weißer Balken: Dacron™, schwarzer Balken: Dacron™ + Rifampicin grauer Balken: Dacron Silber+™ + Rifampicin. Es konnte eine signifikant niedrigere Dichte von Mikrogefäßen in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe im Vergleich zu Dacron™ Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zwischen der Gefäßdichte von der Dacron Silber+™ + Rifampicin Gruppe gab es verglichen mit der Dacron™ Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich von Dacron Silber+™ + Rifampicin mit Dacron™ + Rifampicin konnte eine höhere Dichte an Mikrogefäßen gemessen werden. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p < 0,05 vs. Dacron™ + Rifampicin, Dacron Silber+™ + Rifampicin -Implantate

## **5.2 Mikrohämodynamik**

### **5.2.1 Vergleich von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin mit Dacron™ und Dacron™ + Rifampicin**

Die Analyse der Mikrohämodynamik erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Cap-Image (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Die ausgewerteten Venolen und Kapillaren wurden in einem gewissen Abstand zum Implantat ausgewählt. Sie hatten einen Gefäßdurchmesser von 18 bis 32µm. Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in den entsprechenden Venolen konnte mittels Cap-Image bestimmt werden. Über den gesamten Zeitraum wurden Geschwindigkeiten zwischen 100- und 350µm/s über den gesamten Zeitraum gemessen. Daraus ließ sich der volumetrische Blutfluss berechnen. Dieser lag zwischen 22-164pL/s. Darüber hinaus folgte die Berechnung der Shear Rate hier konnten Werte zwischen 20-107s<sup>-1</sup> nachgewiesen werden. Zwischen den Versuchsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Rifampicin keinen wesentlichen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit von Gefäßen hat. Die Untersuchung der Mikrohämodynamik war außerdem Grundlage für die Analyse der Leukozyten-Endothel-Interaktion.



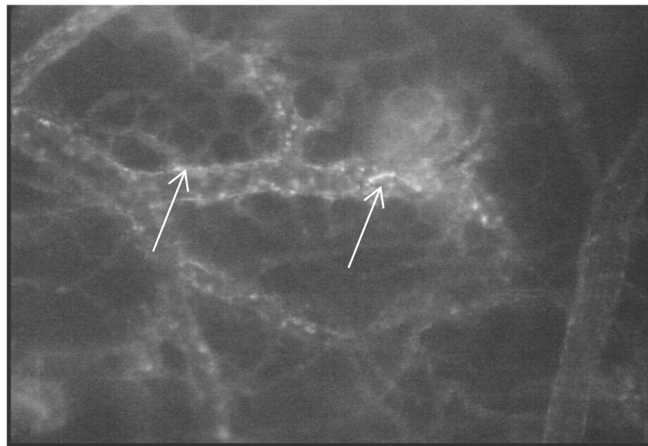
	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<b>Gefäßdurchmesser (µm)</b>					
Dacron™	23,6 ± 0,5	23,2 ± 0,6	22,6 ± 0,7	23,5 ± 0,6	23,2 ± 0,6
Dacron™ + Rifampicin	21,2 ± 0,8	21,3 ± 0,7	21,7 ± 1,0	22,1 ± 1,0	22,1 ± 0,2
Dacron Silber <sup>+™</sup> + Rifampicin	26,3 ± 0,4	24,6 ± 0,5	2,50 ± 0,5	25,2 ± 0,9	25,8 ± 1,3
<b>Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)</b>					
Dacron™	200,7 ± 23,8	268,1 ± 33,7	282,7 ± 39,7	291,4 ± 39,6	276,0 ± 42,0
Dacron™ + Rifampicin	206,4 ± 34,7	235,7 ± 19,4	259,9 ± 21,1	289,6 ± 36,2	297,5 ± 42,1
Dacron Silber <sup>+™</sup> + Rifampicin	159,4 ± 21,4	226,3 ± 30,2	221,8 ± 36,8	217,6 ± 23,2	220,7 ± 29,9
<b>Volumetrischer Blutfluß (pL/s)</b>					
Dacron™	54,2 ± 5,3	71,2 ± 10,4	69,8 ± 11,2	75,4 ± 10,6	72,8 ± 13,7
Dacron™ + Rifampicin	45,6 ± 1,9	49,8 ± 3,5	57,9 ± 7,3	57,3 ± 9,0	57,9 ± 7,3
Dacron Silber <sup>+™</sup> + Rifampicin	55,0 ± 8,5	69,95 ± 11,3	70,79 ± 11,2	71,03 ± 11,4	75,08 ± 16,1
<b>Wandsherrate (s<sup>-1</sup>)</b>					
Dacron™	70,0 ± 9,0	91,1 ± 10,2	101,4 ± 13,5	98,6 ± 13,2	95,0 ± 15,0
Dacron™ + Rifampicin	82,0 ± 11,0	89,0 ± 8,5	98,9 ± 7,9	108,8 ± 11,7	112,5 ± 16,5
Dacron Silber <sup>+™</sup> + Rifampicin	48,8 ± 5,8	71,1 ± 9,0	74,4 ± 13,0	75,0 ± 9,0	80,0 ± 13,4

**Tabelle 1:** Die Tabelle zeigt: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s), volumetrischen Blutfluss (pL/s), Wandsherrate (s<sup>-1</sup>) in postkapillären Venolen. Dacron™ (n=8), Dacron™ + Rifampicin (n=8), Dacron Silber<sup>+™</sup> + Rifampicin (n=8) an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, 10, 14. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p< 0,05 vs. Dacron™ + Rifampicin, Dacron Silber<sup>+™</sup> + Rifampicin -Implantate.

### 5.3 Leukozyten-Endothel Interaktion

#### 5.3.1 Vergleich von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin mit Dacron™ und Dacron™ + Rifampicin

Die Messung der Leukozyten-Endothel Interaktion erfolgte mit der IVM an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, 10, 14. Es wurde auf die gleichen Venolen zurückgegriffen, an denen bereits die Messung der Mikrohämodynamik erfolgt war. Die Zellen wurden in rollende- und adhärenente Leukozyten unterteilt. Durch den verwendeten Farbstoff Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) konnten Leukozyten sichtbar gemacht werden (Abbildung 13). An sämtlichen Untersuchungstagen war die Anzahl der rollenden Leukozyten in der Dacron™ Gruppe höher als in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe jedoch ohne den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes.



**Abbildung 13:** Leukozyten Endothel Interaktion unter Grünlicht-Epi-Illumination am Untersuchungstag 14. Die weißen Pfeile markieren adhärenente Leukozyten

Am Tag 14 konnte eine signifikant niedrigere Anzahl an adhärenenten Leukozyten in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Dacron™ Kontrolle nachgewiesen werden.

Bei der Messung der adhärenenten Leukozyten konnte festgestellt werden, dass eine Rifampicinbeschichtung von Dacron Silber<sup>+</sup>™ Prothesen an den Untersuchungstagen 0-10. (Abbildung 14) eine signifikant geringere Leukozyten-Endothel Interaktion hervorruft als unbeschichtete Dacron™ Prothesen.

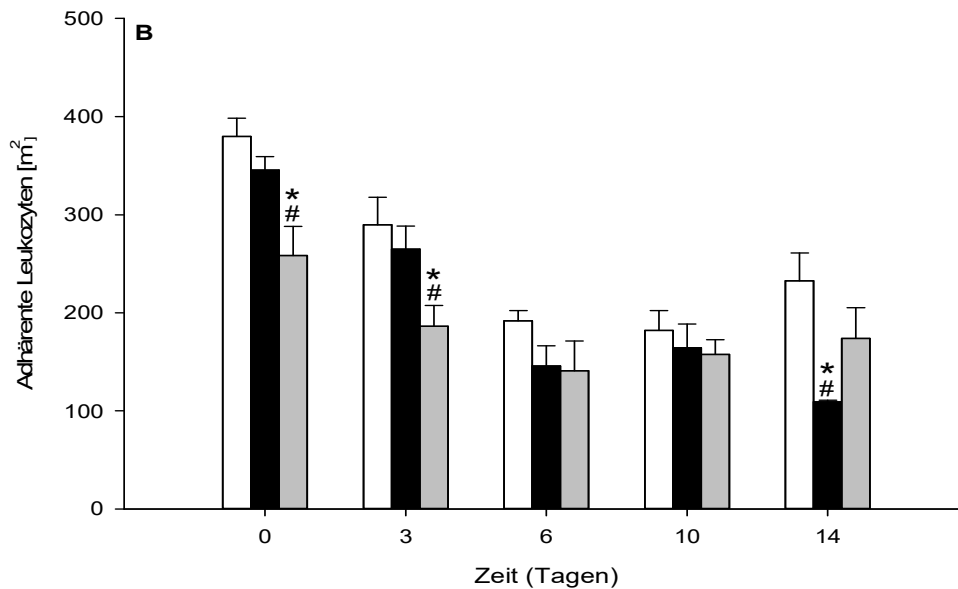
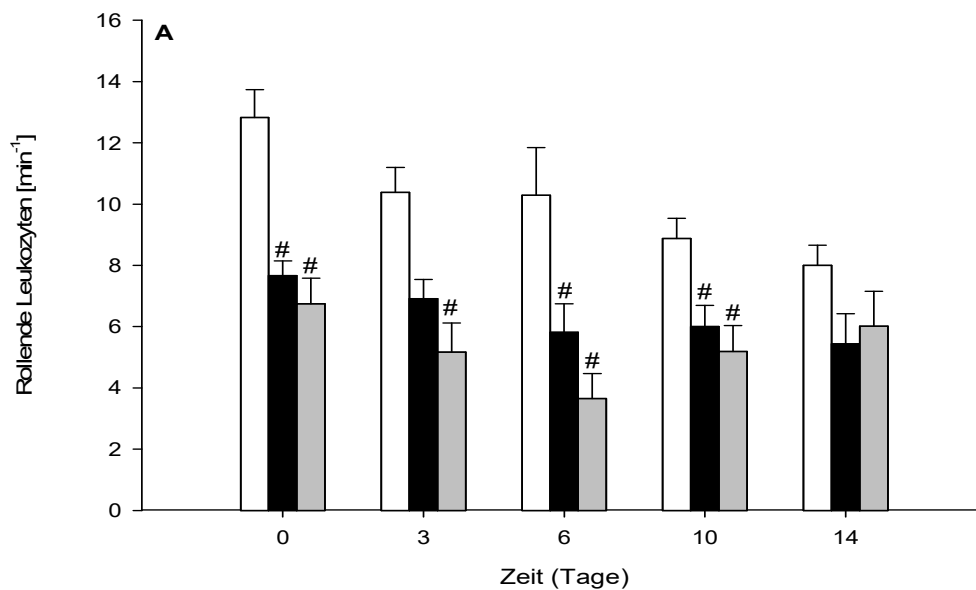
An den Untersuchungstagen 0, 3, 6 und 10 konnten bei den Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Prothesen weniger adhärenente Leukozyten gemessen werden als bei den Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Prothesen. Am Untersuchungstag 14 konnten jedoch signifikant mehr adhärenenten Leukozyten in der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe als bei in der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin nachgewiesen werden.

Bei den Messungen der rollenden Leukozyten konnte an den Tagen 0-10 eine signifikant niedrigere Anzahl in der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Dacron<sup>TM</sup> Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Am Tag 14 wurden weniger rollende Zellen in der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe gemessen ohne ein signifikantes Ergebnis.

Bei der Messung der rollenden Leukozyten konnte festgestellt werden, dass eine Rifampicinbeschichtung von Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen an den Untersuchungstagen 0-10 eine signifikant geringere Leukozyten-Endothel Interaktion hervorruft als unbeschichtete Dacron<sup>TM</sup> Prothesen. Am Tag 14 wurden weniger rollende Zellen in der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe verglichen mit der Dacron<sup>TM</sup> Kontrolle gemessen ohne ein signifikantes Ergebnis.

Im Vergleich der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe mit der Dacron Silber<sup>+TM</sup>+Rifampicin Gruppe imponieren an den Untersuchungstagen 0,3,6,10 imponierten keine signifikanten Unterschiede. Am Tag 14 wurden jedoch mehr rollende Leukozyten in der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe gemessen als bei den Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Interponaten. (Abbildung 14)

Dies deutete darauf hin, dass im Granulationsgewebe bei den unbeschichteten Dacron<sup>TM</sup>-Implantaten eine stärkere Inflammation stattgefunden hat. Die Leukozyten-Endothel Interaktion ist für die Ausbildung eines Granulationsgewebes und die Integration einer Gefäßprothese in das Gewebe wichtig (Ehrmantraut et al. 2012).



**Abbildung 14:** Ergebnisse der Messung der adhären- und rollenden Leukozyten dargestellt als Balkendiagramme. Weiße Balken: Dacron™ (Gruppe I), schwarze Balken: Dacron™ + Rifampicin (Gruppe II), grauer Balken: Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin (Gruppe III)  
 A: Anzahl der rollenden Leukozyten. B: Anzahl der adhären- und rollenden Leukozyten. Bei den rollenden Leukozyten konnte eine signifikant niedrigere Anzahl in der Gruppe II im Vergleich zur Gruppe I an den Tagen 0-10 festgestellt werden. Am Tag 14 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden. Beim Vergleich der Gruppe III mit der Gruppe I konnten signifikant weniger rollende Leukozyten in der Gruppe III nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Gruppe II mit der Gruppe III konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei den adhären- und rollenden Leukozyten konnten an den Untersuchungstagen 0 und 3 signifikant weniger Zellen in der Gruppe III im Vergleich sowohl mit der Gruppe I als auch II gemessen werden. An den Untersuchungstagen 6 und 10 konnten keine

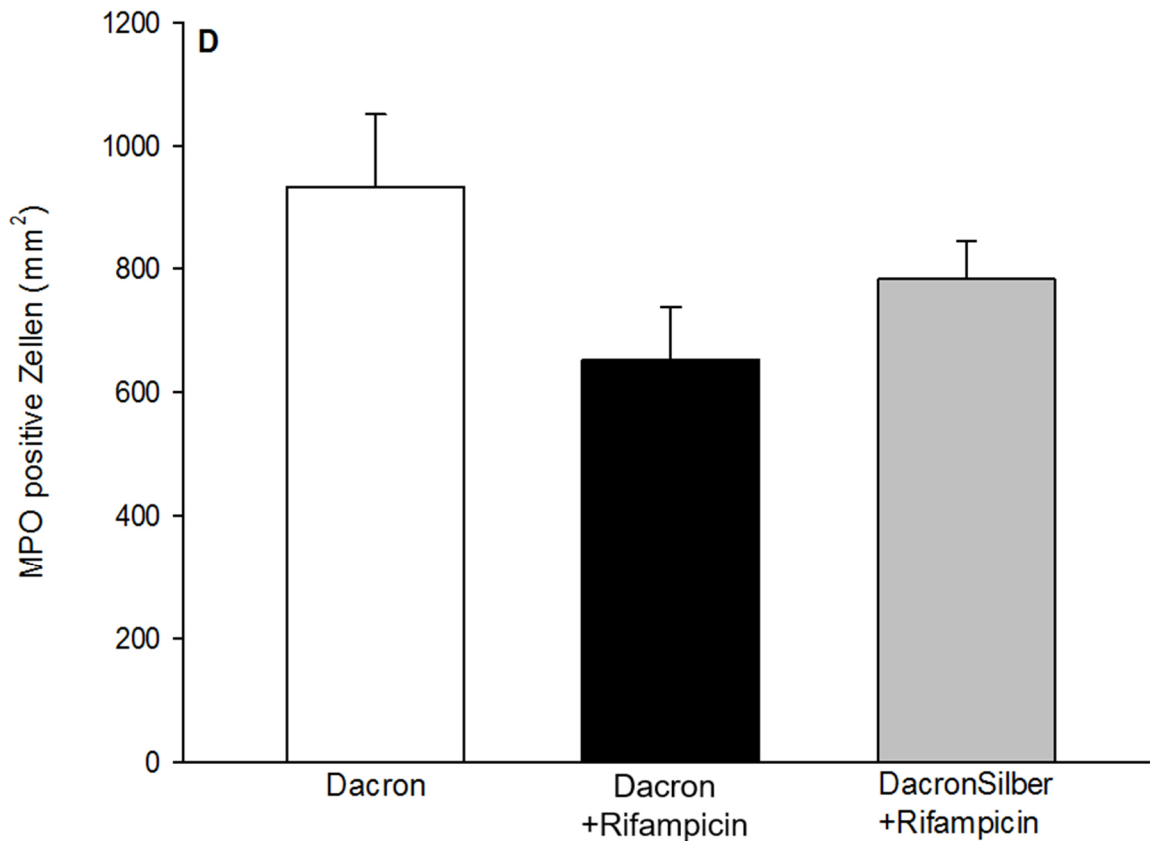
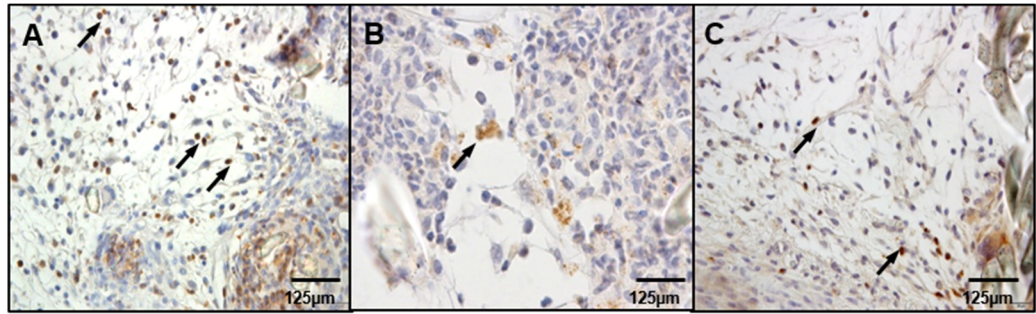
signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen erkannt werden. Am Untersuchungstag 14 imponierte eine signifikant niedrigere Anzahl pro m<sup>2</sup> in der Gruppe II im Vergleich zu den Gruppen I und II. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p< 0,05 vs. Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin-Implantate, Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin-Implantate

### **5.3.2 Immunhistochemische Analyse der Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen-Interaktion**

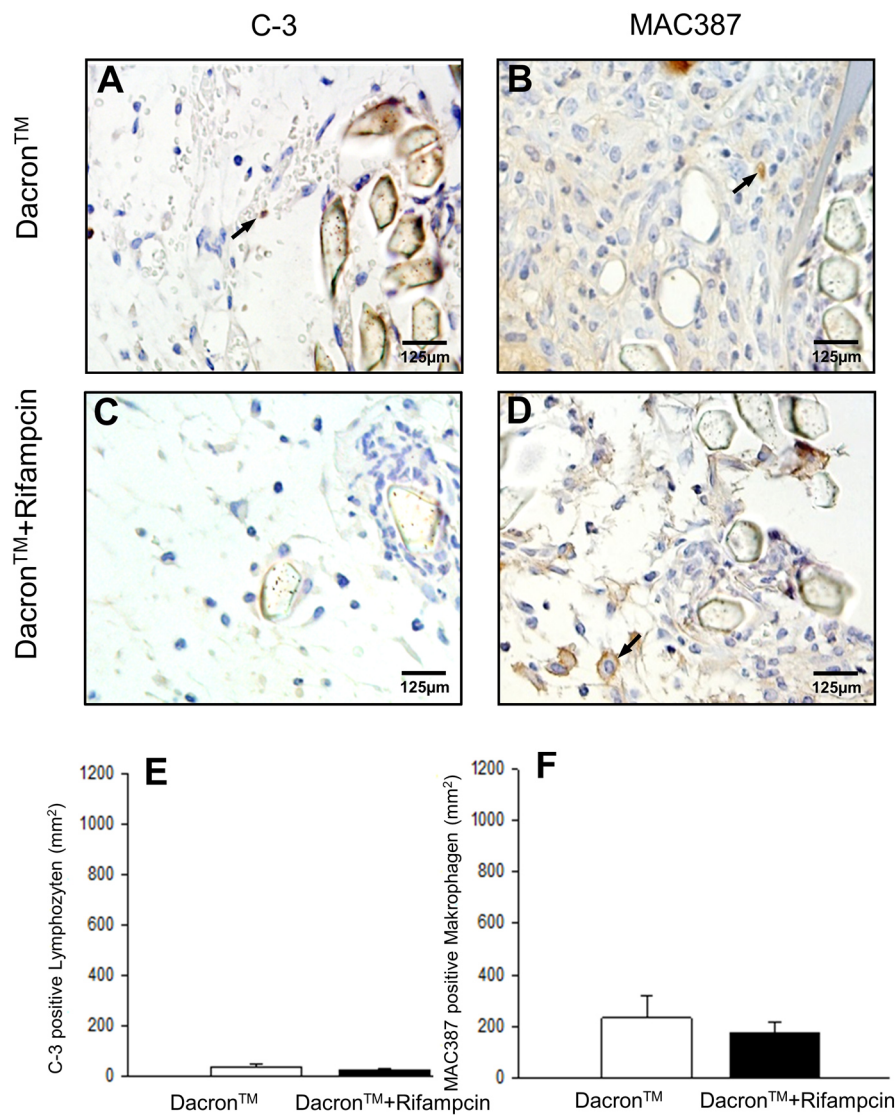
Für die immunhistochemischen Analyse der Leukozyten-Endothel Interaktion führten wir eine MPO-Färbung durch. Diese Analyse konnte, die in der IVM gemessene niedrigere Leukozyten-Endothel Interaktion in den mit Rifampicin beschichteten Gruppen untermauern.

Gegenüber der Dacron<sup>TM</sup> Kontrollgruppe konnte eine niedrigere Anzahl an MPO positiven Leukozyten in beiden Gruppen gemessen werden ( $651 \pm 86\text{mm}^{-2}$  gegenüber  $934 \pm 117\text{mm}^{-2}$ ;  $p=0,06$ ). Außerdem zeigte sich, dass die Anzahl der Leukozyten in der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe höher war, ohne den Nachweis einer Signifikants. MPO positiven Leukozyten ( $783 \pm 62\text{mm}^{-2}$  gegenüber  $651 \pm 84\text{mm}^{-2}$ ;  $p=0,12$  Abbildung 15).

Im Rahmen unserer Veröffentlichung (Moussavian et al. 2015) führten wir beim Vergleich zwischen Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin mit der Dacron<sup>TM</sup> Kontrollgruppe eine nähergehende Analyse der Inflammation durch. Hierbei zeigte sich, dass die Rifampicinbeschichtung von Gefäßprothesen zu einer niedrigeren Aktivität an C-3 positiven Lymphozyten ( $26 \pm 6$  vs.  $39 \pm 9\text{mm}^{-2}$ ;  $p=0,24$ ) sowie MAC 387 positiven Makrophagen ( $177 \pm 42$  gegenüber  $233 \pm 86\text{mm}^{-2}$ ;  $p=0,57$ ) führt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bewiesen werden. (Abbildung 16). Wir wollten mit diesen Färbungen einen Einfluss von Rifampicin auf die Aktivität von Makrophagen sowie Lymphozyten zeigen. Die Wirkung von Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin auf diese Prozesse analysierten wir nicht, mehr da uns besonders die bereits in der Literatur beschriebene antiinflammatorische Wirkung des Rifampicins interessierte.



**Abbildung 15:** Immunhistochemische Analyse der MPO positiven Leukozyten A: Dacron™, B: Dacron™ + Rifampicin C: Dacron Silber+™ + Rifampicin. D: Darstellungen der Messungen der MPO-positiven Zellen (Zellzahl/mm<sup>2</sup>), als Balkendiagramm. Weiße Balken: Dacron™, schwarze Balken: Dacron™ + Rifampicin grauer Balken: Dacron Silber+™ + Rifampicin. Es konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p<0,05 vs. Dacron™ + Rifampicin, Dacron Silber+™ + Rifampicin



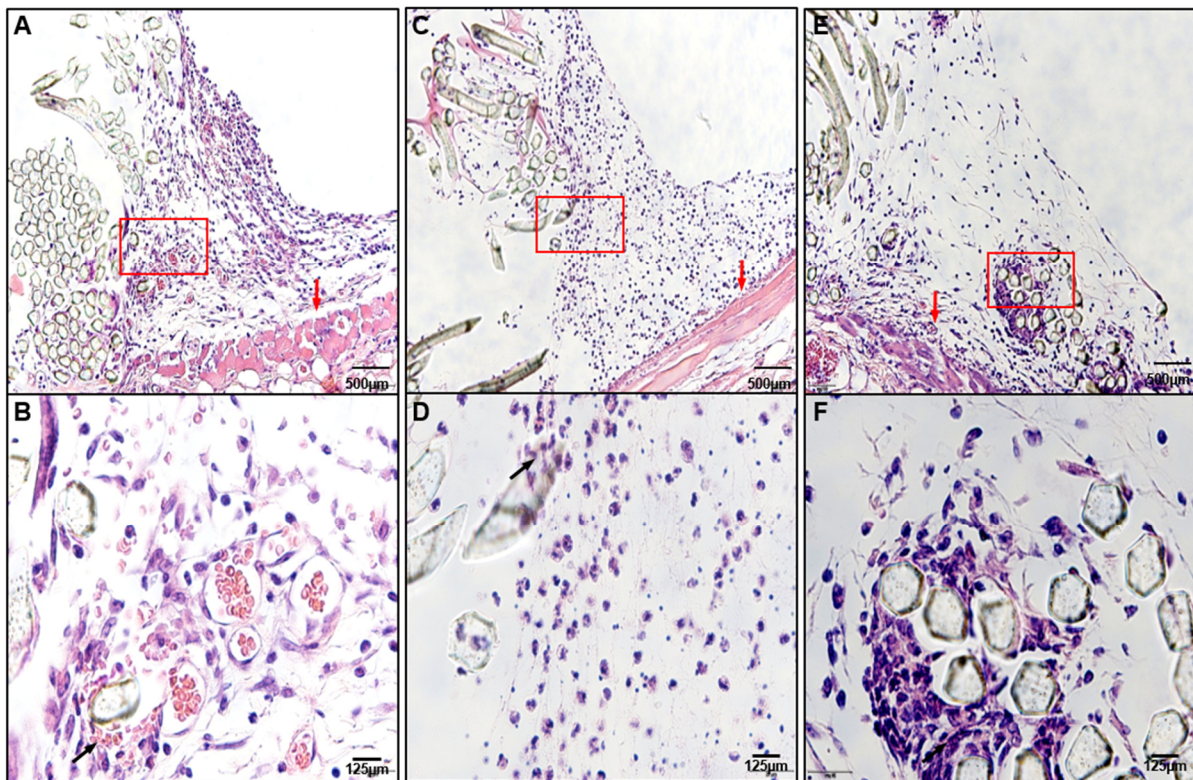
**Abbildung 16:** Immunhistochemische Analyse des Granulationsgewebes von A, B: Dacron™ C, D: Dacron™ + Rifampicin. Schwarze Pfeile: A, C: C-3 positiven T-Lymphozyten B, D: MAC387 positiven Makrophagen. E, F: Balkendiagramme zur Veranschaulichung der Auswertung der C-3 positiven Lymphozyten und MAC387 positiven Makrophagen (alles in Zellzahl/mm<sup>2</sup>) im Granulationsgebiet. Weiße Balken Dacron™ und schwarze Balken Dacron™ + Rifampicin. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p<0.05 vs. Dacron™.



#### 5.4 Inkorporation der verwendeten Prothesen

Zur Darstellung der Inkorporation von Dacron™, Dacron™ + Rifampicin und Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin führten wir histologische Untersuchungen des Rückenhautkammerngewebes durch. Wir konnten zeigen, dass alle Prothesen von neugebildetem vaskularisiertem Granulationsgewebe umgeben waren.

Wie in Kapitel 3,7 beschrieben, ist die Bildung eines Granulationsgewebes mitsamt einer Migration von Zellen in das Implantat für eine suffiziente Inkorporation einer Gefäßprothese essentiell.



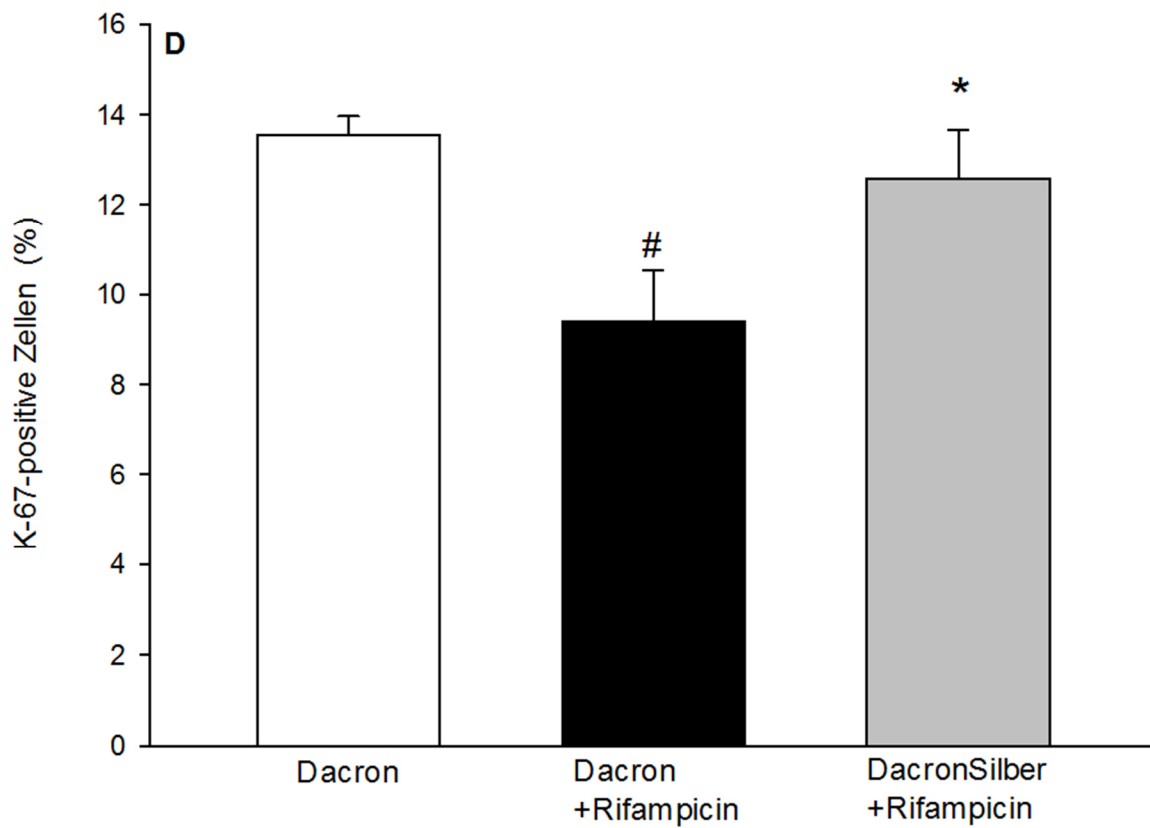
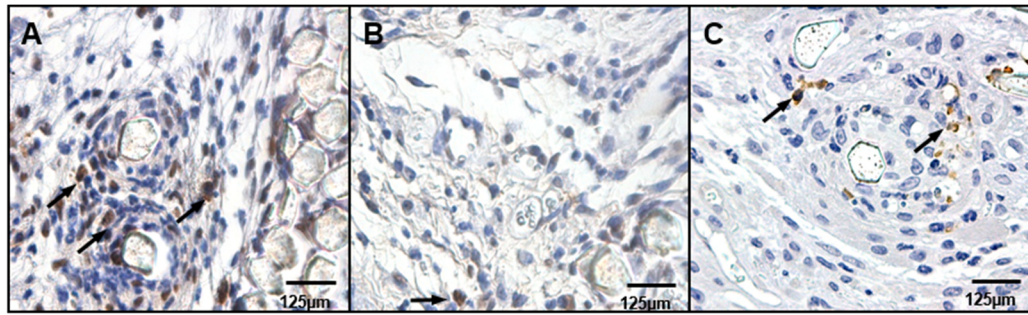
**Abbildung 17:** Die Abbildungen A-F zeigen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Querschnitte des Rückenhautkammerngewebes mit implantierter: A: Dacron™ Prothese, C: Dacron™ + Rifampicin E: Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin auf quergestreiftem Muskelgewebe 14 Tage nach Implantation (rote Pfeile) in die RHK einer C57BL/6 Maus. Eine Detailvergrößerung (B, D, F) der Grenzfläche zwischen Implantat und dem umliegenden Gewebe (A, C, E rote Rechtecke) zeigt die dichte Vaskularisierung, die Bildung von Granulationsgewebe und die Migration von vereinzelt Zellen zwischen den Dacronfasern (schwarze Pfeile) des Implantats. Die Kapillaren und neugebildeten Gefäße sind gefüllt mit zahlreichen Erythrozyten.



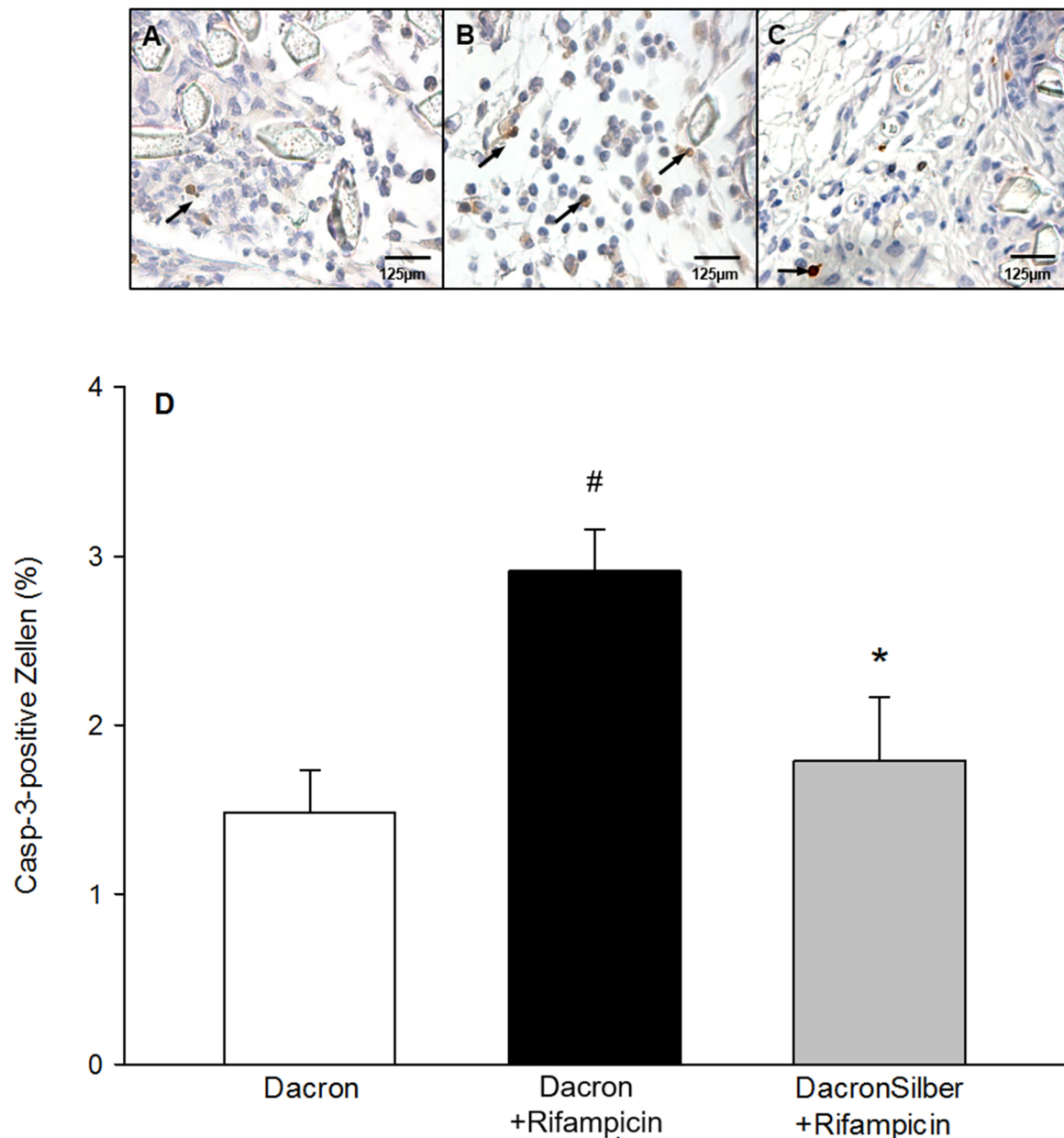
## 5.5 Zellproliferation und Apoptose:

Neben der Untersuchung der Angiogenese und der Leukozyten-Endothel Interaktion wurden auch Untersuchungen hinsichtlich der Proliferation und Apoptose im periprothetischen Granulationsgewebe durchgeführt. Zum Nachweis proliferierender Zellen wurden KI-67 positive Zellen immunhistochemisch angefärbt. Die KI-67 positiven Zellen wurden mit der Gesamtzellzahl im Bildausschnitt ins Verhältnis gesetzt und in Prozent angegeben. Hierbei konnten in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe signifikant weniger proliferierende Zellen im periprothetischen Granulationsgewebe nachgewiesen werden als in der Dacron™ Kontrollgruppe ( $9,4 \pm 1,1\%$  gegenüber  $13,6 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 18) sowie der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Gruppe ( $9,4 \pm 1,1\%$ , gegenüber  $12,6 \pm 1,1\%$   $p < 0,05$ ; Abbildung 17). Im Vergleich von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen mit der Dacron™ Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. ( $13,6 \pm 0,7\%$  gegenüber  $12,6 \pm 1,1\%$ ,  $p = 0,93$  Abbildung 18).

Für den Nachweis von apoptotischen Zellen wurden immunhistochemische Caspase-3 positive Zellen beurteilt. Diese Zellen, die sich in der Apoptose befanden, wurden mit der Gesamtzellzahl im Bildausschnitt ins Verhältnis gesetzt und in Prozent angegeben. Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an Caspase-3 positiven Zellen im periprothetischen Gewebe in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden ( $2,9 \pm 0,2\%$  gegenüber  $1,5 \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,05$  Abbildung 19). Die Anzahl der apoptotischen Caspase-3 positiven Zellen im periprothetischen Gewebe war signifikant höher in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe verglichen mit der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Gruppe. ( $2,9 \pm 0,2\%$  gegenüber  $1,8 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 19) Im Vergleich dazu gab es keine signifikanten Unterschiede der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen im Vergleich zur Dacron™ Kontrollgruppe. ( $1,8 \pm 0,4\%$  gegenüber  $1,5 \pm 0,3\%$ ,  $p = 0,18$ ; Abbildung 19).



**Abbildung 18:** Immunhistochemische Analyse der Proliferation mittels KI-67 Färbung im periprothetischen Granulationsgewebes. Proliferierende Zellen (schwarze Pfeile). A: Dacron<sup>TM</sup>, B: Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin. C: Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin D: Balkendiagramm mit der Auswertung der KI-67-positiven Zellen (%). Weiße Balken: Dacron<sup>TM</sup>, schwarze Balken: Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin grauer Balken: Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin. Es konnten signifikant weniger proliferierende Zellen in der Dacron<sup>TM</sup>+ Rifampicin Gruppe nachgewiesen werden, als in der Dacron<sup>TM</sup> Gruppe sowie der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe. Zwischen den Dacron<sup>TM</sup> und den Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*p< 0,05 vs. Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin, Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Implantate.



**Abbildung 19:** Immunhistochemische Analyse des Granulationsgewebes am Randsaum A: Dacron<sup>TM</sup> B: Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin, C: Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin. Die Schnitte wurden zur Visualisierung von apoptotischen Zellen, mit Antikörper gegen Caspase-3 positive Zellen behandelt (schwarze Pfeile). D: Balkendiagramm zur Darstellung von Caspase-3-positiven Zellen (%) im Granulationsgebiet. Weiße Balken: Dacron<sup>TM</sup>, schwarze Balken: Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin, graue Balken: Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin. Es konnten signifikant mehr apoptotische Zellen in der Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Gruppe als in der Dacron<sup>TM</sup> Kontrollgruppe sowie der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Gruppe nachgewiesen werden. Zwischen den Dacron<sup>TM</sup> und den Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \* $p < 0,05$  vs. Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin, Dacron<sup>TM</sup>+ Rifampicin Implantate

## 6. Diskussion

### 6.1 Das Rückenhautkammermodell der Maus

Für unsere tierexperimentelle Studie über die Biokompatibilität von Gefäßprothesen wählten wir das Rückenhautkammermodell der Maus. Dieses Modell ist als Methode in der Mikrozirkulationsforschung etabliert. Es eignet sich besonders gut um das in-vivo-Verhalten von Gefäßprothesen zu analysieren. Menger, Hammersen, Messmer. 1992 untersuchten Gefäßprothesen am Rückenhautkammermodell des syrischen Goldhamsters. Jeanmonod et al. 2013, 2014 analysierten die Biokompatibilität von mit Silberazetat beschichteten Dacron Silber<sup>+</sup>™ und mit elementarem Silber beschichteten Dacron Silber<sup>e</sup>™ Prothesen. Das Rückenhautkammermodell gab uns die Möglichkeit die Integration der Gefäßprothesen als dynamischen Prozess zu verstehen. Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, Gewebereaktionen in kurzen Abständen sehr detailliert untersuchen zu können. So war eine die Messung der Neoangiogenese und der frühen Entzündungsreaktion in-vivo und nicht invasiv möglich (Laschke, Vollmer, Menger. 2011). Bei einer rein histologischen Untersuchung von Gewebe hätten Tiere an den einzelnen Untersuchungstagen geopfert werden müssen, um eine ähnliche Analyse des Verlaufs durchführen zu können.

Die verwendeten Rückenhautkammern waren aus einer Titanlegierung gefertigt. Titan wird besonders in der Orthopädie und der Kieferchirurgie verwendet und hat einen bekannten Einfluss auf zelluläre Prozesse darunter auch auf Entzündungsprozesse (Hotchkiss et al. 2016). In den ersten 120 Minuten nach Präparation der Kammern kann es auch beim Rückenhautkammermodell durch den verwendeten Titanrahmen zu einem kurzfristigen Anstieg der Leukozyten-Endothel Interaktion kommen (Rücker et al. 2006). Dies führt im Verlauf jedoch zu keinen weiteren Veränderungen der Leukozyten-Anzahl oder des Gefäßdurchmessers (Kraft et al. 2000). Einen Einfluss durch die Titanrahmen auf die Angiogenese konnte ausgeschlossen werden (Kraft et al. 2001). Um selbst diese minimalen Störfaktoren auf die Experimente zu vermeiden, erfolgte die Implantation der Gefäßprothesen erst 48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammern. Außerdem erfolgte die Implantation der Prothesen zu diesem Zeitpunkt um eine adäquate Erholung der Tiere vom Operationstrauma zu garantieren.

Die in unserer Studie verwendeten Gefäßprothesen wurden mit der äußeren Prothesenseite in Richtung des Gewebes in die Rückenhautkammer implantiert. Auf diese Orientierung wurde sehr viel Wert gelegt, da es wichtig war die Beschichtungen der Prothesen unmittelbar mit dem Gewebe in Kontakt zu bringen. Ebenfalls entspricht diese Lage am ehesten der Situation nach Gefäßersatz im menschlichen Organismus. Insofern war die Beurteilung dieser Prothesenseite auch von klinischem Interesse. Diese Fläche war mittels der intravitale Fluoreszenzmikroskopie jedoch nicht beurteilbar. Die Untersuchung dieses subprothetischen Gewebes war jedoch mit histologischen Gewebeproben möglich. Am Tag 14 nach Implantation sah das Versuchsprotokoll eine Explantation der Prothesen mit umliegendem Gewebe vor. Diese Gewebeproben konnten daraufhin immunhistochemisch angefärbt und analysiert werden.

Die Versuchsdauer des Rückenhautkammermodells an der Maus ist auf zwei bis maximal drei Wochen begrenzt. Die Rückenhaut der Tiere verliert während dieser Zeit rasch an Elastizität. In Folge dessen kann es zu einem Abknicken der Kammer kommen mit Perfusionsstörungen im präparierten Gewebe (Laschke, Vollmer, Menger. 2011). Für Zeiträume länger als drei Wochen ist das Modell also ungeeignet.

## **6.2 Vergleich von Dacron™ + Rifampicin mit Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin und Dacron™**

Die Implantation einer alloplastischen Gefäßprothese geht mit höherer Wahrscheinlichkeit eines Gefäßinfekts einher als die Implantation einer autologen Vene. Das Risiko einer Gefäßprotheseninfektion liegt bei 0,5-5% in 24 Monaten (Jensen & Kimose, 1985; Chang et al. 2003; Leroy et al. 2012). Gefäßprotheseninfektionen sind schwere Komplikation in der Gefäßchirurgie und ein großer Risikofaktor für postoperative Morbidität und Mortalität. Zur Therapie eines solchen Infekts, aber auch zur prophylaktischen Anwendung, werden Rohrprothesen seit Jahren mit antibakteriellen Agenzien beschichtet. Bisher wird jedoch von keiner Leitlinie eindeutig thematisiert, welche Beschichtung in welcher speziellen Situation und bei welchem Patienten die zu bevorzugende beziehungsweise die effektivste ist (Stewart, Eyers, Earnshaw. 2006; Hernández-Richter et al. 2003). Bei den antibiotischen Beschichtungen ist eine

Beschichtung mit Rifampicin am weitesten verbreitet (Goëau-Brissonnière et al. 1991; Malassiney et al. 1996). Diese Methode untersuchten wir in unserer Studie.

Neben Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin haben sich Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen im klinischen Alltag für die Behandlung einer Gefäßprotheseninfektion etabliert. Aufgrund der steigenden Inzidenz an Kontaminationen mit multiresistenten Keime ist jedoch eine Sanierung dieser Infektionen durch diese beiden Oberflächenbeschichtungen nicht absolut gewährleistet (Schmacht et al. 2005; Lew, Moore. 2011). Aus diesem Grund werden seit Jahren alternative antibakterielle Beschichtungen diskutiert. (Greco & Harvey, 1982; Aboshady et al. 2015). Die meisten dieser antibakteriellen Beschichtungen haben aber bisher keine klinische Zulassung erhalten. Anderes gilt für die Kombination aus Rifampicinbeschichteten Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen. Diese Doppelbeschichtung ist im klinischen Gebrauch nicht annähernd so verbreitet wie die bereits genannten Methoden. Es wird jedoch von einem besseren Schutz gegenüber MRSA ausgegangen, den Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin und Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen alleine nicht gewährleisten können (Hardman et al. 2004; Schmacht et al. 2005). Die Biokompatibilität von Dacron Silber<sup>+TM</sup> im Vergleich zu Dacron<sup>TM</sup> analysierten bereits Jeanmonod et al. 2013. Sie stellten fest, dass Dacron Silber<sup>+TM</sup> im Vergleich zu Dacron<sup>TM</sup> Prothesen eine signifikant ausgeprägtere Neoangiogenese und damit verbunden eine bessere Gewebeintegration aufwiesen. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Studie, war die Untersuchung der Kombination von Rifampicinbeschichteten Dacron Silber<sup>+TM</sup> für uns von besonderem Interesse.

Die Beschichtung einer Dacron<sup>TM</sup> respektive einer Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothese mit Rifampicin dauert nur 15 Minuten und ist somit intraoperativ gut umsetzbar (Gahtan et al. 1995; Coggia et al. 2001). Lachapelle, Graham, Symes. 1994 und Lovering et al. 1996 beschrieben, dass die Rifampicinkonzentration auf der Prothese und im periprothetischen Blutstrom sehr schnell sinkt. Lachapelle zeigten, dass die Konzentration bereits nach 72 Stunden unter die Nachweisgrenze gefallen ist (Abbildung 2 und 5). Es ist fraglich, ob ein so kurzes therapeutisches Fenster ausreicht, um eine Gefäßprotheseninfektion wirklich suffizient zu verhindern oder zu behandeln. Im Gegensatz dazu konnten wir in unserer Studie nachweisen, dass die Anti-angiogene, Anti-inflammative, Nekrose-fördernde und Proliferations-inhibierende Wirkung von Rifampicin länger als 72 Stunden anhält. Trotz des bekannten schnellen Konzentrationsabfalls gibt es Kliniken die Gefäßprothesen immer noch routinemäßig mit Rifampicin

beschichten. Braithwaite et al. 1998 führten eine prospektiv randomisierte Studie über den sehr verbreiteten routinemäßigen, prophylaktischen Einsatz von Dacron™ + Rifampicin durch. Es wurden randomisiert 257 Patienten mit einer Dacron™ + Rifampicin oder einer unbeschichtete Dacron™ Rohrprothese bei einem extraanatomischen Bypassverfahren versorgt. In einem zweijährigen Follow Up konnten keine signifikanten Unterschiede der Gefäßprotheseninfektionsrate bei den behandelten Patienten festgestellt werden. Ein Einsatz von Rifampicin in besonderen klinischen Situationen gilt weiterhin als Mittel der Wahl und ist nach wie vor Teil der Leitlinien der DGG. Jedoch sollte gerade im Hinblick auf einen routinemäßigen Einsatz von Dacron™ + Rifampicin darauf geachtet werden, dass Rifampicin neben der antibakteriellen Wirkung auch einen Einfluss auf den menschlichen Organismus hat. Viele Studien zeigten bereits sehr viele verschiedene Wechselwirkungen von Rifampicin auf Prozesse im Empfängerorganismus. So besteht eine bestätigte toxische Wirkung von Rifampicin auf humane Zellen und auf die Osteoblastenaktivität (Rathbone et al. 2011). In der speziellen gefäßchirurgischen Anwendung sollte der Einfluss von Rifampicin auf die Inkorporation von Gefäßprothesen in das umliegende Gewebe beachtet werden. Wir konnten in unserer Studie zum ersten Mal eine Hemmung der Angiogenese und Inflammation in den ersten 14 Tagen nach Implantation einer Dacron™+ Rifampicin oder einer Dacron Silber<sup>+</sup>™ Prothese im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Die in unserer Arbeit nachgewiesene Anti-angiogene Wirkung von Rifampicin auf das umliegende Gewebe wurde bereits in anderen Zusammenhängen als ähnlich signifikant beschrieben. In der Ophthalmologie wurde das Anti-angiogene Potential von Rifampicin unabhängig von seiner antibakteriellen Wirkung, bereits für Behandlungsmöglichkeiten erkannt. Rifampicin wurde zur erfolgreichen Behandlung einer durch Hypoxie induzierten Neovaskularisation in der Retina im Tierversuch eingesetzt (Chikaraishi et al. 2008).

Eine signifikante Hemmung der endothelialen Proliferation, der Migration und der Entstehung von Gefäßnetzwerken in vitro konnten Chikaraishi et al. 2008 feststellen. Eine angiogenesehemmende Wirkung durch Rifampicin wurde auch im Zusammenhang auf die sehr rasche Neovaskularisation von Tumorzellen untersucht. Die Hemmung der Neovaskularisation und somit eine Verlangsamung der Progression eines durch Hepatitis C induzierten Hepatozellulären Karzinoms beschrieben Shichiri et al.. 2009 und Shichiri, Tanaka. 2010. Wie genau die Rifampicin auf die Angiogenese wirkt, wird momentan kontrovers diskutiert. Am wahrscheinlichsten ist eine Wirkung

auf die Regulation von angiogenese-abhängige Genen. Insbesondere soll so der Vascular endothelial growth factor (VEGF) gehemmt werden (Shichiri, Tanaka. 2010). Außerdem wurde durch Shirchiri ein Einfluss von Rifampicin auf Gene, die mit Wachstum, Migration und Proliferation assoziiert sind diskutiert. Hierbei scheint eine Hemmung von Integrin- $\alpha_v$ , Integrin- $\beta_3$  und c-Myc auf der mRNA von besonders elementarer Bedeutung zu sein (Shichiri et al. 2009). Die Hemmung der Angiogenese durch Rifampicin soll ähnlich stark sein, wie die Hemmung des Angiogenesehemmers Endostatin (Shichiri, Hirata. 2001). Eine ausreichende Angiogenese in der frühen Phase ist für die Ausbildung einer Gefäßprothese jedoch elementar wichtig. In der frühen Phase ist die Ausbildung eines suffizienten Granulationsgewebes elementar. Ein suffizientes Granulationsgewebe schützt außerdem vor Infektionen. Langfristig ist eine adäquate Heilung mit der Ausbildung einer Neointima wesentlich (Menger et al. 1990; Müller, Dasbach. 1994). Unsere Ergebnisse beweisen, dass Rifampicin diese Prozesse durch eine signifikant schwächere Angiogenese hemmt. Insbesondere scheint es widersprüchlich, den physiologischen Infektionsschutz in Form eines suffizienten Granulationsgewebes durch den Einsatz von Rifampicin zu verschlechtern, um dann die Gefäßprothesen mit einer antibakteriellen synthetischen Lösung (Rifampicin) zu beschichten, die auch noch einen negativen Einfluss auf einige zelluläre Prozesse hat.

Beim Vergleich von Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin mit Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin zeigten unsere Untersuchungen, dass an den Untersuchungstagen 3 und 6 die Werte der funktionellen Kapillardichte beinahe identisch waren. Interessanterweise konnten wir in diesem Zusammenhang feststellen, dass es am Untersuchungstag 10 zu einer stärkeren und am Tag 14 sogar zu einer signifikant stärkeren Neoangiogenese der Dacron Silber<sup>+TM</sup> + Rifampicin Prothesen im Vergleich mit den Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Prothesen kam. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es zwischen Silberionen und Rifampicin zu einer Wechselwirkung kommt. Um diese Wechselwirkungen besser nachvollziehen zu können, sollten wir uns die Dynamik der Silber- beziehungsweise Rifampicinabgabe an das Gewebe vor Augen führen. Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen geben über 30 Tage kontinuierlich Silberionen an das Gewebe ab (Ricco, Group. 2006). Die Rifampicinabgabe von einer Dacron<sup>TM</sup> Prothese ist jedoch bereits nach wenigen Tagen abgeschlossen und Rifampicin auch periprothetischen Gewebe nicht mehr nachweisbar (Lachapelle, Graham, Symes. 1994). Nach der Abgabe der Silberionen- beziehungsweise des Rifampicins müssen die Prothese wie ungeschützte



Dacron™ Interponate angesehen werden. Diese Abgabepprofile des Silberazetats beziehungsweise des Rifampicins könnte die Dynamik der Neoangiogenese im späten Verlauf unseres Versuchs erklären.

Einen proangiogenen Effekt durch Silbernanopartikel konnte bereits in vivo und in vitro nachgewiesen werde (Kang et al. 2011). Obwohl sich Kangs Studie mit der angiogenese-fördernden Wirkung von Silbernanopartikel im Tiermodell befasste, ist eine Übertragung dieser Wirkung auf das in unserer Studie verwendete Silberacetat grundsätzlich möglich. Silbernanopartikel geben genau wie Silberazetat von ihrer Oberfläche Silberionen ab und unter in-vivo-Bedingungen sollte sich ein chemisches Gleichgewicht zwischen elementarem und ionisiertem Silber einstellen. (Wijnhoven et al. 2009). Der proangiogene Effekt durch Silbernanopartikel (Kang et al. 2011) und die signifikante Hemmung der Angiogenese durch Rifampicin (Moussavian et al. 2015) könnte den Schluss nahelegen, dass sich der positive Effekt des Silbers und der negative Effekt des Rifampicin auf der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin neutralisieren. Dies könnte die schwächer ausgeprägte Neoangiogenese im Vergleich mit der Dacron™ Kontrollgruppe erklären. Diese Schlussfolgerung lässt jedoch außer Acht, dass bereits Untersuchungen zur Neoangiogenese von Dacron Silber<sup>+</sup>™ im Vergleich mit Dacron™ durchgeführt wurden (Jeanmonod et al. 2013, 2014). Jeanmonod et al. verwendeten für ihre Studie ein Rückenhautkammermodell der Maus. Sie untersuchten die Neoangiogenese ebenfalls mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Sie konnten eine signifikant ausgeprägtere Neoangiogenese in der Dacron Silber<sup>+</sup>™ Gruppe verglichen mit der Dacron™ Kontrollgruppe belegen. An den Untersuchungstagen 10 und 14 wurde eine sehr ausgeprägte Neoangiogenese in der Dacron Silber<sup>+</sup>™ Gruppe gemessen. Die funktionelle Kapillardichte lag an diesen Untersuchungstagen bei 150-200 cm/cm<sup>2</sup> (Jeanmonod et al. 2013). Für Dacron™ + Rifampicin konnten wir an den Untersuchungstagen 10 und 14 Werte der funktionellen Kapillardichte zwischen 60-80 cm/cm<sup>2</sup> erheben (Abbildung 11). Wenn es sich also um eine reine Nivellierung der Wirkungen von Silber und Rifampicin handeln würde, müssten die Werte der funktionellen Kapillarwirkung von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin zwischen den von Jeanmonod et al. gemessenen Werten für Dacron Silber<sup>+</sup>™ und denen von Dacron™ + Rifampicin liegen. Die zu erwartende funktionelle Kapillardichte von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin (Abbildung 11) müsste also bei ungefähr 120 cm/cm<sup>2</sup> liegen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Wir konnten Werte von 70-95 cm/cm<sup>2</sup> messen. Dies legt den Schluss nahe dass es zu Wechselwirkungen

zwischen Silber und Rifampicin kommen muss. Kang et al. konnte in seiner Studie bestätigen, dass der proangiogene Effekt der Silbernanopartikel durch die Freisetzung von VEGF getriggert wird. Rifampicin hingegen ist einer der stärksten bekannten VEGF Hemmer (Shichiri et al. 2009; Shichiri, Tanaka. 2010). Wie stark die VEGF fördernde- Wirkung von Silber und die VEGF hemmende von Rifampicin sind, konnten wir in unserem Versuch nicht quantifizieren, dies wäre jedoch für einen Folgeversuch interessant. Die Tatsache, dass es zu einer verstärkten Neoangiogenese in der Dacron Silber<sup>+</sup>TM + Rifampicin Gruppe im späteren Verlauf des Versuchs kam, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Silber nach dem Abfall der Konzentration von Rifampicin im periprothetischen Gewebe den antiangiogenen Einfluss von Rifampicin kompensieren kann.

Neben der Analyse der Angiogenese erfassten wir in unserer Studie die Anzahl der rollenden und adhärenen Leukozyten in Venolen des periprothetischen Gewebes. Fulminante Infektionen in Rückenhautkammern gehen mit einem massiven Anstieg an rollenden-  $>30\text{min}^{-1}$  und adhärenen Leukozyten  $>700\text{mm}^{-1}$  einher (Rücker et al. 2006). Die in unserer Studie gemessenen Werte für rollende und adhärenen Leukozyten waren hoch signifikant niedriger. Dies spricht dafür, dass die verwendeten Gefäßprothesen keine starke Entzündungsreaktion, sondern eher eine unspezifische Fremdkörperreaktion induzieren. Ferner sprechen die niedrigen Werte dafür, dass alle verwendeten Prothesen als biokompatibel eingestuft werden können (Abbildung 14). In unseren Experimenten konnte eine signifikant niedrigere leukozytäre Entzündungsreaktion auf Dacron Silber<sup>+</sup>TM + Rifampicin und Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Prothesen verglichen mit den Dacron<sup>TM</sup> Kontrollprothesen festgestellt werden. In der histologischen Auswertung der MPO-positiven Zellen, CD3-positiven Lymphozyten und MAC387-positiven Makrophagen konnte ein Trend zu einer reduzierten Entzündungsreaktion auf die Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Interponate erfasst werden. Man vermutet, dass Rifampicin einen Einfluss auf das Immunsystem hat (Fridman, Lazareva. 1983). Dies erklärt eine Hemmung der Entzündungsreaktion. Die Immun-depressive Wirkung von Rifampicin entsteht durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Prozessen. Fridman und Lazareva beschrieben eine hemmende Wirkung von Rifampicin auf das reticuloendotheliale System. Ein weiterer Faktor der Immun-Depression ist, dass Rifampicin zu einer Störung der chemotaktischen Zellkommunikation führen kann. Ebenfalls kann dies zu einer fehlerhaften Antikörperproduktion von Plasmazellen führen (Van Vlem et al. 1996). Ferner ist eine immunmodulatorische Wirkung von

Rifampicin bekannt. Rifampicin blockiert auf polymorphonukleären Leukozyten die Interaktion mit den Toll like Rezeptoren 2, 4 und dem Faktor CD14 (Mu et al. 2013). Durch diese Interaktionen werden Entzündungsreaktionen induziert die den Organismus vor Kontaminationen mit bakteriellen Erregern schützen würde. Eine weitere Wechselwirkung von Rifampicin auf das Immunsystem ist die Hemmung von Zytokinen und Mediatoren wie den Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und interleukin 6 (IL-6) (Mu et al. 2013). Unbeschichtetes Dacron<sup>TM</sup> hingegen führt zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6 und TNF- $\alpha$  und führt somit zu einer verstärkten Entzündungsreaktion (Swartbol et al. 1996; Pärsson et al. 1997). Dies könnte auch eine Erklärung für die von uns gemessene niedrigere leukozytäre Entzündungsreaktion auf Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Prothesen im Gewebe der Kammern sein. Einen signifikanten Unterschied konnten wir im Hinblick auf die Inflammation jedoch nicht nachweisen. Hier könnte man spekulieren, dass sich bei der Verwendung von Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin die Induktion einer Entzündungsreaktion durch Dacron<sup>TM</sup> und die immundepressive Wirkung durch Rifampicin bis zu einem gewissen Grad aufheben. Jedoch Rifampicin letztendlich stärker hemmend auf die Inflammation auswirkt als Dacron<sup>TM</sup> die selbige triggert.

Die Rifampicinbeschichtung von Dacron Silber<sup>+TM</sup> Prothesen führte Initial zu einer ähnlich schwach ausgeprägten Entzündungsreaktion wie die Rifampicinbeschichtung eines Dacron<sup>TM</sup> Interponats. Erst am Untersuchungstag 14 kam es zu einem Anstieg der rollenden- und adhärenen Leukozyten was wieder durch den Abfall der Konzentration des Rifampicins herrühren könnte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Dacron Silber<sup>+TM</sup> keine signifikante Entzündungsreaktion hervorruft und das die Kombination mit dem immundepressiven Rifampicin zu einer signifikant niedrigeren Entzündungsreaktion führt als bei den Dacron<sup>TM</sup> Kontrollen. Lochter et al 2011 beschrieben zwar, dass Silberionen, die von Oberflächen abgegeben werden eine proinflammatorische Reaktion und Apoptose in Makrophagen hervorrufen, jedoch konnte dies bereits von Wong et al. 2009 als auch von Jeanmonod et al 2013, 2014 nicht bestätigt werden. Die von uns verwendete Kombinationsbeschichtung führte zu keiner gesteigerten Entzündungsreaktion.

Ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten Entzündungsreaktion und Neoangiogenese ist bereits im Rückenhautkammer Modell (Rücker et al. 2006) und aus Untersuchungen über das Tumorstadium beschrieben und gilt als bewiesen (Goede

et al. 1998; Preverte et al. 2015). Insbesondere neutrophile Granulozyten können, im Rahmen einer Fremdkörperreaktion zu einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren führen. Hier ist insbesondere VEGF aufzuführen (Shaw et al. 2003). Rifampicin hemmt eben diesen Wachstumsfaktor ebenso effektiv wie Endostatin (Shichiri, Tanaka. 2010). Dies könnte die signifikant niedrigeren adhären- und rollenden Leukozyten der mit Rifampicin behandelten Prothesen im Vergleich mit den unbeschichteten Dacron™ Prothesen erklären und außerdem den Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktion und Neoangiogenese unterstreichen. Diese These konnten wir durch unsere Ergebnisse untermauern.

Zusammengefasst können eine Hemmung der frühen Angiogenese und der Inflammation zu der deutlichen schlechteren Inkorporation von Dacron™ + Rifampicin führen. Ungeachtet dessen könnte ein spezielles Patientenkollektiv in der Gefäßchirurgie vielleicht sogar von der Hemmung dieser beiden Faktoren profitieren. Es wird vermutet, dass eine verstärkte Angiogenese und Inflammation, neben Artherosklerose und einem Nikotinabusus, die Progredienz von bestehenden Aortenaneurysmata fördern (Nordon et al. 2009). Bisher existiert jedoch keine effektive medikamentöse Therapie, welche die Progredienz eines Aneurysmas hemmen könnte (Rouer et al. 2014). Patienten mit Aortenaneurysma haben häufig eine erhöhte Expression von VEGF (Kaneko et al. 2011), ein Wachstumsfaktor der durch Rifampicin sehr effektiv gehemmt wird (Shichiri et al. 2009). Rouer et al. 2014 induzierten Aortenaneurysmata im Tiermodell und behandelten diese Tiere mit Rapamycin. Dieser mTor Hemmer wirkt hemmend auf Inflammation und Angiogenese und wird bisher als Drug Eluting Stent in der Kardiologie (Khan, Farah. 2012) und im Rahmen der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation eingesetzt (Patel et al. 2009). Rouer et al. 2014 konnten zeigen, dass durch die Behandlung mit Rapamycin die Progression von bereits bestehenden Aneurysmata verlangsamt wurde. Es wäre eine interessante Frage inwieweit die Wirkungen von Rifampicin und Rapamycin auf Angiogenese und Inflammation vergleichbar sind. Bei vergleichbaren Werten, würde sich Rifampicin aufgrund der niedrigeren Kosten und der nicht so schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen für eine Therapie bei Aneurysmata anbieten. Folglich könnten Patienten mit einem Aneurysma der Aorta descendens interventionell mit Rifampicin beschichteten Stentgrafts, mittels einer EVAR, versorgt werden. Patienten mit einer generalisierten dilatativen Arteriopathie könnten Rifampicin als Therapieoption erhalten.

In unserer Studie konnten wir signifikant weniger proliferative KI-67 positive Zellen im periprothetischen Granulationsgewebe in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe im Vergleich zur Dacron™ Kontrollgruppe sowie zur Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Gruppe nachweisen. Shichiri beschrieb eine proliferationshemmende Wirkung von Rifampicin bei Tumorzellen. Ferner wurde durch Turani et al. 2015 beschrieben, dass die Stammzellregeneration und proliferation im limbischen System durch den ophthalmologischen Einsatz von Rifampicin verlangsamt wird. Diese Erkenntnisse ließen bisher keinen entscheidenden Rückschluss auf die Verwendung von Rifampicin in der Gefäßchirurgie zu. Unsere Ergebnisse beweisen nun aber erstmalig, dass sich die diskutierte antiproliferative Eigenschaft von Rifampicin auch beim lokalen Einsatz als Dacron™ + Rifampicin auf die Zellpopulation auswirken kann.

Außerdem konnten wir zeigen, dass die Rifampicinbeschichtung von Dacron™ Prothesen eine signifikant höhere Apoptose von Zellen im periprothetischen Granulationsgewebe induziert als die Rifampicinbeschichtung von Dacron Silber<sup>+</sup>™ Prothesen und die Kontrollgruppe. Rifampicin verhindert in Prokaryonten über eine Blockierung der  $\beta$ -Einheit der DNA abhängigen RNA-Polymerase die Elongation der RNA ab einer Länge von etwa zwei Nukleotiden (Erokhina et al. 2013). Nach der Endosymbiontentheorie von A. Schimp., Mereschk und Lynn Margulis handelt es sich bei Mitochondrien um Nachfahren von Prokaryonten. Theoretisch wäre also eine Wechselwirkung von Rifampicin mit Mitochondrien nicht auszuschließen (Lang, Gray, Burger.1999). Bereits Anfang der 1970 Jahre konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass Rifampicin die DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Mitochondrien beeinflusst (Gadaleta et al. 1970). Dies führt in menschlichen Mitochondrien zu einer Veränderung der ATP-Synthese (Buss, Jaramillo, Piatt. 1987). Mitochondrien generieren als Abfallprodukt der ATP-Synthese reaktive Sauerstoffspezies. Durch die beschriebenen Veränderungen an diesen Organellen, kann es zu einer Dysfunktion und zur vermehrten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen. Über den mitochondrialen Signalweg kann es so zu einer intrinsischen Apoptose kommen (Erokhina, Kurygina, Onishchenko. 2013).

Unsere Ergebnisse deuten andererseits darauf hin, dass das Silberazetat der Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothesen proliferationsfördernde- und eine apoptosehemmende Wirkung aufweist. Dieser Eindruck wurde dadurch bestätigt, da Silberazetat anscheinend die signifikant proliferationshemmende- und nekrosefördernde Wirkung

des Rifampicins kompensieren kann. Ab gewissen Konzentrationen wirkt Silber auf humane Zellen ebenfalls toxisch (Gordon et al. 2010). Dacron Silber<sup>+</sup>™ Prothese scheinen jedoch die kritische Konzentration nicht zu erreichen. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Jeanmonod et al. 2013.

Zur histologischen Darstellung der Apoptose, verwendeten wir eine Caspase-3 Färbung. Wir konnten eine signifikant höhere Anzahl an Caspase-3 positiven Zellen in der Dacron™ + Rifampicin Gruppe nachweisen. Die durch uns gemessene signifikant verringerte Proliferation und gleichzeitig signifikant erhöhte Apoptose trägt sicher auch zu der insgesamt signifikant schlechteren Biokompatibilität von Dacron™ + Rifampicin Prothesen bei.

### **6.3 Fazit**

Rifampicin wird in der Gefäßchirurgie zur Beschichtung von Prothesen aufgrund seiner guten antibakteriellen Wirksamkeit durch diverse Studien gestützt. Nach wie vor ist diese Methode zur Sanierung von Gefäßprotheseninfektionen eingesetzt. Die Verwendung ist jedoch nicht unumstritten. In einer großen Metaanalyse konnten Stewart Eyers, Earnshaw. 2007 keinen signifikanten Überlebensvorteil bei der Verwendung von Dacron™ + Rifampicin bei der Behandlung eines Gefäßprotheseninfekts erkennen. Ebenfalls gibt es Studien, die die Methodik zum Qualitätsnachweis von antibakteriellen Beschichtungen auf Gefäßprothesen generell in Frage stellen (Zilla, Bezuidenhout, Human. 2007). Darüber hinaus wird in der klinischen Anwendung neben dem Einsatz einer Dacron™ + Rifampicin- oder Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin Prothese in der Regel eine systemische Antibiose etabliert. Inwieweit hierbei die systemische Antibiose oder zum Beispiel die Beschichtung mit Rifampicin zur erfolgreichen Sanierung der Infektion beiträgt, lässt sich nachträglich meist nur schwer beurteilen (Oderich et al. 2011; Stewart, Eyers, Earnshaw. 2007).

Die antibakterielle Wirkung von Dacron™ + Rifampicin gegenüber manchen Erregern ist außerdem nicht sichergestellt. Dies gilt vor allem für Echerischia coli und MRSA. Echerischia coli ist zum einen häufig bei Mischinfektionen nachweisbar zum anderen wird in Zukunft mit einer steigenden Inzidenz von MRSA gerechnet. Eben gegen diese Keime gilt die antibakterielle Wirkung von Dacron Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin als deutlich sicherer. Die sichere Verwendung von Dacron™ + Rifampicin in der Gefäßchirurgie

gie schränken diese Resistenzen somit weiter ein (Lachapelle, Graham, Symes. 1994; Koshiko et al. 2002; Vicaretti et al. 1999, Hayes et al. 1999).

Das eingeschränkte Wirkspektrum von Dacron<sup>TM</sup> +Rifampicin könnte eine Reinfektion eines bereits sanierten Gefäßprotheseninfekts zur Folge haben. Diese Reinfektionen haben meistens eine sehr schlechte Prognose (Lew, Moore. 2011; Oderich et al. 2011).

Neben Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin konnte sich die Anwendung von Dacron Silber<sup>+TM</sup> in den letzten Jahren weiter etablieren. Auch die antibakterielle Wirkung von Dacron Silber<sup>+TM</sup> ist nicht unumstritten und ist immer wieder Diskussionsgrundlage. Goëau-Brissonnière et al. 2002 und Hernández-Richter et al. 2003 stellten fest, dass Dacron Silber<sup>+TM</sup> Gefäßprotheseninfektionen im Tierversuch nicht suffizient verhindern konnte. Dies steht im klaren Widerspruch zu den Erkenntnissen von Illingworth et al. 2000 und Ricco & Group. 2006. Diese beschreiben eine gute antibakterielle Wirksamkeit. Ebenfalls ist es bisher nicht abschließend geklärt inwieweit Resistenzmechanismen von Keimen gegen Rifampicin oder Silberazetat auch beim Gefäßersatz greifen (Koshiko et al. 2002; Sardelic, Ao, Fletcher. 1995). Die Resistenzbildung könnte durch die Kombinationstherapie aus Silber und Rifampicin deutlich verringert werden (Wan et a., 2016).

Durch unsere Studien konnten wir zeigen, dass die Kombination einer Dacron<sup>TM</sup> Prothese mit Rifampicin zu einer signifikant schwächeren Neoangiogenese und einer signifikant niedrigeren Inflammation führte als die Verwendung einer unbehandelten Dacron<sup>TM</sup> Prothese. Insofern kommt es durch die Beschichtung mit Rifampicin zu einer schlechteren Integration der Prothese in das umliegende Gewebe.

Durch diese Erkenntnisse möchten wir nicht den generellen Einsatz von Rifampicin in der Gefäßchirurgie in Frage stellen. Es wird auch in Zukunft begründete Indikationen geben bei denen die Verwendung einer Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin Prothese sinnvoll sein kann. Alternativ für die Verwendung sollte vermehrt auf Darcon Silber<sup>+TM</sup> Prothesen zurückgegriffen werden. Diese zeigten sogar ein signifikant besseres Einwachsverhalten als unbeschichtete Dacronprothesen (Jeanmonod et al. 2013). Falls das antibakterielle Wirkspektrum von Rifampicin indiziert sein sollte, sollte der Einsatz von Dacron Silber<sup>+TM</sup> +Rifampicin Prothesen erwogen werden. Das Integrationsverhalten dieser Prothesen ist signifikant besser als das von Dacron<sup>TM</sup> + Rifampicin jedoch schlechter als dass von unbeschichteten Prothesen.

Durch unsere Ergebnisse sollte jedoch der in manchen Kliniken praktizierte präventive Einsatz von Dacron™ + Rifampicin beschränkt werden. Wenn an der Verwendung von antibakteriell beschichteten Prothesen festgehalten werden soll, sollte der Einsatz von Darcon Silber<sup>+</sup>™ + Rifampicin bevorzugt werden.

Als Alternativen zu synthetischen Prothesen oder autologen Venen werden seit einigen Jahren Homografts oder xenogenen Materialien, wie große Rinderpericard Patches vermehrt eingesetzt um auf den Einsatz von Dacron™ Prothesen komplett verzichten zu können (Czerny et al. 2011). Homografts und xenogene Materialien sind momentan noch sehr teuer und nicht in allen gefäßchirurgischen Zentren verfügbar.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Aboshady, I., Raad, I., Shah, A. S., Vela, D., Safi, H. J., Buja, L. M., & Khalil, K. G. (2012). A pilot study of a triple antimicrobial-bonded Dacron graft for the prevention of aortic graft infection. *J Vasc Surg*, *56*, 794-801.
2. Aboshady, I., Raad, I., Vela, D., Hassan, M., Aboshady, Y., Safi, H., . . . Khalil, K. (2015). Prevention of perioperative vascular prosthetic infection with a novel triple antimicrobial-bonded arterial graft. *J Vasc Surg*.
3. Altstaedt, H., Berzewski, B., Breddin, H., Brockhaus, W., Bruhn, H., Cachovan, M., . . . Gruss, J. (1993). Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage IV with intravenous iloprost and PGE1: a randomized open controlled study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, *49*, 573-578.
4. Amon, M., Menger, M., & Vollmar, B. (2003). Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB J.*, *17*, 175-185.
5. An, N., Song, Y., Zhang, X., Ci, X., Li, H., Cao, Y., . . . Deng, X. (2008). Pretreatment of mice with rifampicin prolongs survival of endotoxic shock by modulating the levels of inflammatory cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, *30*, 437-446.
6. Andrew, W., Gardner, P., Sorkin, D. J., Leslie, I., Katzel, M., Bradham, D. D., . . . Goldberg, A. P. (2001). Exercise Rehabilitation Improves Functional Outcomes and Peripheral Circulation in Patients with Intermittent Claudication: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, *6*, S. 755-762.
7. Baker, M., & Wayland, H. (1974). On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res*, *7*, 131-143.
8. Belio, M. L., Deterling, R. A., Dye, W. S., Julain, O. C., & Su, H. (1959). Dacron tube and bifurcation arterial prostheses produced to specification; experimental and clinical use. *AMA Arch Surg*, *78*, 260-270.
9. Böckler, D., Blaurock, P., Mansmann, U., Schwarzbach, M., & Allenberg, J. R. (2005). Early surgical outcome after failed primary stenting for lower limb occlusive disease. *J Endovasc Ther.*, *12*, 13-21.
10. Braithwaite, B., Davies, B., Heather, B., & Earnshaw, J. (1998). Early results of a randomized trial of rifampicin-bonded Dacron grafts for extra-anatomic vascular reconstruction. Joint Vascular Research Group. *Br J Surg.*, *85*, 1378-1381.
11. Buss, W., Jaramillo, E., & Piatt, M. (Oktober 1987). Coordinate increases and decreases in mitochondrial RNA and ATP syntheses produced by propranolol and rifampicin. *Biochem Pharmacol.*, *36*, 3293-3297.
12. Capoccia, L., Speziale, F., Menna, D., Esposito, A., Sirignano, P., Rizzo, A., . . . Collaborators. (2016). Preliminary Results from a National Enquiry of

Infection in Abdominal Aortic Endovascular Repair (Registry of Infection in EVAR--R.I.EVAR). *Ann Vasc Surg.*, 198-204.

13. Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (Juni 1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37, 1771-1776.
14. Cernohorsky, P., Reijnen, M., Tielliu, I., van Sterkenburg, S., van den Dungen, J., & Zeebregts, C. (2011). The relevance of aortic endograft prosthetic infection. *J Vasc Surg.*, 54, 327-333.
15. Chang, J. K., Calligaro, K. D., Ryan, S., Runyan, D., Dougherty, M. J., & Stern, J. J. (2003). Risk factors associated with infection of lower extremity revascularization: analysis of 365 procedures performed at a teaching hospital. *Ann Vasc Surg*, 17, 91-96.
16. Chikaraishi, Y., Matsunaga, N., Shimazawa, M., & Hara, H. (2008). Rifampicin inhibits the retinal neovascularization in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.*, 86, 131-137.
17. Coggia, M., Goëau-Brissonnière, O., Leflon, V., Nicolas, M. H., & Pechère, J. C. (2001). Experimental treatment of vascular graft infection due to *Staphylococcus epidermidis* by in situ replacement with a rifampin-bonded polyester graft. *Ann Vasc Surg*, 15, 421-429.
18. Conte, M. S., Belkin, M., Upchurch, G. R., Mannick, J. A., Whittemore, A. D., & Donaldson, M. C. (2001). Impact of increasing comorbidity on infrainguinal reconstruction: a 20-year perspective. *Ann Surg*, 233, 445-452.
19. Costerton, J. W., Montanar, L., & Arciola, C. R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*, 28, 1062-1068.
20. Creutzig, A., Lehmacher, W., & Elze, M. (2004). Meta-analysis of randomised controlled prostaglandin E1 studies in peripheral arterial occlusive disease stages III and IV. *Vasa.*, 33, 137-144.
21. Criqui, M. H., & Aboyans, V. (2015). Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*, 116, 1509-1526.
22. Czerny, M., von Allmen, R., Opfermann, P., Sodeck, G., Dick, F., Stellmes, A., . . . Schmidli, J. (2011). Self-made pericardial tube graft: a new surgical concept for treatment of graft infections after thoracic and abdominal aortic procedures. *Ann Thorac Surg.*, 92, 1657-1662.
23. Dal Ponte, D., Berman, S., Patula, V., Kleinert, L., & Williams, S. (2002). Abdominal aortic healing associated with a thin-walled Dacron-covered endovascular graft in a canine model. *J Endovasc Ther.*, 9, 333-343.
24. Davis, C., Fischer, J., Ley, K., & Sarembock, I. J. (2003). The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost*, 8, 1699-1709.
25. de Donato, G., Setacci, F., Galzerano, G., Ruzzi, U., Borrelli, M. P., Mazzitelli, G., & Setacci, C. (2014). Prosthesis infection: prevention and treatment. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 55, 779-792.
26. Debergh, I., Pattyn, P., & Ceelen, W. (2015). Microvascular effects of the low molecular weight heparins in a colorectal xenograft model: an intravital microscopy study. *J Surg Res*, 194, 488-495.

27. Debus, E. S., Larena-Avellaneda, A., Heimlich, F., Goertz, J., & Fein, M. (2013). Alloplastic bypass material below the knee: actual rationale. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, *54*, 159-166.
28. Devine, C., & McCollum, C. (2004). Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg*, *40*, 924-931.
29. Diehm, C., Kareem, S., & Lawall, H. (2004). Epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasa*(33), S. 183-9.
30. Diehm, C., Schuster, A., Allenberg, J., Darius, H., Haberl, R., Lange, S., . . . Trampisch, H. (2004). High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*, S. 95-105.
31. Doscher, W., Krishnasastri, K. V., & Deckoff, S. L. (1987). Fungal graft infections: case report and review of the literature. *J Vasc Surg.*, *6*, 398-402.
32. Edwards, W. H., Martin, R. S., Jenkins, J. M., Edwards, W. H., & Mulherin, J. L. (1987). Primary graft infections. *J Vasc Surg*, *6*, 235-239.
33. Ehrmantraut, S., Naumann, A., Willnecker, V., Akinyemi, S., Körbel, C., Scheuer, C., . . . Laschke, M. (2012). Vitalization of porous polyethylene (Medpor®) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng Part A*, *18*, 1562-1572.
34. Ehsan, O., & Gibbons, C. (2009). A 10-year experience of using femoropopliteal vein for re-vascularisation in graft and arterial infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, *38*, 172-179.
35. Enriquez-Cortina, C., Almonte-Becerril, M., Clavijo-Cornejo, D., Palestino-Domínguez, M., Bello-Monroy, O., Nuño, N., . . . Gómez-Quiroz, L. E. (September 2013). Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci*, *1*, 26-36.
36. Erokhina, M., Kurygina, A., & Onishchenko, G. (2013). Mitochondria are targets for the antituberculosis drug rifampicin in cultured epithelial cells. *Biochemistry (Mosc)*, *78*, 1155-1163.
37. Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., & Kim, J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, *52*, 662-668.
38. FitzGerald, S. F., Kelly, C., & Humphreys, H. (2005). Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *J Antimicrob Chemother*, *56*, 969-999.
39. Fowkes, F. G., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, J. O., McDermott, M., . . . Criqui, M. H. (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, *9901*, 1329-1340.
40. Freyrie, A., Curti, T., Rodio, M., Masetti, L., Bignozzi, L., Sanguinetti, V., . . . D'Addato, M. (1992). Interaction between vascular prostheses and rifampicin in the prevention of the grafts infection. An experimental study. *Int Angiol.*, *11*, 113-116.

41. Fridman, S., & Lazareva, D. (1983). Aspects of the immunodepressive action of gentamycin and rifampicin. *Antibiotiki.*, 28, 40-43.
42. Gadaleta, M., Greco, M., & Saccone, C. (1970). The effect of rifampicin on mitochondrial RNA polymerase from rat liver. *FEBS Lett.*, 1(10), 54-56.
43. Gahtan, V., Esses, G. E., Bandyk, D. F., Nelson, R. T., Dupont, E., & Mills, J. L. (Januar 1995). Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated Dacron grafts. *J Surg Res*, 1(58), 105-110.
44. Gao, H., Sandermann, J., Prag, J., Lund, L., & Lindholt, J. S. (Mai 2012). Rifampicin-soaked silver polyester versus expanded polytetrafluoro-ethylene grafts for in situ replacement of infected grafts in a porcine randomised controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 5, 582-587.
45. Ginalska, G., Kowalczyk, D., & Osińska, M. (2005). A chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts. *Int J Pharm*, 288, 131-140.
46. Goëau-Brissonnière, O., Fabre, D., Leflon-Guibout, V., Di Centa, I., Nicolas-Chanoine, M., & M, C. (2002). Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-sealed and silver/collagen-coated polyester prostheses. *J Vasc Surg.*, 35, 1260-1263.
47. Goëau-Brissonnière, O., Leport, C., Bacourt, F., Lebrault, C., Comte, R., & Pechère, J. C. (1991). Prevention of vascular graft infection by rifampin bonding to a gelatin-sealed Dacron graft. *Ann Vasc Surg*(5), 408-412.
48. Goede, V., Brogelli, L., Ziche, M., & Augustin, H. (1998). Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer.*, 82, 765-770.
49. Gordon, O., Vig Slenters, T., Brunetto, P., Villaruz, A., Sturdevant, D., Otto, M., . . . Fromm, K. (2010). Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother.*, 54, 4208-4218.
50. Gr, T. O. (Oktober 2000). Two randomised and placebo-controlled studies of an oral prostacyclin analogue (Iloprost) in severe leg ischaemia. The Oral Iloprost in severe Leg Ischaemia Study Group. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 358-362.
51. Greco, R. S., & Harvey, R. A. (1982). The role of antibiotic bonding in the prevention of vascular prosthetic infections. *Ann Surg*, 195, 168-171.
52. group, g. S. (2002). getABI: German epidemiological trial on ankle brachial index for elderly patients in family practice to dedect peripheral arterial disease, significant marker for high mortality. *Vasa*, 31, 241-248.
53. Grundy, S., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S. j., & Fuster, V. (1999). Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, 100, 1481-1492.
54. Gulati, A., Botnaru, I., & Garcia, L. (2015). Critical limb ischemia and its treatments: a review. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 56, 775-785.

55. Hardman, S., Cope, A., Swann, A., Bell, P., Naylor, A., & Hayes, P. (2004). An in vitro model to compare the antimicrobial activity of silver-coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Ann Vasc Surg*, 18, 308-313.
56. Hayes, P. D., Nasim, A., London, N. J., Sayers, R. D., Barrie, W., Bell, P. R., & Naylor, A. R. (1999). In situ replacement of infected aortic grafts with rifampicin-bonded prostheses: the Leicester experience (1992 to 1998). *J Vasc Surg*, 30, 92-98.
57. Helbing, E. J., & Hohf, R. P. (1962). Infection as a late complication in vascular grafting. *Am J Surg*(103), 544-548.
58. Helleman, J., Hendriks, J., Deblier, I., Tran, V., Bouhouch, A., Carp, L., . . . Van Schil, P. (2007). Mycotic aneurysm of the descending thoracic aorta. Review and case report. *Acta Chir Belg*, 107, 544-547.
59. Hernández-Richter, T., Schardey, H. M., Wittmann, F., Mayr, S., Schmitt-Sody, M., Blasenbren, S., . . . Angele, M. K. (2003). Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 26, 550-557.
60. Hoffmann, J. N., Vollmar, B., Laschke, M. W., Inthorn, D., Schildberg, F. W., & Menger, M. (2002). Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. *Anesthesiology*, 97, 460-470.
61. Hotchkiss, KM; Reddy, GB; Hyzy, SL; Schwartz, Z; Boyan, BD; Olivares-Navarrete, R (2016) Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater.*, 31, 425-434
62. Homer-Vanniasinkam, S. (2007). Surgical site and vascular infections: treatment and prophylaxis. *Int J Infect Dis*, 11, 17-22.
63. Hughes, A. M., Tenforde, T. S., Calvin, M., Bissell, M. J., Tischler, A. N., & Bennett, E. L. (1978). Inhibition of adenocarcinoma TA3 ascites tumor growth by rifamycin derivatives. *Oncology*, 35, 76-82.
64. Ilingworth, B., Bianco, R., & Weisberg, S. (2000). In vivo efficacy of silver-coated fabric against *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Dis.*, 9, 135-141.
65. Jeanmonod, P., Laschke, M. W., Gola, N., von Heesen, M., Glanemann, M., Dold, S., . . . Moussavian, M. R. (2013). Silver acetate coating promotes early vascularization of Dacron vascular grafts without inducing host tissue inflammation. *J Vasc Surg*, 58, 1637-1643.
66. Jeanmonod, P., Laschke, M. W., Gola, N., von Heesen, M., Glanemann, M., Menger, M., & Moussavian, M. R. (2014). Early host tissue response to different types of vascular prostheses coated with silver acetate or vaporized metallic silver. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 47, 680-688.
67. Jensen, L. J., & Kimose, H. H. (1985). Prosthetic graft infections: a review of 720 arterial prosthetic reconstructions. *Thorac Cardiovasc Surg*, 33, 389-391.
68. Kaneko, H., Anzai, T., Takahashi, T., Kohno, T., Shimoda, M., Sasaki, A., . . . Fukuda, K. (2011). Role of vascular endothelial growth factor-A in development of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res.*, 91, 358-367.

69. Kang, K., Lim, D., Choi, I., Kang, T., Lee, K., Moon, E., . . . Lim, J. (2011). Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. *Toxicol Lett.*, *205*, 227-234.
70. Khan, W., Farah, S., & Domb, A. (2012). Drug eluting stents: developments and current status. *J Control Release*, *161*, 703-712.
71. Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J., & van Bockel, J. H. (April 2004). Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *4*, 357-362.
72. Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, *10*, 505-520.
73. KochInstitut, K. K. (2007). Prävention postoperativer Infektionen im Operationsgebiet. *Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*, *50*, 377-393.
74. Koshiko, S., Sasajima, T., Muraki, S., Azuma, N., Yamazaki, K., Chiba, K., . . . Inaba, M. (2002). Limitations in the use of rifampicin-gelatin grafts against virulent organisms. *J Vasc. Surg*, *35*, 779-785.
75. Kraft, C., Burian, B., Perlick, L., Wimmer, M., Wallny, T., Schmitt, O., & Diedrich, O. (2001). Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res.*, *57*, 404-412.
76. Kraft, C., Hansis, M., Arens, S., Menger, M., & Vollmar, B. (Februar 2000). Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res*, *49*, 192-199.
77. Kumar, R., & Münstedt, H. (2005). Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials.*, *26*, 2081-2088.
78. Lachapelle, K., Graham, A. M., & Symes, J. F. (1994). Antibacterial activity, antibiotic retention, and infection resistance of a rifampin-impregnated gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg*, *19*, 675-682.
79. Ladenheim, E. D., Lum, C., Chadwick, N., & Agrawal, S. (2012). High Incidence of Perigraft Seroma Formation with Gelatin-Coated Polytetrafluoroethylene Grafts. *Seminars in Dialysis*, *25*, 689-692.
80. Lambert, A. W., Fox, A. D., Williams, D. J., Horrocks, M., & Budd, J. S. (1999). Experience with heparin-bonded collagen-coated grafts for infrainguinal bypass. *Cardiovasc Surg*, *7*, 491-494.
81. Lang, B., Gray, M., & Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet.*, 351-397.
82. Laschke, M. W., Witt, K., Pohlemann, T., & Menger, M. (2007). Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, *82*, 494-505.
83. Laschke, M., Vollmer, B., & Menger, M. (2011). The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater*, 164-167.

84. Lawall, C., Pittrow, D., & Diehm, C. (2009). Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK). *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen*.
85. Leroy, O., Meybeck, A., Sarraz-Bournet, B., d'Elia, P., & Legout, L. (2012). Vascular graft infections. *Curr Opin Infect Dis*, 25, 154-158.
86. Lew, W., & Moore, W. (2011). Antibiotic-impregnated grafts for aortic reconstruction. *Semin Vasc Surg.*, 24, 211-219.
87. Lindenauer, S. M., Fry, W. J., Schaub, G., & Wild, D. (1967). The use of antibiotics in the prevention of vascular graft infections. *Surgery*, 62, 487-492.
88. Loch, L., Smidt, K., Rungby, J., Stoltenberg, M., & Larsen, A. (2011). Uptake of silver from metallic silver surfaces induces cell death and a pro-inflammatory response in cultured J774 macrophages. *Histol Histopathol.*(26), 689-697.
89. Loughran, A. J., Atwood, D. N., Anthony, A. C., Harik, N. S., Spencer, H. J., Beenken, K. E., & Smeltzer, M. S. (Dezember 2014). Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic *sarA* mutants. *Microbiologyopen*, 6, 897-909.
90. Lovering, A., White, L., MacGowan, A., & Reeves, D. (1996). The elution and binding characteristics of rifampicin for three commercially available protein-sealed vascular grafts. *J Antimicrob Chemother.*, 38, 599-604.
91. Malassiney, P., Goëau-Brissonnière, O., Coggia, M., & Pechère, J. C. (1996). Rifampicin loading of vascular grafts. *J Antimicrob Chemother*, 37, 1121-1129.
92. Mallios, A., Boura, B., Alomran, F., & Combes, M. (2014). A new technique for reconstruction of the aortic bifurcation with saphenous vein panel graft. *J Vasc Surg.*, 59, 511-515.
93. Menger, M. D., Hammersen, F., & Messmer, K. (1992). In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 40, 19-25.
94. Menger, M., Hammersen, F., Walter, P., & Messmer, K. (1990). Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg.*, 38, 139-145.
95. Menna, D., Capoccia, L., Sirignano, P., Esposito, A., Rossi, M., & Speziale, F. (2015). Infective etiology affects outcomes of late open conversion after failed endovascular aneurysm repair. *J Endovasc Ther.*, 22, 110-115.
96. Moore, W. S., Chvapil, M., Seiffert, G., & Keown, K. (1981). Development of an infection-resistant vascular prosthesis. *Arch Surg*, 116, 1403-1407.
97. Motte, S., Bellens, B., Rickaert, F., Serruys, E., Thys, J. P., & Dereume, J. P. (1993). Vascular graft infection caused by *Aspergillus* species: case report and review of the literature. *J Vasc Surg*, 17, 607-612.
98. Moussavian, M., Laschke, M., Schlachtenberger, G., von Heesen, M., Wagner, M., Glanemann, M., & Menger, M. (2015). Perigraft vascularization

and incorporation of implanted Dacron prostheses are affected by rifampicin coating. *J Vasc Surg*.

99. Mu, X., Ubagai, T., Kikuchi-Ueda, T., Tansho-Nagakawa, S., Nakano, R., Kikuchi, H., & Ono, Y. (2013). Effects of erythromycin and rifampicin on immunomodulatory gene expression and cellular function in human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy*, *59*, 395-401.
100. Muhl, E., Gatermann, S., Iven, H., Dendorfer, A., & Bruch, H. P. (1996). Local application of vancomycin for prophylaxis of graft infection: release of vancomycin from antibiotic-bonded Dacron grafts, toxicity in endothelial cell culture, and efficacy against graft infection in an animal model. *Ann Vasc Surg*, *10*, 244-253.
101. Müller, K., & Dasbach, G. (1994). The pathology of vascular grafts. *Curr Top Pathol.*, 273-306.
102. Murphy, E. H., Szeto, W. Y., Herdrich, B. J., Wang, G. J., Bavaria, J. E., Fairman, R. M., & Woo, E. Y. (2013). The management of endograft infections following endovascular thoracic and abdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg.*, *58*, 1179-1185.
103. Nordon, I., Hinchliffe, R., Holt, P., Loftus, I., & Thompson, M. (2009). Review of current theories for abdominal aortic aneurysm pathogenesis. *Vascular.*, *17*, 253-263.
104. Novosel, E. C., Kleinhans, C., & Kluger, P. J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, *63*, 300-311.
105. Oderich, G., Bower, T., Hofer, J., Kalra, M., & Duncan, A. (2011). In situ rifampin-soaked grafts with omental coverage and antibiotic suppression are durable with low reinfection rates in patients with aortic graft enteric erosion or fistula. *J Vasc Surg.*, *53*, 99-106.
106. Park, K. M., Kim, Y. W., Yang, S. S., & Kim, D. (2014). Comparisons between prosthetic vascular graft and saphenous vein graft in femoro-popliteal bypass. *Ann Surg Treat Res.*, *87*, 35-40.
107. Pärsson, H., Nässberger, L., & Norgren, L. (1997). Inflammatory response to aorto-bifemoral graft surgery. *Int Angiol.*, *16*, 55-64.
108. Pascual, G., Sotomayor, S., Rodríguez, M., Bayon, Y., & Bellón, J. M. (2015). Tissue integration and inflammatory reaction in full-thickness abdominal wall repair using an innovative composite mesh. *Hernia*.
109. Patel, S., Elliott, E., Knight, R., Gaber, L., & Gaber, A. (2009). Considerations in sirolimus use in the early and late post-transplant periods. *Expert Opin Drug Saf.*, *8*, 421-434.
110. Pereira, C. E., Albers, M., Romiti, M., Brochado-Neto, F. C., & Pereira, C. A. (2006). Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency. *J Vasc Surg*, *44*, 510-517.
111. Popa, E. R., van der Strate, B. W., Brouwer, L. A., Tadema, H., Schipper, M., Fernandes, B., . . . Harmsen, M. C. (2007). Dependence of neovascularization mechanisms on the molecular microenvironment. *Tissue Eng*, *13*, 2913-2921.



112. Prevete, N., Liotti, F., Marone, G., Melillo, R., & de Paulis, A. (2015). Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacol Res.*, 184-191.
113. Rathbone, C., Cross, J., Brown, K., Murray, C., & Wenke, J. (2011). Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthop Res.*, 29, 1070-1074.
114. Revest, M., Camou, F., Senneville, E., Caillon, J., & Laurent, F. (2015). Medical treatment of prosthetic vascular graft infections: Review of the literature and proposals of a Working Group. *Int J Antimicrob Agents.*, 46, 254-265.
115. Ricco, J. B., & Group, I. S. (2006). InterGard silver bifurcated graft: features and results of a multicenter clinical study. *J Vasc Surg*, 44, 339-346.
116. Rose, W. E., Otto, D. P., Aucamp, M. E., Miller, Z., & de Villiers, M. M. (2015). Prevention of biofilm formation by methacrylate-based copolymer films loaded with rifampin, clarithromycin, doxycycline alone or in combination. *Pharm Res*, 32, 61-73.
117. Rouer, M., Xu, B., Xuan, H., Tanaka, H., Fujimura, N., Glover, K., . . . Dalman, R. (Mai 2014). Rapamycin limits the growth of established experimental abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, 47, 493-500.
118. Rücker, M., Laschke, M., Junker, D., Carvalho, C., Schramm, A., M lhaupt, R., . . . Menger, M. (2006). Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27, 5027-5038.
119. Rychlik, I. J., Davey, P., Murphy, J., & O'Donnell, M. E. (2014). A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass. *J Vasc Surg*, 60, 506-515.
120. Sardelic, F., Ao, P., & Fletcher, J. (1995). Rifampicin impregnated Dacron grafts: no development of rifampicin resistance in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, 9, 314-318.
121. Schaberg, T., Bauer, T., Castell, S., Dalhoff, K., Detjen, A., Diel, R., . . . Lodenkemper, R. (2012). Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. *Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK), Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP)*, 135-168.
122. Schierholz, J., Lucas, L., Rump, A., & Pulverer, G. (1998). Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hosp Infect.*, 40, 257-262.
123. Schmacht, D., Armstrong, P., Johnson, B., Pierre, K., Honeyman, A., Cuthbertson, D., & Bandyk, D. (2005). Graft infectivity of rifampin and silver-bonded polyester grafts to MRSA contamination. *Vasc Endovascular Surg*, 39, 411-420.
124. Schneider, F., O'Connor, S., & Becquemin, J. P. (2008). Efficacy of collagen silver-coated polyester and rifampin-soaked vascular grafts to resist infection from MRSA and Escherichia coli in a dog model. *Ann Vasc Surg*, 22, 815-821.

125. Shaw, J., Chuang, N., Yee, H., & Shamamian, P. (2003). Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res.*, *109*, 37-42.
126. Shichiri, M., & Hirata, Y. (2001). Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J.*, *15*, 1044-1053.
127. Shichiri, M., & Tanaka, Y. (2010). Inhibition of cancer progression by rifampicin: involvement of antiangiogenic and anti-tumor effects. *Cell Cycle*, *1*, 64-68.
128. Shichiri, M., Fukai, N., Kono, Y., & Tanaka, Y. (Juni 2009). Rifampicin as an oral angiogenesis inhibitor targeting hepatic cancers. *Cancer Res.*, *69*, 4760-4768.
129. Siracus, J. J., Nandivada, P., Giles, K. A., Hamdan, A. D., Wyers, M. C., Chaikof, E. L., . . . Schermerhorn, M. L. (2013). Ten Year Experience with Prosthetic Graft Infections Involving the Femoral Artery. *J Vasc Surg*, *57*, 700-705.
130. Siracuse, J. J., Giles, K. A., Pomposelli, F. B., Hamdan, A. D., Wyers, M. C., Chaikof, E. L., . . . Schermerhorn, M. L. (2012). Long-term Results for Primary Bypass vs. Primary Angioplasty/Stent for Intermittent Claudication Due to Superficial Femoral Artery Occlusive Disease. *J Vasc Surg.*, *55*, 1001-1007.
131. Stahlmann, R., & Lode, H. (2009). Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie. In K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, & K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Bd. 10, S. 852-862).
132. Stewart, A., Evers, P., & Earnshaw, J. (2006). Prevention of infection in arterial reconstruction. *Cochrane Database Syst Rev*, *19*.
133. Stewart, A., Evers, P., & Earnshaw, J. (2007). Prevention of infection in peripheral arterial reconstruction: a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg.*, *46*, 148-155.
134. Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, *9258*, 135-138.
135. Swartbol, P., Pärsson, H., Truedsson, L., Sjöholm, A., & Norgren, L. (1996). Aortobifemoral surgery induces complement activation and release of interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha. *Cardiovasc Surg.*, *4*, 483-491.
136. Turani, M., Banfalvi, G., Peter, A., Kukoricza, K., Kiraly, G., Talas, L., . . . Nagy, G. (2015). Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth. *Toxicol In Vitro.*, *29*, 370-379.
137. Van der Vliet, Q., Berger, P., De Borst, G., & Moll, F. (2014). Graft-appendiceal fistula treated with a rifampicin-silver in-situ graft. *Surg Infect (Larchmt)*, *15*, 450-453.
138. Van Vlem, B., Vanholder, R., De Paepe, P., Vogelaers, D., & Ringoir, S. (1996). Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection.*, *24*, 275-291.

139. Vesely, J. J., Pien, F. D., & Pien, B. C. (1998). Rifampin, a useful drug for nonmycobacterial infections. *Pharmacotherapy*, 18, 345-357.
140. Vicaretti, M., Hawthorne, W., Ao, P., & Fletcher, J. (1999). Does in situ replacement of a staphylococcal infected vascular graft with a rifampicin impregnated gelatin sealed Dacron graft reduce the incidence of subsequent infection? *Int Angiol.*, 18, 225-232.
141. Wan, G., Ruan, L., Yin, Y., Yang, T., Ge, M., & Cheng, X. (2016). Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. *Int J Nanomedicine.*, 3789-3800.
142. WHO. (05. Januar 2016). *World Health Organization*. Von <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html> abgerufen
143. Wijnhoven, S., Peijnenburg, W., Herberts, C., Hagens, W., Oomen, A., Heugens, E., . . . Geertsma, R. (2009). Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3, 109-138.
144. Wong, K., Cheung, S., Huang, L., Niu, J., Tao, C., Ho, C., . . . Tam, P. (2009). Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem.*, 4, 1129-35.
145. Wooster, D., Louch, R., & Krajden, S. (1985). Intraoperative bacterial contamination of vascular grafts: a prospective study. *Can J Surg.*, 28, 407-409.
146. Wu, M. H., Shi, Q., Onuki, Y., Kouchi, Y., & Sauvage, L. R. (1996). Histologic observation of continuity of transmural microvessels between the perigraft vessels and flow surface microostia in a porous vascular prosthesis. *Ann Vasc Surg.*, 10, 11-15.
147. Zilla., P., Bezuidenhout, D., & Human, P. (2007). Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials.*, 34, 5009-5027.
148. Zippel, R., Wilhelm, L., Hoene, A., Walschus, U., Ueberrueck, T., & Schlosser, M. (2008). Local tissue reaction and differentiation of the prosthesis-specific antibody response following functional implantation of vascular grafts in pigs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85, 334-342.

## 8. Abbildungsverzeichnis

1. **Abbildung 1:** Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J., & van Bockel, J. H. (April 2004). Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 27(4), 357-362.
2. **Abbildung 2:** Lachapelle, K., Graham, A. M., & Symes, J. F. (April 1994). Antibacterial activity, antibiotic retention, and infection resistance of a rifampin-impregnated gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg*, 4(19), 675-682
3. **Abbildung 5:** Lachapelle, K., Graham, A. M., & Symes, J. F. (April 1994). Antibacterial activity, antibiotic retention, and infection resistance of a rifampin-impregnated gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg*, 4(19), 675-682

## **9. Publikationen und Fachvorträge**

### **9.1 Publikationen**

Moussavian MR, Laschke MW, Schlachtenberger G, von Heesen M, Wagner M, Glanemann M, Menger MD Perigraft vascularization and incorporation of implanted Dacron prostheses are affected by rifampicin coating. J Vasc Surg. 2015. 741-52 14 (15)

### **9.2 Fachvorträge**

132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie

28.04. - 01.05.2015, München

„Perigraftreaktion von unbeschichteten und antibakteriell beschichteten Silberazetat- und Rifampicin-Dacron-Gefäßprothesen – Eine quantitative Analyse am tierexperimentellen Rückenhautkammermodell der Maus“

## 10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. M.R. Moussavian für die Überlassung des Themas und die unermüdliche fachlich sowie emphatische Förderung in der Schaffensperiode dieser Dissertationsarbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. M. von Heesen bedanken, der mich insbesondere bei der experimentellen Arbeit technisch und fachlich unterstützte.

Ferner möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes danken. Hierbei gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. med. MD Menger für die Möglichkeit die Experimente in seinem Institut durchführen zu können sowie Prof. Dr. med. M. Laschke der immer für fachliche Rückfragen zur Verfügung stand.

Besonders hervorzuheben ist außerdem Frau J. Becker. Die mich unermüdlich durch die Herstellung von histologischen Schnitten unterstützte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben und die immer ein emotionaler Rückhalt waren und es auch heute noch sind.