

Aus der Klinik für Interdisziplinäre Endoskopie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. med. Nib Soehendra

**In-vitro-Untersuchung  
von hydrophobierten Sol-Gel-Beschichtungen  
für Gallengangendoprothesen  
im Vergleich zu unbeschichteten Teflonendoprothesen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Tolga Ağdırlıoğlu

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 26.03.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. U. Seitz

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. N. Soehendra

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. A de Weerth

**Für meine Eltern**

**Fatma und Atil Ağdırhoğlu**

<b>ARBEITSHYPOTHESE .....</b>	<b>6</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
Allgemeines .....	7
Nachteile von Gallengangendoprothesen .....	8
Sol-Gel-Beschichtung .....	11
<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>12</b>
<b>Labormaterialien.....</b>	<b>12</b>
Schwenkvorrichtung.....	12
Chemikalien und Verbrauchsgegenstände.....	13
<b>Biologisches Material .....</b>	<b>14</b>
Galle-Pool.....	14
Bakterienkultur .....	17
<b>Sol-Gel-Beschichtung .....</b>	<b>18</b>
<b>Vorbereitung und Beschichtung der Stents .....</b>	<b>19</b>
<b>Versuchsablauf.....</b>	<b>21</b>
<b>Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....</b>	<b>22</b>
Stentvorbereitung.....	22
Besputtern.....	23
Funktion des Rasterelektronenmikroskops .....	24
Kriterien der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung.....	24
<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>27</b>
<b>Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung .....</b>	<b>27</b>
Vergleich der Alkohol- und Lufttrocknung .....	27
Vergleich der Ablagerungsneigung von humaner Galle und Galle vom Schwein.....	28
Beurteilung der einzelnen Kollektive .....	29
Wirkung des Primers auf Oberflächenstabilität und Grad der Ablagerung .....	35
Vergleich der Kollektive miteinander.....	36
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>38</b>
Allgemeines .....	38
Rasterelektromikroskopische Auswertung .....	38
Luft- oder Alkoholtrocknung .....	38
Humane Galle und Galle vom Schwein .....	39
Sol-Gel-Beschichtungen gegen Stentverstopfung durch Sludge.....	39

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>41</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>43</b>
<b>DIAGRAMMVERZEICHNISS.....</b>	<b>43</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNISS .....</b>	<b>43</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>45</b>
Bilder der Rasterelektronenmikroskopie .....	47
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>53</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>59</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>60</b>

## Arbeitshypothese

Gallengangstents werden bei malignen und benignen Verschluss der Gallenwege endoskopisch eingelegt. Die endoskopische Therapie ist bei gleicher Effektivität kostengünstiger als eine palliative perkutane Drainage oder eine biliodigestive Anastomose und auch mit weniger Komplikationen behaftet. Das größte Problem der derzeit genutzten Gallengangstents ist die Verstopfung nach einer Liegedauer von einigen Monaten mit Sludge, einer Masse aus Proteinen, Bakterien, Bilirubin und Nahrungsresten. Dies macht eine erneute endoskopische Intervention mit Wechsel der verstopften Prothese nötig.

Durch den Fortschritt im Bereich der Nanotechnologie konnten Beschichtungen von Teflonoberflächen hergestellt werden, bei denen durch gezielte Auswahl geeigneter Ausgangssubstanzen physikalische und chemische Eigenschaften der Oberfläche beeinflusst werden können. Voruntersuchungen zeigten bereits die Überlegenheit einiger Sol-Gel-Beschichtungen.

### Hypothesen:

- Die Optimierung der Zusammensetzung und Konzentration der nanotechnologischen Sol-Gel-Beschichtungen auf Teflonoberflächen führt zu geringeren Adhäsion von Sludge
- Durch Zugabe eines speziell entwickelten Oberflächenstabilisators „Primer“ haftet die Beschichtung besser
- Galle vom Schwein eignet sich genauso gut wie humane Galle zum Bespülen der Prothesen
- Die Alkoholtrocknung bietet gegenüber der Lufttrocknung keine Vorteile

# Einleitung

## *Allgemeines*

Tumoren der Bauchspeicheldrüse machen 2-3% aller bösartigen Neubildungen beim Erwachsenen aus. In Deutschland erkranken 10 von 100.000 Einwohnern jährlich neu. Der Altersgipfel für das Auftreten von Pankreaskarzinomen liegt zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt. Pankreaskarzinome haben eine extrem schlechte 5-Jahres-Überlebensrate. Die meisten Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits einen fortgeschrittenen Tumor und Fernmetastasen. Deshalb lässt sich die chirurgische Resektion in kurativer Absicht nur bei 15-20% der Patienten durchführen [WINTER 2006, SCHMIDT 2004, RIDWELSKI 2001, JOHNSTONE 1993]

Im Verlauf der Erkrankung entwickelt sich bei Beteiligung des Pankreaskopfes ein Verschlussikterus mit ausgeprägtem Pruritus. Zudem besteht durch die Cholestase die Gefahr einer hochgradigen Cholangitis oder Cholangiosepsis.

Die 1979 von Prof. Soehendra in der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf eingeführte endoskopische Drainage des Gallengangs ist das Verfahren der Wahl bei der palliativen Therapie des malignen Verschlussikterus. Die endoskopische Therapie ist bei gleicher Effektivität kostengünstiger als eine palliative perkutane Drainage oder eine biliodigestive Anastomose und auch mit weniger Komplikationen behaftet. [ABRAHAM 2002, ARNOLD 1998, ETTINGHAUSEN 1995, SPEER 1987, RAIKAR 1996, BALLINGER 1994, SIEGEL 1986].

Nach der Diagnose eines Tumors der ableitenden Gallenwege kann mit der endoskopischen retrograden Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) ungeachtet der Resektabilität eine Drainage eingebracht werden. Die Cholestaseparameter normalisieren sich in der Regel innerhalb weniger Tage, Haut- und Sklerenikterus sowie Pruritus bilden sich zurück, und die Lebensqualität der Patienten bessert sich.

Bei einer Inzidenz von 10/10.000/Jahr für Pankreaskarzinome und 2/10.000/Jahr für Gallengangkarzinome, unter Berücksichtigung der Rate resektabler Patienten, kann mit einem jährlichen Bedarf von nahezu 10.000 endoskopischen Gallengangstents in Deutschland gerechnet werden. [Seitz]

Zurzeit werden zwei Arten von Stents in der Endoskopie bei der Behandlung des malignen Verschlussikterus verwendet

1. Kunststoffstent (Polyethylen, Teflon)
2. selbst-expandierender Metallstent (SEMS)

Auch benigne Erkrankungen können einen Verschlussikterus verursachen, z.B. Gallengangstrikturen nach Cholezystektomie mit Verletzung oder Koagulation in zu großer Nähe des Gallengangs, nach Leberteilresektionen, Anastomosenstrikturen nach Lebertransplantation oder Kompressionen des distalen Gallengangs im Rahmen einer chronischen Pankreatitis.

### ***Nachteile von Gallengangendoprothesen***

Eines der größten Probleme der derzeit genutzten Plastik-Gallengangstents ist die Verstopfung mit Sludge nach einer Liegedauer von einigen Monaten [SPEER1998, SUNG 1994 & 1995, DAVIDS 1992, KNYRIM 1993]. Deshalb wird eine erneute endoskopische Intervention mit Wechsel der verstopften Prothese nötig. Derzeit liegt die Reinterventionsrate bei ca. 50-75% der palliativ mit Stent versorgten Patienten. Die Folge ist eine erhöhte Belastung des Patienten.

Bei der Verstopfung von Plastik-Stents spielen viele verschiedene Faktoren eine Rolle. So finden kurz nach Platzierung des Plastik-Stents bereits auf der Oberfläche die ersten Schritte statt. Proteine wie Fibronectin, Kollagen und Immunglobuline haften sich an die Oberfläche des Stents. Diese, insbesondere Fibronectin, fördern die Anhaftung von Bakterien, die sich innerhalb der Glycokalyxmatrix zu festgewachsenen Mikrokolonien vermehren und anschließend ein Biofilm bilden [LEUNG 1988, DAWIDAR 1991, DAWIDAR 1992, GROEN 1987, COENE 1990].

Die Rolle der Bakterien bei der Stentverstopfung ist gesichert. Werden Stents mit steriler Galle gespült, wird keine Sludgebildung beobachtet. Bspült man sie dagegen mit infizierter Galle, so bildet sich in wenigen Tagen Sludge. [LEUNG 1988]

Zuvor durchgeführte Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen zeigten, dass es Unterschiede zwischen den Bakterien bei der Anhaftung auf die Stentoberfläche gab. Die Bakterien, die so genannte Pili oder Glykokalyx (ein Exopolysaccharid) auf ihrer



Oberfläche besitzen, können sich viel leichter an der Oberfläche anhaften als Bakterien, die diese Oberflächenmoleküle nicht besitzen. (z.B. E.coli ) [LEUNG 1998]

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass E.coli Bakterien mit einer  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität mehr Sludge produzierten als solche, die diese Funktion nicht besitzen. [LEUNG 2001]



**Abbildung 1: Verstopfter Plastikstent**

Nur wenige Strategien gegen die Stentverstopfung haben zu einer klinisch spürbaren Verbesserung der Drainagedauer geführt:

1. Eine prophylaktische Gabe von Antibiotika führte in mehreren randomisierten Studien zu keiner Verbesserung der Drainagedauer. Eine Erklärung dafür ist, dass die Glykoproteine und der Sludge der Bakterien eine physikalische Barriere für das Antibiotikum darstellen.

[GALANDI D 2002 / DE LEDINGHEN 2000 / GHOSH 1994 / LUMAN 1999 / SMIT 1989 / TARNASKY 1995 ]

2. Nach Verfügbarkeit von Endoskopen mit größerem Arbeitskanal konnten Stents mit mehr als 7 French Außendurchmesser eingelegt werden, wodurch eine Verlängerung der Drainagedauer erreicht wurde. Durchmesser von mehr als 10 French erbrachten jedoch keinen klinisch nachweisbaren Vorteil.[SPEER 1988 / MATSUDA 1991]

3. Im Jahre 1990 entwickelten Soehendera et al. am UKE aus Teflon die sog. Tannenbaum-Prothese. Im Gegensatz zu den Pigtailprothesen, die bis zu diesem Zeitpunkt am UKE verwendet wurden, hat sie eine gerade Form und keine Seitenlöcher. Zur Verankerung werden 2-3 Reihen mit je vier Öhrchen in die Prothesenwand geschnitten, ohne sie zu perforieren. Geringere Verstopfungs- und Reinterventionsraten konnten dadurch erreicht werden. [SEITZ 1996]

4. Selbstexpandierende Metallstents verstopfen nur selten mit Sludge und gewährleisten eine längere Drainagedauer. Nachteilig ist jedoch, dass ein erneuter Verschlussikterus durch Gallengangshyperplasie zwischen den Metallmaschen oder Tumoreinwuchs auftreten kann. Stents mit einer Kunststoffmembran zwischen den Maschen („gecoatete Stents“) können dies verhindern, dislozieren dagegen häufiger.

Gegen den breiten Einsatz in der Praxis sprechen die Kosten für den Metallstent von 700-2000 € gegenüber ca. 100 € für einen Plastikstent [SEITZ].



**Abbildung 2: Metallstent Wallstent™ und gecoatete Stents**

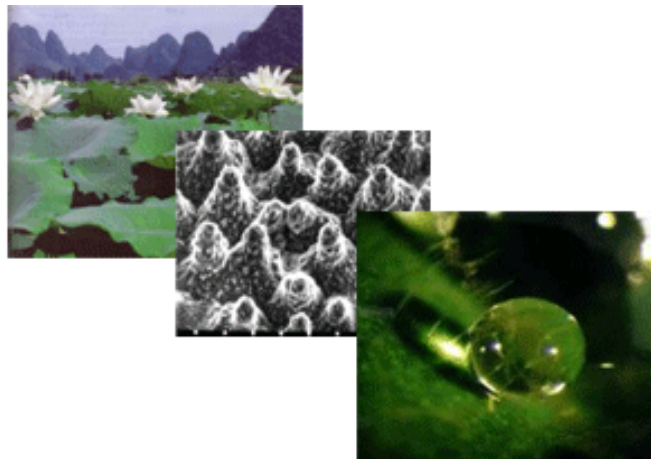
Bei einem in Zukunft weiter wachsendem Bedarf für Gallengangendoprothesen ist es notwendig einen Stent zu entwickeln, der sowohl kostengünstig ist und dabei zugleich eine reduzierte Verstopfungsneigung aufweist. Die Oberflächeneigenschaften des Stentsmaterials spielen eine wichtige Rolle bei der Stentverstopfung.

Durch den Fortschritt im Bereich der Nanotechnologie konnten stabile Beschichtungen von Teflonoberflächen hergestellt werden. Mit der nanotechnologischen Sol-Gel-Methode lassen sich kostengünstige Beschichtungen realisieren. Voruntersuchungen deuteten bereits an, dass einige Sol-Gel-Beschichtungen gegenüber unbeschichteten Teflonstents überlegen sind. Für die aktuelle Arbeit wurden bewährte Beschichtungen zur weiteren Optimierung modifiziert.

## **Sol-Gel-Beschichtung**

Durch die Nanobeschichtung entstehen neue Möglichkeiten zur Herstellung von Oberflächen, deren physikalische und chemische Eigenschaften durch gezielte Auswahl geeigneter Ausgangssubstanzen bestimmt werden können.

Der Lotuseffekt ist schon lange bekannt. Die Ursache des Lotuseffekts liegt in einer besonderen Oberflächenstruktur der Blätter, welche so geringe Adhäsionskräfte erzeugt, dass schon bei Flüssigkeiten mit geringer Oberflächenspannung die Kohäsionskräfte innerhalb der Flüssigkeit die Adhäsionskräfte überwiegen und es zu keiner Benetzung kommt. Es liegt hier eine Selbstreinigung einer biologischen Oberfläche durch einen physikalischen Effekt vor.



**Abbildung 3: Nano-Partikel-Effekt am Beispiel Lotusblume/ Lotusan**

Die nanotechnologische Sol-Gel-Beschichtung verspricht genau diesen Effekt bei beschichteten Oberflächen hervorzurufen.

Die Herstellung nanoskaliger hybrider Kompositmaterialien durch den Sol-Gel-Prozess erfolgt im Allgemeinen durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen von flüssigen Monomeren in Lösung. Durch das Aufbringen von Nanostrukturen auf Oberflächen werden diese z.B. superhydrophob und damit wasser- bzw. schmutzabweisend.

Zuvor durchgeführte Pilotstudien zeigten, dass Sol-Gel beschichtete Stents mit einem ausgewogenem Verhältnis von hydrophob zu hydrophil tendenziell weniger Sludge ablagern.

Diese Methode scheint der Schlüssel zur Lösung des Problems der Endoprothesenverstopfung zu sein.

# **Material und Methode**

## ***Labormaterialien***

### **Schwenkvorrichtung**

Frühere Untersuchungen zeigten, dass man durch ein langsames Hin- und Herschwenken von Prothesen in 12-Well-Plates mit bakteriell kontaminierter Galle, eine ähnliche Entstehung des Biofilms erhält wie unter in-vivo Bedingungen. Für die Untersuchung der verschiedenen Stent-Materialien wurde nach einer einfachen und zuverlässigen Apparatur gesucht, auf der mehrere 12-Well-Plates 10 mal /min in einem definierten Winkel hin- und hergeschwenkt werden können. Zusätzlich musste die Apparatur den intensiven klimatischen Bedingungen im Wärmerraum bei 37° C über mehrere Wochen standhalten. Der Neigungswinkel der Plattform musste so gewählt werden, dass die Gallenflüssigkeit während des Betriebes nicht über den Rand der Plates schwappte. Auch die Regulierung und die Konstanz der Geschwindigkeit des Schwenkens waren Grundvoraussetzungen bei der Konstruktion.

### **Konstruktion und Bau:**

Die Konstruktion und der Bau der Apparatur fanden in Zusammenarbeit mit der Firma Grosse Medizintechnik GmbH & Co KG in Daldorf statt.

Dieser Apparat erfüllte alle Anforderungen:

- in vier Stufen konnte der Neigungswinkel eingestellt werden
- die Geschwindigkeit wurde über ein 12V Netzteil stufenlos geregelt, was bei einer Stromzufuhr von 3,75 V 10 Schwenkbewegungen pro Minute entsprach.

Die Konstruktion bestand aus klimaresistentem Aluminium mit einem kunststoffumhüllten Motor, der über eine kugelgelagerte Achse mit dem Plateau verbunden war.



Abbildung 4 Schwenkvorrichtung

## Chemikalien und Verbrauchsgegenstände

Die während der Versuchsdauer verwendeten Materialien sowie ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Sonstige Materialien werden im laufenden Text erläutert.

**Tabelle 1: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsgegenstände**

<b>Geräte:</b>		
Zentrifuge	Type: 5804R Rotor: F 34-6-36 (6 x 85 ml)	Fa. Eppendorf
Wasserbad	Thermomix BU	Fa. Braun
Gefrierschrank -21 °C	Comfort	Fa. Liebherr
Gefrierschrank -80 °C		Fa. Kryotec
Schüttler		Fa. Grosse Medizintechnik GmbH & Co KG
Autoklav	Sanoclav	Fa. Wolf
Sputter-Gerät		Fa. Edwards Sputter Coater
Elektronenmikroskop	Typ DSM 940	Fa. Zeiss
<b>Chemikalien:</b>		
NaCl		Fa. J. T. Baker
Trypton-Wasser	#1.10859.500	Fa. Merck
Hefeextrakt	#1.03753.500	Fa. Merck
LB-Agar (Lennox L Agar)	#22700-025	Fa. Invitrogen
Glutaraldehydlösung	#1.04239.1000	Fa. Merck
Phosphatpuffer (PBS)		
Glycerin	#1.04093.1000	Fa. Merck
<b>Verbrauchsgegenstände:</b>		
Pipettenspitzen 1000 blau	#740296	Fa. Greiner
200 gelb	#739296	
Zellkulturplatten (12-well-plate)	#150628	Fa. Nunc
Petrischalen	#663102	Fa. Greiner
50 ml - Falcon-Tubes	#2070	Fa. Bacton Dickinson
1,5 ml - Tubes	#616201	Fa. Greiner
Faltenfilter 150 mm	#10312245	Fa. Schleicher&Schuell
Blutbeutel Compoflex®	#P4162	Fa. Fresenius Hemo Care

## ***Biologisches Material***

### **Galle-Pool**

#### **Sammlung der Galle**

In einem Zeitraum von 16 Wochen wurden 7,2 Liter humane Galle und 4,0 Liter Galle vom Schwein gesammelt. Für die Entnahme der Galle entstand weder für die Patienten noch für die Tiere ein zusätzlicher Aufwand.

Alle Patienten benötigten aufgrund gut- oder bösartiger hepatobiliärer Erkrankungen interventionelle endoskopische oder perkutane Eingriffe oder mussten sich einer chirurgischen Therapie unterziehen. Jeder Patient wurde vor der Entnahme über das Vorgehen, sowie den Verwendungszweck der Galle aufgeklärt.

Anamnestisch wurde sichergestellt, dass die Patienten in einem Zeitraum von einer Woche vor der Entnahme keine Antibiotikatherapie erhalten hatten.

Für die Sammlung der humanen Galle wurde mit den gastroenterologischen Abteilungen der Kliniken AK Barmbek, AK Altona und des UKE zusammen gearbeitet. Die Galle wurde entweder über perkutane transhepatische Drainagen in 500ml Glasbehälter aufgefangen oder während einer ERCP 2-27 ml Galle entnommen und in sterilen Einmalspritzen aufbewahrt.

Die Galle aus der Gallenblase vom Schwein (lat.: *Sus scrofa domestica*) wurde im Schlachthof gewonnen.

Da es sich bei der Galle vom Schwein um tierische Nebenerzeugnisse handelte, wurde die Erlaubnis zur Sammlung und Verwendung vom Veterinäramt Hamburg eingeholt.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Galle separat voneinander in 50 ml Falcon Tubes umgefüllt und bei -19°C im Labortiefkühlschrank eingefroren, um einer Überwucherung mit Bakterien vorzubeugen.

In der nachfolgenden Tabelle werden alle Patienten mit ihren Diagnosen, chronologisch nach dem Entnahmedatum, aufgelistet.

**Tabelle 2: Sammlung der Galle**

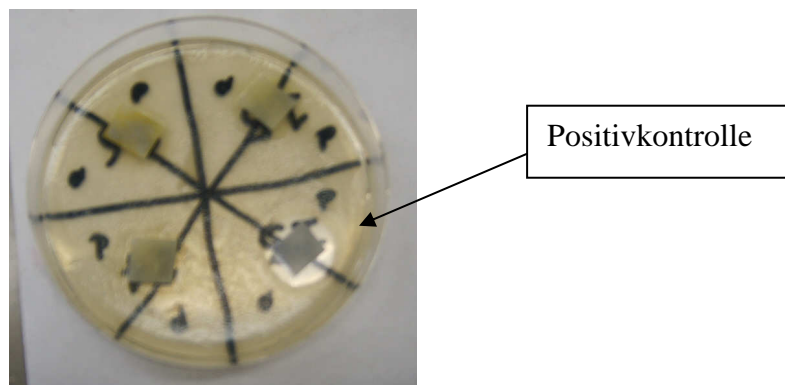
Pat. Nr.	Datum	Diagnose	Alter	Geschlecht	Krankenhaus	Gewinnung per	Menge in ml
1.	12.07.2005	Maligner Gallengangverschluss	69	männl.	AKB	PTD	100
	13.07.2005					PTD	100
	12.08.2005						75
2.	25.07.2005	Chron. kalzifizierende Pankreatitis	63	männl.	UKE	ERCP	27
3.	11.08.2005	Lebermetastasen bei Kolonkarzinom	79	männl.	AKA	PTD	
4.	11.08.2005	Klatskin-Tumor	83	weibl.	AKB	PTD	170
	13.08.2005						190
	15.08.2005						615
	17.08.2005						110
5.	13.08.2005	Cholestase bei Z.n. Wipple OP	69	männl.	AKB	PTD	670
	15.08.2005						847
	16.08.2005						821
	17.08.2005						400
18.08.2005		200					
6.	15.08.2005	V.a. primär sklerosierde Cholangitis	18	männl.	UKE	ERCP	15
7.	15.08.2005	Pankreaskarzinom	37	weibl.	UKE	ERCP	2
8.	26.08.2005	Verschluss des dist. Gallengang bei Ösophaguskarzinom	59	weibl.	UKE	ERCP	27
9.	26.08.2005	Pankreaskarzinom	63	männl.	AKB	PTD	331
10.	08.09.2005	Pankreaskarzinom	71	weibl.	AKB	PTD	185
	09.08.2005						100
11.	15.09.2005	Maligner Gallengangverschluss	66	weibl.	UKE	ERCP	50
12.	11.11.2005	Pankreaskarzinom	69	männl.	AKB	PTD	1000
13.	29.11.2005	Klatskin-Tumor	78	weibl.	AKB	PTD	180
	30.11.2005						190
	02.12.2005						200
	03.12.2005						95
14.	03.12.2005	Maligner Gallengangverschluss	73	weibl.	AKB	PTD	175
15.	04.12.2005	Pankreaskarzinom	68	männl.	AKB	PTD	170
16.	06.01.2006	Cholestase bei Z.n. Wipple OP	65	männl.	AKB	PTD	165

## Aufbereitung der Galle

Um sicherzustellen, dass die gesammelte Galle frei von Antibiotikarückständen war, wurde jede Galleprobe getestet, um für die spätere Versuchsreihe ein Bakterienwachstum zu gewährleisten.

Bei dem Test wurde folgendermaßen vorgegangen: zuerst wurden Filterpapier mit der zu testenden Galle getränkt und auf einen zuvor nach Laboranleitung hergestellten und mit Antibiotika sensitiven Bakterien beimpften Nähragar ausgelegt. Die Platten wurden anschließend über einem Zeitraum von 24 Std. bei 37°C bebrütet. Falls

Antibiotikarückstände in den Proben waren, so diffundierten diese in den Agar hinein und verhinderten das Wachstum der sensitiven Bakterien. Auf den mit einem Bakterienrasen bedeckten Platten konnten dann mit bloßem Auge unbewachsene, kreisförmige Bereiche um die Filterpapiere erkannt werden, die so genannten Hemmhöfe. Zur Unterscheidung der verschiedenen Proben wurden die Nährplatten in vier Felder unterteilt, in eines der vier Felder wurde eine mit Antibiotika getränkte Papierscheibe gelegt um eine Positivkontrolle zu erhalten.



**Abbildung 5: Antibiotika-Test**

In einem nächsten Schritt wurde die Galle von größeren Zellen, Keimen und kristallinen Präzipitaten befreit. Dafür wurde die zuvor in 50ml Falcon Tubes gefüllte Galle in einer Tischzentrifuge der Marke Eppendorf zu je sechs Tubes bei 8000 U/min 20 min zentrifugiert. Die Falcon Tubes wurden anschließend bis zum Bodensatz dekantiert und zweimal durch einen Papierfilter in 2l Glaskolben gegeben.

Zu diesem Zeitpunkt wurden zwei verschiedene Gallepools erstellt:

- Gallepool A = Galle vom Schwein
- Gallepool B = humane Galle, Gewinnung durch ERCP und PTD

Diese Einteilung wurde gewählt, um die Eignung der Galle vom Schwein im Vergleich zu humaner Galle zu prüfen.

Da die Sludgeentstehung unter kontrollierten Bedingungen ausgelöst werden sollte, musste die Galle zuvor steril sein, um mit ausgewählten Bakterien beimpft werden zu können.

Die gefilterte Galle wurde in 500ml Comboflex Transfusionsbeutel zu je 400ml umgefüllt, um sie anschließend in der Transfusionsmedizin in einem Blutbestrahlungsgerät 9 min mit 30 Grey zu bestrahlen.



Um die Keimfreiheit nachzuweisen, wurden stichprobenartig einige Milliliter auf Nähragarplatten gegeben und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Es konnte keine Keimbesiedelung festgestellt werden.

## **Bakterienkultur**

### **Ansetzen der Bakterienkultur**

Ein E.coli Stamm der Firma Stratagen mit der Bezeichnung XL 10 Gold wurde für den Versuch eingesetzt.

Zuerst wurden die Bakterien vermehrt. Dafür wurden einige Mikroliter der Bakteriensuspension in einen Erlenmeierkolben mit Flüssig-LB-Medium übertragen und über Nacht bei 37°C und 100upm im Schüttler inkubiert.

In einem nächsten Schritt wurde die zuvor über Nacht inkubierte Bakteriensuspension zu jeweils 1ml mit 250µl Glycerin in Eppendorf-Tubes gefüllt und bei minus 80°C gelagert.

Um die Konzentration der Keime pro Milliliter bestimmen zu können wurde aus der Bakteriensuspension eine serielle Verdünnungsreihe in logarithmischen Schritten bis zur 8. Potenz erstellt. Von der siebten und achten Verdünnung wurden je 50µl auf Agaroseplatten aufgebracht, mit einem Glasspatel ausgestrichen und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die entstandenen Kolonien auf den Agaroseplatten wurden manuell ausgezählt, wodurch eine mittlere Keimzahl von  $2 \times 10^{12}$  festgestellt werden konnte. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Versuchen zu erzielen, wurde eine mittlere Keimzahl von  $2 \times 10^6$  Keimen pro Milliliter Galle benötigt. Hierfür wurde die Bakteriensuspension in zwei Schritten zu jeweils 1:100 verdünnt, wodurch eine Bakteriensuspension mit  $2 \times 10^8$  Keimen erreicht wurde.

### **Test auf $\beta$ -Glucoronidase Aktivität**

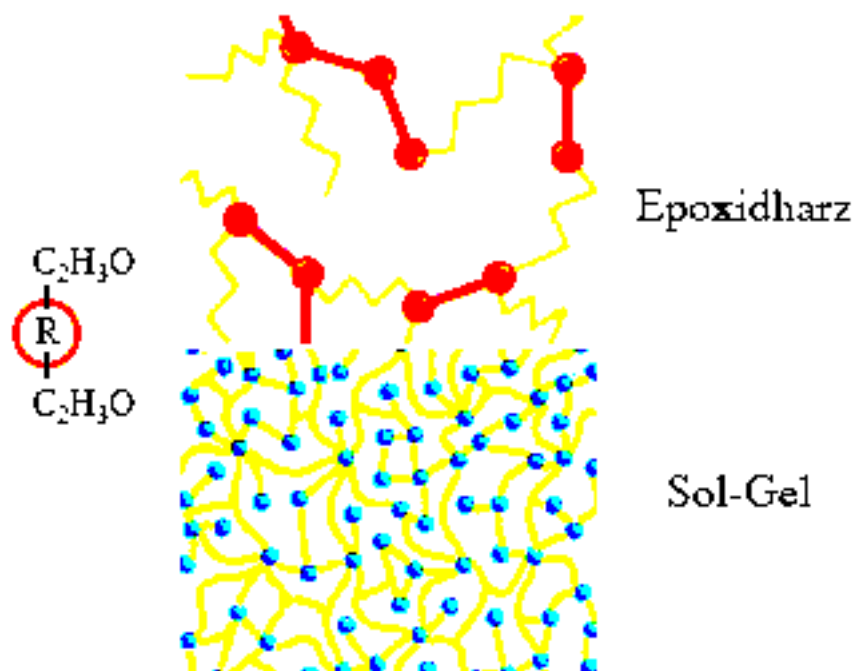
Nach der Vermehrung der Bakterien wurde die bakterielle  $\beta$ -Glucoronidase-Aktivität in einer Untersuchung des *Mikrobiologischen Instituts des UKE* in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Fischer gesichert. Zum Nachweis diente das Identifizierungssystem für Enterobakterien der Firma bioMérieux ID 32 E.



Abbildung 6: Test auf  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität

### **Sol-Gel-Beschichtung**

Die bei diesem Versuch angewandte Sol-Gel-Beschichtung wurde in 2 Schritten durchgeführt. Zuerst reagiert ein organisches Epoxid mit einem organischen Silian (Funktionalisierung), dann erfolgt die katalytisch angeregte Polymerisation.



Die Applikation auf Oberflächen ist mit den in der Lacktechnik üblichen Verfahren wie Sprühen, Tauchen, Fluten oder Schleudern möglich. In diesem Versuch wurden die Proben durch Tauchen beschichtet.

Ferner wird durch Zugabe speziell entwickelter Oberflächenstabilisatoren („Primer“) die Haftungsstabilität verbessert.

### **Vorbereitung und Beschichtung der Stents**

Die Herstellung und Beschichtung der Stents erfolgte in den Räumen der Firma Grosse-Medizintechnik.

Zuerst wurde aus einem Teflonschlauch von 10 French Durchmesser 2cm lange Stücke geschnitten und anschließend mit einem speziell angefertigten Schneiderrohr in Längsrichtung halbiert. An einem Ende der Teflon-Stents wurde mit einem Lochstanzer ein Loch gestanzt, um dort einen Halterungshaken anzubringen. Mithilfe des Hakens konnten die Proben in die Flüssigmedien eingetaucht und zum Abtropfen und Trocknen auf ein Drahtgestell aufgehängt werden.

Im folgendem werden die Beschichtungskomponenten erläutert:

<b>EP19:</b>	ist ein niedermolekulares Epoxidharz (190 Mol) mit überwiegend hydrophoben organischen Anteilen
<b>EP50:</b>	ist ein hochmolekulares Epoxidharz (500 Mol) mit noch stärker organischen Anteilen
<b>AE:</b>	ist eine Kopplungssubstanz (Aminoetoxysilan)
<b>Primer thick</b>	ist ein Oberflächenstabilisator, 1:1 verdünnt mit Xylol
<b>Primer thin</b>	ist ein Oberflächenstabilisator, 1:4 verdünnt mit Xylol

Nachfolgend wird die Beschichtungsdurchführung beschrieben:

Beschichtungsdurchführung
5 min Tauchen 5 min Abtropfen 5 min Tauchen 5 min Abtropfen 60 min bei 150°C

Anhand des oben beschriebenen Schemas wurden Proben mit EP19 und EP50 beschichtet.

Dabei wurden jeweils Verdünnungsreihen von den Sol-Gel-Beschichtungen erstellt, um verschiedene Schichtdicken zu erhalten. Diese wurden für das niedermolekulare Epoxidharz Sol-Gel **EP19AE1**, **EP19AE2** und **EP19AE3** genannt und für das hochmolekulare Epoxidharz Sol-Gel **EP50AE1**, **EP50AE2** und **EP50AE3** genannt.

Um eine bessere Oberflächenstabilität zu erhalten wurde jeweils die Verdünnung 3 der Sol-Gel-Beschichtungen EP19 und EP 50 mit den Oberflächenstabilisatoren „Primer“ beschichtet. Dafür wurden zwei verschiedene Primer („thick“ und „thin“) benutzt.

Probe	Beschichtungsdurchführung
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 5 min Tauchen</li> <li>2. 5 min Abtropfen</li> <li>3. 30 min bei 80°C Trocknen</li> </ol>

Diese Beschichtungen wurden **EP19AE3+thick**, **EP50AE3+thick**, **EP19AE3+thin** und **EP50AE3+thin** genannt.



**Abbildung 7: Beschichtete Stents beim Abtropfen**

Mit jedem Material wurden jeweils 16 Teflonstentstücke beschichtet. Die beschichteten Stücke wurden nach dem Trocknen einzeln in Plastikhüllen luftdicht eingepackt und bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt.



**Abbildung 8** Verpackte Stentstücke

### ***Versuchablauf***

Von jeder Beschichtung wurden jeweils 3 Stücke in Galle vom Schwein und 6 Stücke in humaner Galle über 42 Tage inkubiert. Als Positivkontrolle für vermehrte Sludgebildung wurde zusätzlich unbeschichtetes Teflon Material untersucht.

Um später bei der Beurteilung objektive Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Proben durch Nummerierung von 1-10 und die 2 Galletypen mit A und B verblindet von einer unabhängigen Person. Die Verblindung wurde erst nach der Auswertung aufgelöst.

Anschließend wurden die Felder von 8 12-Well-Plates nummeriert. In jedes Loch der 12-Well-Plates wurde eine Probe waagrecht und längs mit Hilfe einer Pinzette gelegt. In einem nächsten Schritt wurde die in Komboflex-Beutel gefüllte Galle im Wasserbad bei 36°C und die Bakteriensuspension schonend bei Zimmertemperatur aufgetaut. Der Schlauch der Komboflex-Beutel wurde mit einer Kanüle angestochen und mit einer 5ml Einmalspritze 3ml einer der Galletypen in das jeweils gekennzeichnete Loch gegeben.

Als nächstes wurde jedem Loch mit einer Eppendorfpipette 30µl der Bakteriensuspension zugesetzt, um eine definierte Anzahl von  $2 \times 10^6$  Keimen / ml Galle zu erhalten.

Die 12-Well-Plates wurden nach dem Befüllen mit einem Deckel verschlossen. Zudem wurden je 3 gestapelt und mit Parafilm abgedichtet, um ein für E.coli geeignetes sauerstoffarmes Milieu zu schaffen, und eine vermehrte Kontamination von außen zu verhindern.

Insgesamt wurden die Präparate 42 Tage bei 37 °C im Wärmerraum inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben mithilfe des oben beschriebenen Schwenkapparates 10 mal pro Minute in einem definierten Winkel hin- und hergeschwenkt um eine ähnliche

Entstehung des Biofilms wie unter in-vivo Bedingungen zu erhalten und um den physiologischen Gallefluss durch einen Stent zu imitieren.

Das Bakterienwachstum wurde mit täglichen Ausstrichen auf Agaroseplatten kontrolliert. Um einen Mangel an Nährstoffen zu vermeiden, wurde bei den Ansätzen alle zwei Tage 1 ml Galle entnommen und durch 1 ml frischer Galle aus dem Pool ersetzt. Alle vier Tage wurde der komplette Bakterienansatz analog des oben beschriebenen Inkubationsansatzes ausgetauscht.

Der korrekte Versuchsablauf wurde zweimal täglich, jeweils morgens und abends kontrolliert.

## ***Rasterelektronenmikroskopie (REM)***

### **Stentvorbereitung**

Nach 42 Tagen wurde die Inkubation der Proben beendet und die Auswertung vorbereitet.

Die Proben wurden zunächst von den flüssigen Gallebestandteilen befreit und anschließend mit PBS-Phosphatpufferlösung (PBS DUBLECCO'S, Ca, Mg, Natrium, Bicarbonat) gespült.

8 neue 12-Well-Plates wurden analog zu den verwendeten, beschriftet und mit 3%iger Glutaraldehyd-Lösung in 0,05% Phosphatpuffer gefüllt.

Glutaraldehyd diente zur Fixierung der biologischen Beläge auf der Stentoberfläche.

Die Proben wurden 5 Tage in Glutaraldehyd bei 7°C aufbewahrt.

Nach der Fixierung mit Glutaraldehyd erfolgte die endgültige Vorbereitung der Proben in Zusammenarbeit mit Klaus Sievert und dem Institut für Neuroanatomie des UKE für die REM-Untersuchung.

Zwei verschiedene Trocknungsarten die Alkohol- und die Lufttrocknung wurden verglichen. Das Glutaraldehyd wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Proben wurden anschließend mehrfach mit einem PBS-Puffer gespült.

Die Proben 31-94 sollten mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden.

Es wurde aus Ethanol absolut 100% und Aqua bidest. eine aufsteigende Alkoholreihe von 35%, 50%, 70%, 96% und 100% in autoklavierten Glasflaschen hergestellt.

Hinterher wurden die Proben für jeweils 15 min der aufsteigenden Alkoholreihe ausgesetzt. Dabei wurden die Wells wechselnd mit je 4 ml Alkohol-Lösung befüllt und mittels Wasserstrahlpumpe geleert.

Die Proben von 1-30 wurden nach Entfernung des PBS-Puffers vorsichtig in saubere Zellkulturplatten eingelegt und über Nacht bei Zimmertemperatur luftgetrocknet.

Anschließend wurden die gesamten Proben auf eine Länge von ca. 1 cm gekürzt, wobei die Seite mit dem gestanzten Loch abgeschnitten und verworfen wurde. Anschließend wurden die Stücke auf Stiftprobenteller mit Leitsilber befestigt und mit einem nicht wasserlöslichen Stift auf der Unterseite der Stifttellerproben beschriftet. Bis zum weiteren Verarbeiten wurden die Proben in einem mittels Vakuumpumpe evakuiertem Exsikkator mit Silicagel gelagert. Die vom Kürzen übergebliebenen Reste wurden verworfen.

## **Besputtern**

Bei der Rasterelektronenmikroskopie entsteht das Bild durch Beschuss mit Elektronen in einem definierten Areal (Raster). Die Oberfläche muss eine leitfähige Schicht haben, da es durch den Beschuss von Elektronen auf nicht leitfähige Areale zu Aufladungen und somit zu Bildstörungen kommt. Dies wird durch Besputtern mit Gold vermieden.

Die Besputterung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Riazi in der TU-Harburg mit einem Edwards Sputter Coater. Die Besputterung wurde nach den Anweisungen von Dr. Riazi durchgeführt.

Die Besputterung:

1. Belüften des Besputterungsraumes
2. Einbringen von 6 Stiftprobentellern
3. Abpumpen des Besputterungsraums
4. Spülen des Besputterungsraums mit Argon
5. Einstellen des Vakuums auf 6-7mbar
6. Einstellen des Zeitschalters auf 20 min
7. Einregeln des Stromes auf 25mA
8. Belüften des Besputterungsraumes
9. Entnahme der besputterten Proben

Die Schichtdicke der Besputterung lag ca. bei 10-15nm.

## **Funktion des Rasterelektronenmikroskops**

### **Grundprinzip**

Beim Rasterelektronenmikroskop wird die Elektronenoptik dazu benutzt, die an der Kathode austretenden Elektronen in einem sehr feinen Leuchtfleck auf der Probenoberfläche (am Rasterpunkt) zu bündeln. Die als Folge der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe auftretende Sekundärstrahlung lässt sich den Koordinaten dieses Leuchtflecks genau zuordnen. Durch Nachweis der gestreuten Elektronen sowie der Röntgenstrahlung und ihre Analyse mit Detektoren und zugehöriger Elektronik lässt sich eine "Landkarte" der Leuchtflecke und ihrer Strahlungscharakteristika herstellen. Diese stellt sich dann als Bild auf dem Monitor dar und kann zur Dokumentation photographiert werden.

### **Kriterien der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung**

Um die einzelnen Proben miteinander zu vergleichen, wurden Kriterien für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung festgelegt.

Dafür wurden die Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop auf die folgenden Punkte hin untersucht:

- Schäden der Beschichtung
- Trocknungsartefakte
- Ablagerungen auf der Oberfläche
- Form, Schichthöhe und Flächenanteil der Ablagerungen

Die Beurteilung erfolgte stets durch zwei Personen. Dazu wurde jede Probe zuerst bei der kleinsten Vergrößerung mäanderförmig durchgemustert, um eine Übersicht zu gewinnen. Die genaueren Beurteilungen der Oberfläche erfolgten mit bis zu 5.000fach reichenden Vergrößerungen. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden von jeder Probe fünf Bilder mit unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht.



**Tabelle 3: Zustand der Beschichtung**

<b>Beschichtung</b>	<b>Punkte</b>
Voll intakt	10
90% intakt	9
80% intakt	8
70% intakt.	7
60% intakt	6
50% intakt	5
40% intakt	4
30% intakt	3
20% intakt.	2
10% intakt.	1

Um die Stabilität der einzelnen Beschichtungen beurteilen zu können, insbesondere eventuelle Unterschiede durch den speziellen Oberflächenstabilisator zu erkennen wurde jede Probe bei der kleinsten Vergrößerung beginnend durchmustert und nach der Tabelle 3 bewertet. Dabei wurde die Probe umso besser beurteilt je intakter, also je stabiler die Beschichtung war. Aus diesen Stabilitätsscore wurden Mittelwerte der einzelnen Kollektive errechnet.

**Tabelle 4: Fläche der Ablagerung**

<b>Fläche der Ablagerung</b>	<b>Punkte</b>
< 10%	10
< 20%	9
<. 30%	8
< 40%	7
< 50%	6
< 60%	5
< 70%	4
< 80%	3
< 90%	2

**Tabelle 5: Höhe der Ablagerung**

<b>Höhe der Ablagerung</b>	<b>Punkte</b>
einschichtig	10
gering mehrschichtig größtenteils einschichtig	5
gering einschichtig größtenteils mehrschichtig	2.5

**Tabelle 6: Form und Verteilung der Ablagerung**

<b>Form und Verteilung der Ablagerung</b>	<b>Punkte</b>
vereinzelt	10
diffus	7.5
netzförmig	5
teilweise rasenförmig	2.5
rasenförmig	0

Die Ablagerungen auf den Proben wurde nach einem Punktesystem beurteilt, welches die Form, Schichthöhe und den Flächenanteil der Ablagerung auf der Oberfläche berücksichtigte. In Tabelle 4 ist zu sehen, dass die Probe umso mehr Punkte erhält, desto geringer der Anteil der mit Ablagerung bedeckten Oberfläche ist, dafür wurden die Proben in verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Die erreichten Punkte stellten den Flächenscore dar.

In Tabelle 5 erhielt die Probe umso mehr Punkte umso geringer die Höhe der Ablagerung war, dies ergab den Höhengscore einer Probe.

Die Form und Verteilung der Ablagerung wurde ebenfalls unter verschiedenen Vergrößerungen nach einen Punkteschema bewertet (s. Tabelle 6).

Um die Ablagerungstendenz der verschiedenen Beschichtungen beurteilen zu können, wurde aus der Summe von Flächenscore und Höhengscore der Ablagerungsscore erstellt und dessen Mittelwert für die einzelnen Kollektive errechnet.

**Tabelle 7: Ausmaß der Trocknungsartefakte**

<b>Trocknungsartefakte</b>	<b>Punkte</b>
gering	10
mittel	5
stark	0

Zwei Trocknungsarten, die Alkohol- und die Lufttrocknung, wurden miteinander verglichen.

Die Beurteilung der Proben wurde rasterelektronenmikroskopisch bei der kleinsten Vergrößerung beginnend durchgeführt. Dabei wurden für geringe bis keine Trocknungsartefakte 10 Punkte, für mittelstarke Trocknungsartefakte 5 Punkte und für starke Trocknungsartefakte 0 Punkte vergeben.

Die Summe dieser Punkte für eine Trocknungsart ergab den Trocknungsartefaktscore. Je größer der Trocknungsartefaktscore war, desto geringere Trocknungsartefakte zeigten sich in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung in diesem Kollektiv.

# Ergebnisse

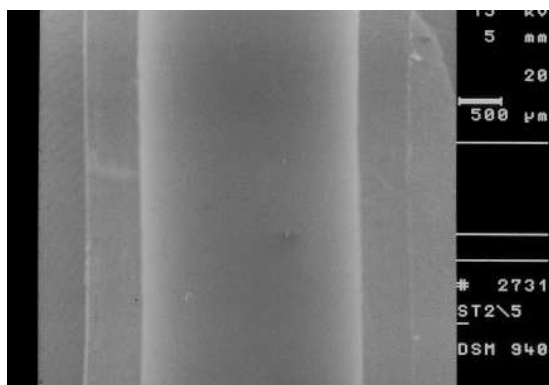
## ***Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung***

Jede Probe wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop einzeln durchmustert und nach den oben genannten Kriterien beurteilt. Es wurden 11 verschiedene Oberflächenbeschichtungen auf insgesamt 94 Proben untersucht. Auf allen Proben konnten Ablagerungen in unterschiedlichem Ausmaß gesehen werden. Die Ablagerung bestand aus stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, sowie Konglomeraten aus amorphen Strukturen und Kristallen. Auf einigen Oberflächen mit stärkerer Ablagerungen waren die Bakterien mehrschichtig teilweise mit faden- bis netzartigen Strukturen miteinander verbunden. Diese Strukturen entsprechen in Form und Größe den Glykokalyx-Brücken von Bakterien. Oberflächen mit geringer Ablagerung zeigten hingegen nur eine vereinzelte diffuse Verteilung mit stäbchen- und kokkoidförmigen Bakterien.

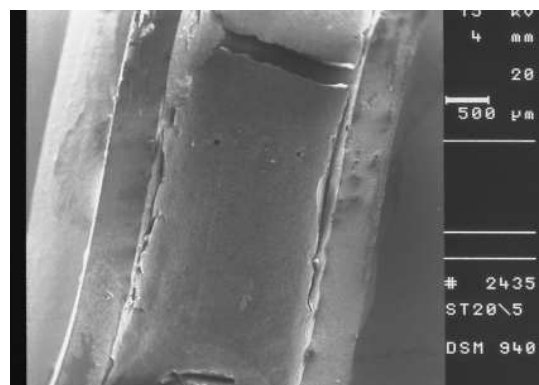
## **Vergleich der Alkohol- und Lufttrocknung**

Hierfür wurden wie oben beschrieben in jedem Probenkollektiv sechs Proben mit Alkohol getrocknet und drei Proben luftgetrocknet.

Nach den in Tabelle 7 beschriebenen Beurteilungskriterien wurden die Proben bewertet.



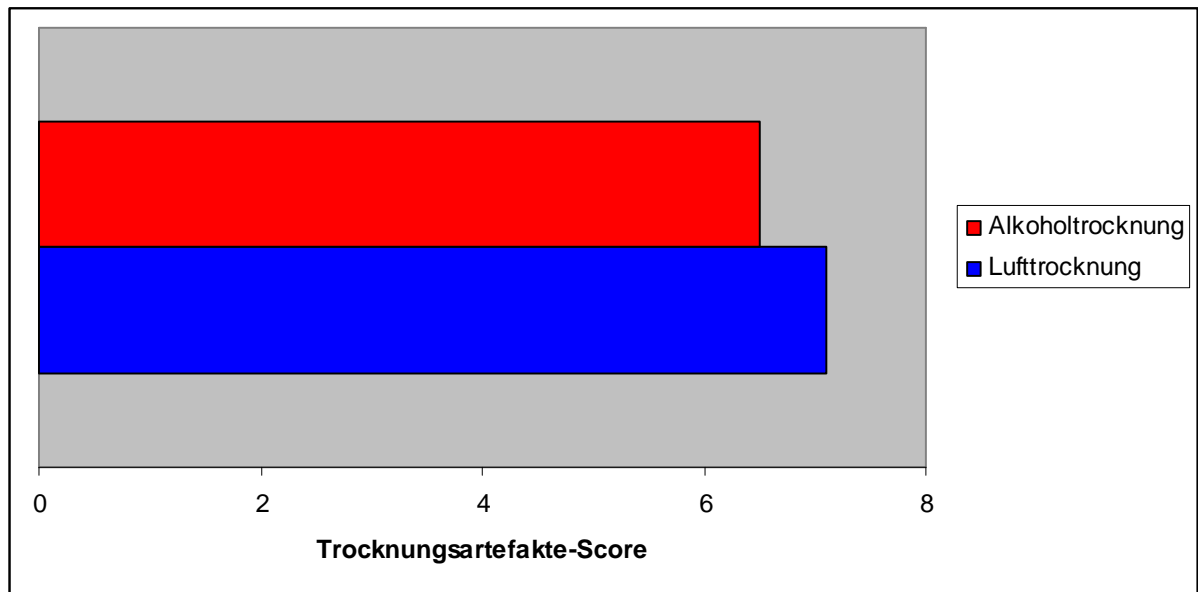
**Abbildung 9: Probe ohne Trocknungsartefakte**



**Abbildung 10: Probe mit starken Trocknungsartefakten**

Der t-Test unter Annahme gleicher Varianz zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Trocknungsarten.

**Diagramm 1: Alkohol- vs. Lufttrocknung**



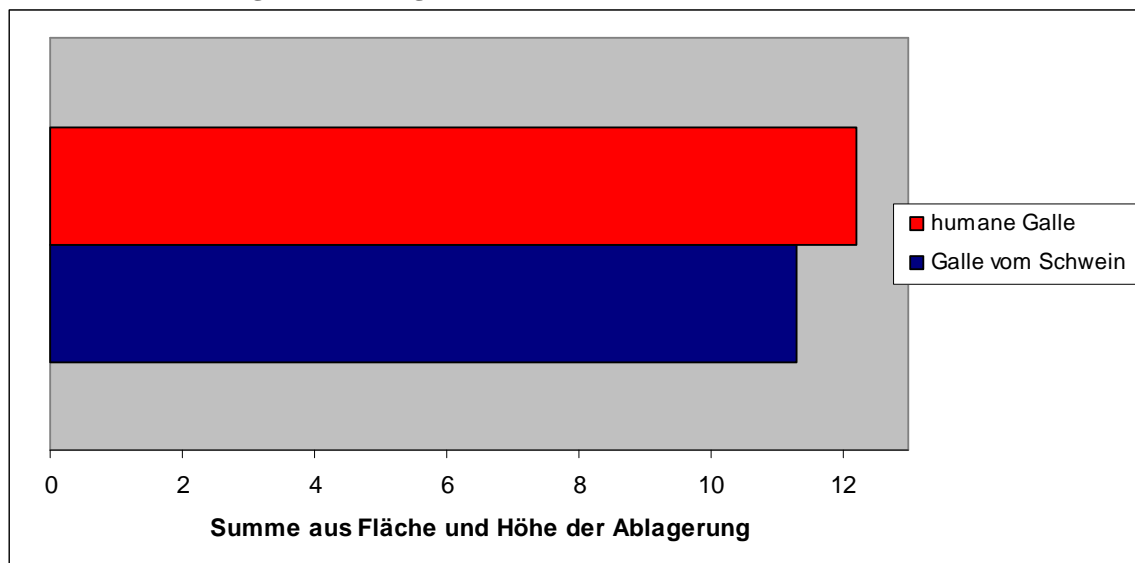
Im Diagramm wurden die Mittelwerte des Trocknungsartenfaktors der jeweiligen Trocknungsarten gegeneinander aufgetragen.

### **Vergleich der Ablagerungsneigung von humaner Galle und Galle vom Schwein**

Von jeder getesteten Beschichtungsart wurden 2/3 der Proben mit humaner Galle und 1/3 der Proben mit der Galle vom Schwein gespült.

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurde die Ablagerungstendenz auf der Oberfläche der Proben nach den oben angegebenen Kriterien beurteilt. Der t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Ablagerung zwischen der menschlichen Galle und der Galle vom Schwein.

**Diagramm 2: Vergleich humane Galle und Galle vom Schwein**



Im Diagramm sind die Mittelwerte aus der Summe der Punktzahlen von der Fläche und Höhe der Ablagerung von den zwei verschiedenen Galletypen gegeneinander aufgetragen.

## **Beurteilung der einzelnen Kollektive**

### **EP19AE1**

Bei sieben Proben war die Beschichtung vollständig intakt. Lediglich bei zwei mit Alkoholreihe getrockneten Proben waren leichte Defekte in Form von gering ausgeprägter Wellungen der Beschichtung zu sehen. Die drei Proben, die luftgetrocknet wurden, zeigten keine Defekte der Beschichtung. Sieben von neun Proben dieses Kollektivs zeigten eine geringe Ablagerung. Diese bestand aus stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, die sich vereinzelt und teilweise diffus versprenkelt auf der Oberfläche verteilten (Abb. 15-18). Zwei Proben, wovon eine mit infizierter humaner und die andere mit infizierter Galle von Schwein gespült wurde, zeigten eine mehrschichtige rasenförmige Bedeckung der Oberfläche durch Ablagerungen aus stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, die miteinander netzartig verbunden waren (Abb. 19).

## **EP19AE2**

Bei vier der neun Proben war die Beschichtung vollständig intakt. Drei Proben zeigten leichte Defekte an der Beschichtung. Eine Probe, welche mit einer Alkoholreihe getrocknet worden war, hatte mittelstarke Defekte in der Beschichtung. Eine luftgetrocknete Probe wurde hatte starke Schäden an der Beschichtung.

In diesem Kollektiv zeigte sich eine mittelstarke Ablagerung. Die Ablagerung bestand aus gleichmäßig locker verteilten stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, welche die ganze Oberfläche der Probe bedeckten (Abb. 19, 20, und 22). Auf zwei Proben war auf ca. 1/5 der Oberfläche eine mehrschichtige schollenartig aufgetriebene Ablagerung aus kokkoiden und stabförmigen Bakterien zu sehen. Die Bakterien hatten sich zu Konglomeraten angehäuft, waren netzartig durch fadenartige Strukturen miteinander verbunden und teilweise in einer amorphen Masse eingebettet (Abb. 21). Von diesen Proben wurde jeweils eine mit humaner und die andere mit Galle vom Schwein gespült.

## **EP19AE3**

Bei acht von neun Proben war die Beschichtung intakt. Lediglich bei einer Probe, die luftgetrocknet worden war, hatte sich die Beschichtung von der Oberfläche gelöst und fehlte auf ca. der Hälfte der Fläche ganz. In diesem Kollektiv zeigte sich bei drei Proben, die mit humaner Galle gespült worden waren eine mittelstarke Ablagerung und bei sechs Proben eine starke Ablagerung. Bei den Proben mit starker Ablagerung zeigte sich eine mehrschichtige rasenförmige Ablagerung die bei vier Proben schollenartig aufgetrieben war. Diese Proben waren mit Alkohol getrocknet worden. Die Ablagerung bestand aus stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, welche mit faden- bis netzartigen Strukturen miteinander verbunden waren und sich zu großen Konglomeraten angehäuft hatten. Vereinzelt waren auch amorphe Strukturen zu sehen, in denen Kristalle und Bakterien eingebettet waren. Die drei Proben mit einer mittelstarken Ablagerung zeigten eine einschichtige netzartige Ablagerung von Bakterien. Tendenziell zeigten die drei Proben, die mit Galle vom Schwein gespült worden waren, eine etwas stärkere Ablagerungsneigung und hatten einen niedrigeren Ablagerungsscore als die sechs Proben, die mit humaner Galle gespült worden waren.

### **EP19AE3+thin**

Die Beschichtungen von fünf der neun Proben war fast vollkommen intakt, bei den anderen vier von denen jeweils zwei luftgetrocknet und zwei mit einer Alkoholreihe getrocknet worden waren, waren die Beschichtung wellig und blasig aufgeworfen oder teilweise abgeplatzt, so dass bei diesen ca. die Hälfte der Beschichtungen intakt waren (Abb.: 27). Dieses Kollektiv zeigte insgesamt eine mittelstarke Ablagerung. Bei fünf der neun Proben zeigte sich eine geringe Ablagerung, bestehend aus stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, davon waren drei Proben mit humaner Galle und zwei Proben mit Galle von Schwein gespült worden. Teilweise waren in großen Arealen der Probenoberflächen nur vereinzelt Bakterien zu sehen. An anderen Stellen wiederum bildeten sich größere Gruppen von bakteriellen Ansammlungen (Abb. 30). Vier der Proben, wovon zwei mit humaner und zwei mit Galle vom Schwein gespült wurden, zeigten eine die gesamte Oberfläche einnehmende einschichtige Ablagerung von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, die sich nur stellenweise zu mehrschichtigen Konglomeraten anhäuferten. Teilweise waren auch sludgeartige Strukturen zu sehen, wo Kristalle und Bakterien eingelagert waren (Abb. 28 und 29).

### **EP19AE3+thick**

Die Beschichtungen von vier der neun Proben waren fast vollständig intakt, drei dieser Proben waren mit der Alkoholreihe getrocknet und eine der Proben war luftgetrocknet. Bei drei Proben war die Beschichtung zu ca. 1/3 aufgeplatzt. Von diesen waren zwei mit Alkohol getrocknet und eine luftgetrocknet. Bei den zwei Proben die mit Alkohol getrocknet worden waren, hatte sich die Beschichtung an dieser Stelle aufgerollt.

Bei vier Proben konnte man eine versprenkelte Ablagerung von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien sehen. Große Areale waren frei von Bakterien, jedoch sah man an einigen kleinen Stellen Anhäufungen von Bakterien (Abb. 31-33). Bei drei Proben, wovon zwei mit Galle vom Schwein und eine mit humaner Galle gespült worden war, zeigte fast die gesamte Oberfläche eine Ablagerung von einschichtig bis mehrschichtigen stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, so dass nur geringe spaltartige Areale zwischen den Bakterienkolonien übrig waren. Zwei Proben, von denen eine mit humaner und die andere mit Galle vom Schwein gespült worden war, zeigten eine starke Ablagerung auf der gesamten Oberfläche. Die Ablagerung bestand teilweise aus

amorphen Strukturen, in die stäbchenförmige und kokkoide Bakterien eingebettet waren, die von fadenartigen Strukturen durchzogen wurden (Abb. 34).

### **EP50AE1**

Insgesamt zeigte sich in diesem Kollektiv eine gute Stabilität der Beschichtung mit einer mittelstarken Ablagerung. Bei drei von neun Proben waren Blasen in der Beschichtung erkennen, die ca. eine Fläche von 20-30 % ausmachten (Abb. 35), davon waren zwei Proben mit einer Alkoholreihe getrocknet und eine luftgetrocknet. Die restlichen Proben waren in ihrer Beschichtung nahezu voll intakt. Zwei Proben, wovon jeweils eine mit humaner Galle und die andere mit Galle vom Schwein gespült worden war, zeigten eine versprenkelte Ablagerung von einzelnen Bakterien. Die Ablagerung zeigte teils stäbchenförmig und teils kokkoid Bakterien, vereinzelt waren auch kristallartige Strukturen zu sehen (Abb. 36). Bei drei Proben sah man auf 30-50% der Oberfläche eine krustenartige Ablagerung die sich bei höherer Vergrößerung als mehrschichtige Konglomerate von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien darstellten, welche teilweise durch fadenartige Strukturen miteinander verbunden waren (Abb. 37 und 38). Auf der restlichen Oberfläche war nur eine geringe Ablagerung von verstreuten Bakterien zu sehen. Die Oberflächen von fünf Proben waren fast vollständig von einer amorphen Masse bedeckt, davon waren drei Proben mit humaner Galle und zwei mit Galle von Schwein gespült. In der amorphen Masse waren große Konglomerate von angehäuften Bakterien und kristalloide Strukturen eingebettet.

### **EP50AE2**

Bei sechs von acht Proben war die Beschichtung vollständig intakt. Zwei Proben, wovon eine mit einer Alkoholreihe getrocknet und die andere luftgetrocknet worden war, zeigten gering ausgeprägte Wellenbildungen der Oberfläche auf einer Fläche von ca. 20%.

Bei diesem Kollektiv zeigte sich eine starke Ablagerung. Bei sieben von acht Proben, von denen drei mit Galle vom Schwein und vier mit humaner Galle gespült worden waren, zeigte sich eine starke Ablagerung von einer amorphen Masse auf fast der gesamten Oberfläche. In dieser amorphen Masse waren stäbchenförmige und kokkoide Bakterienkonglomerate eingeschlossen, die über fadenartige Strukturen miteinander vernetzt waren. Außerdem waren vereinzelt kristalloide Strukturen zu erkennen (Abb.



39-42). Eine Probe, die mit humaner Galle gespült worden war, zeigte eine leichte bis mittlere Ablagerung von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien.

### **EP50AE3**

Die Beschichtung der Proben war sehr stabil. Nur eine Probe, die luftgetrocknet wurde, zeigte leichte Risse an den Seitenrändern. Bei den restlichen Proben war die Beschichtung intakt. Insgesamt zeigte sich eine mittelstarke Ablagerung. Teilweise konnte man an einigen Stellen Sludge erkennen. In dem Sludge waren stäbchenförmige und kokkoide Bakterien zu sehen, die sich zu mehrschichtigen Haufen türmten (Abb. 44 und 46). Die restlichen Bereiche der Oberflächen wiesen eine teils einschichtige teils mehrschichtige Ablagerung von Bakterien auf, die sich teilweise auch netzartig auf der Oberfläche ausbreiteten. Hier konnte man auch fadenartige und kristalloide Strukturen sehen (Abb. 45). Die Proben, die mit Galle vom Schwein gespült worden waren hatten einen niedrigeren Ablagerungsscore, und damit eine höhere Ablagerungstendenz.

### **EP50AE3+thin**

Bei drei von neun Proben, von denen eine mit einer Alkoholreihe getrocknet und zwei luftgetrocknet worden waren, zeigte die Oberfläche auf mehr als 50% der Fläche Defekte (Abb. 47). Die Beschichtung hatte sich teilweise von den Rändern ausgehend gelöst und aufgerollt. An einigen Stellen fehlten Teile der Beschichtung. Drei andere Proben, wovon zwei mit der Alkoholreihe getrocknet und eine luftgetrocknet worden waren, wiesen eine fast vollständig intakte Beschichtung auf. Die restlichen Proben zeigten gering ausgeprägte Defekte der Beschichtung in Form von welligen Aufwerfungen.

Insgesamt zeigte sich in diesem Kollektiv eine starke Ablagerung. Nur zwei Proben, die mit humaner Galle gespült wurden, wiesen eine geringe Ablagerung von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien auf (Abb. 47). Die Ablagerungen befanden sich in den Arealen der Beschichtung, welche wellig aufgeworfen waren. Der restliche Bereich der Beschichtung zeigte nur vereinzelte Ablagerungen von einzelnen Bakterien. Die restlichen sieben Proben, von denen drei mit Galle vom Schwein und vier mit humaner Galle gespült worden waren, wiesen eine mittelstarke bis starke Ablagerung von Sludge auf (Abb. 48 und 49). In der amorphen Masse waren stäbchenförmige und kokkoide Bakterien, die sich zu großen Konglomeraten auftürmten und von fadenartigen Strukturen durchzogen wurden. Bei einigen Proben war die Ablagerung in einigen

Bereichen schollenartig aufgeworfen und die Oberfläche konnte nur zwischen den Spalten der Schollen gesehen werden.

### **EP50AE3+thick**

Die Beschichtungen von drei Proben, von denen eine mit einer Alkoholreihe getrocknet und zwei luftgetrocknet worden waren, zeigten fast keine Defekte (Abb. 51). Drei andere Proben, die mit der Alkoholreihe getrocknet worden waren, wiesen eine intakte Beschichtung von unter 80% auf. Die Beschichtung hatte sich teilweise von den Rändern abgelöst und aufgerollt. Die Beschichtung einer Probe, welche luftgetrocknet worden war, hatte sich zum Teil krustenartig abgelöst und teilweise aufgerollt. Dieses Kollektiv zeigte eine mittelstarke Ablagerungsneigung. Die Proben zeigten alle Konglomerate von stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 53). Drei Proben, welche mit humaner Galle gespült worden waren, zeigten auf einer Fläche von ca. 20% krustenartige Ablagerungen (Abb. 52), die aus Bakterien und kristalloiden Strukturen bestand (Abb. 54). Die restlichen Proben wiesen eine mehrschichtige Ablagerung von Bakterien, die sich zu großen schollenartigen Gruppen zusammengeschlossen hatten und durch fadenartige Strukturen netzartig miteinander verbunden waren. Teilweise waren die Bakterien auch in einer amorphen Masse eingeschlossen.

### **Teflon**

Es wurden neun unbeschichtete Proben untersucht. Die Oberfläche einiger der unbeschichteten Proben zeigten schollenartige Aufwerfungen der Ablagerung (Abb. 55). Insgesamt präsentierte sich in diesem Kollektiv eine starke Ablagerung. Bei den Proben zeigte sich eine größere Ablagerung an den Seitenrändern als im Lumen. Teilweise breitete sich der Sludge auch vom Rand ausgehend in das Lumen aus. Er bestand wie bei den beschichteten Prothesen hauptsächlich aus mehrschichtigen, zu Konglomeraten angeordneten stäbchenförmigen und kokkoiden Bakterien, die von fadenartigen Strukturen durchzogen wurden (Abb. 56-58). Kleine Bereiche der Oberfläche zeigten eine geringere einschichtige Ablagerung von Bakterien, die teilweise über kurze Ketten netzartig miteinander verbunden waren.

## Wirkung des Primers auf Oberflächenstabilität und Grad der Ablagerung

Um die Wirkung des Primers zu untersuchen, wurden Sol-Gel Beschichtungen mit und ohne den zusätzlichen Oberflächenstabilisator hergestellt. Bei der rasterelektromikroskopischen Untersuchung der Proben, wurden diese nach den oben genannten Kriterien beurteilt.

Diagramm 3: Wirkung des Primers auf die Stabilität der Beschichtung

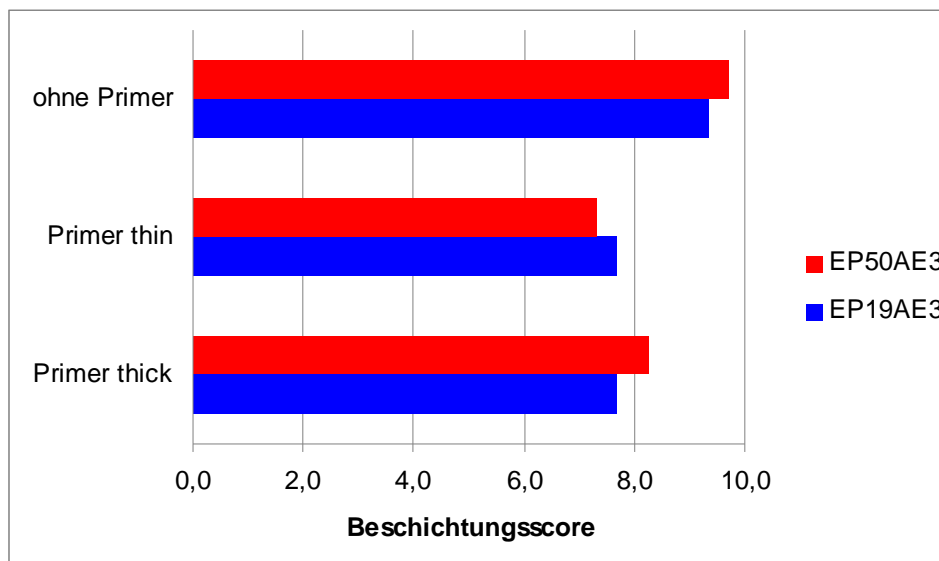
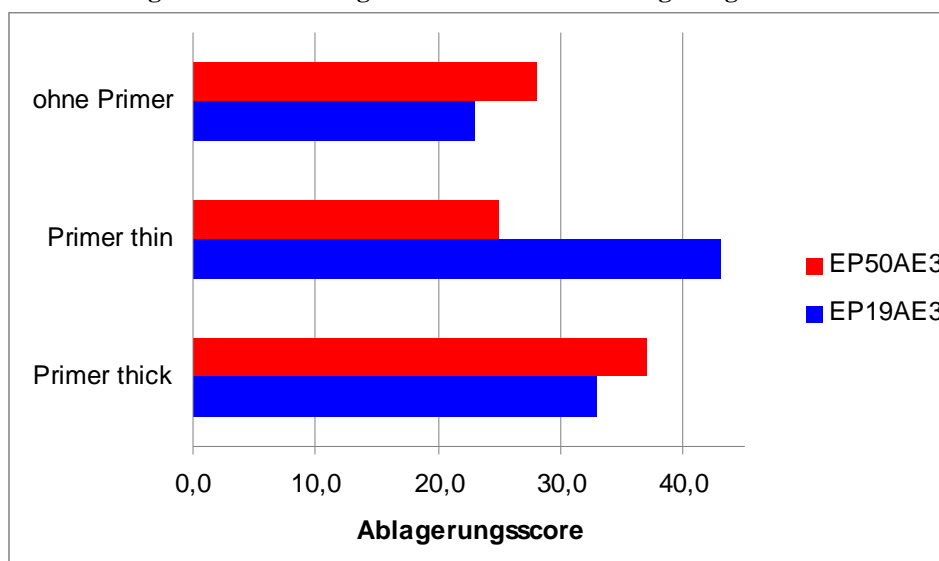


Diagramm 4: Wirkung des Primers auf die Ablagerungstendenz

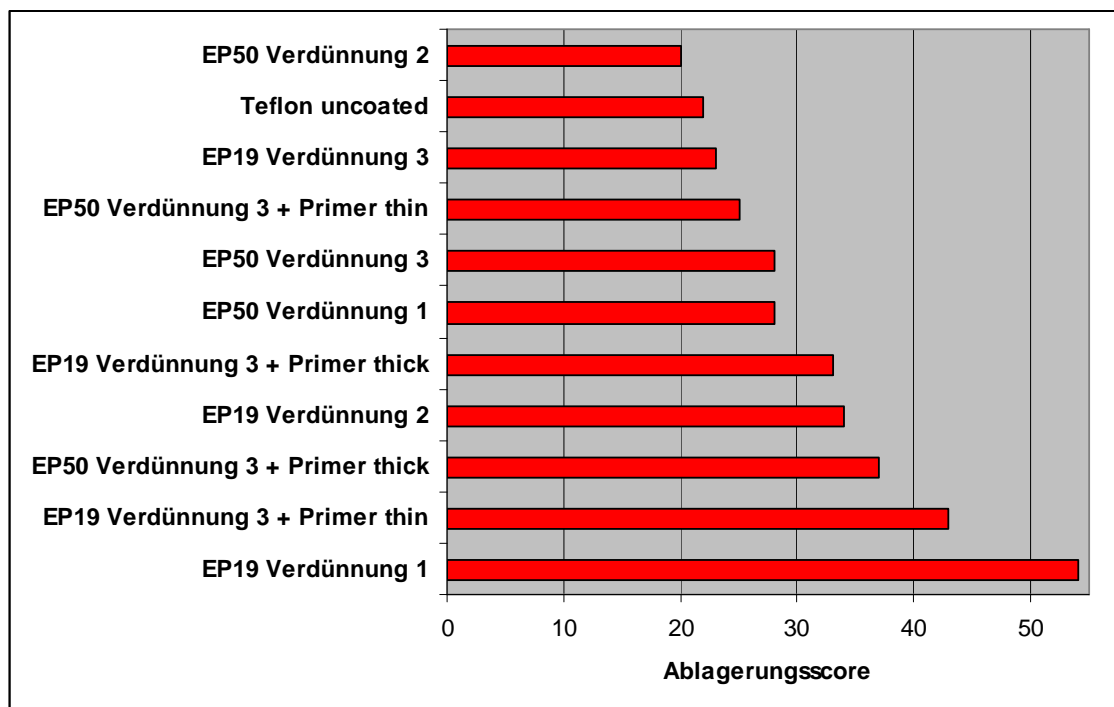


Im Vergleich zu den Sol-Gel-Beschichtungen ohne zusätzlichen Oberflächenstabilisator zeigte sich, dass durch einen zusätzlichen Primer keine Verbesserung der Stabilität der Beschichtung erreicht wird. Durch den Primer thick zeichnete sich sowohl bei der Beschichtung EP50AE3 als auch bei der Beschichtung EP19AE3 eine geringere Ablagerungstendenz ab.

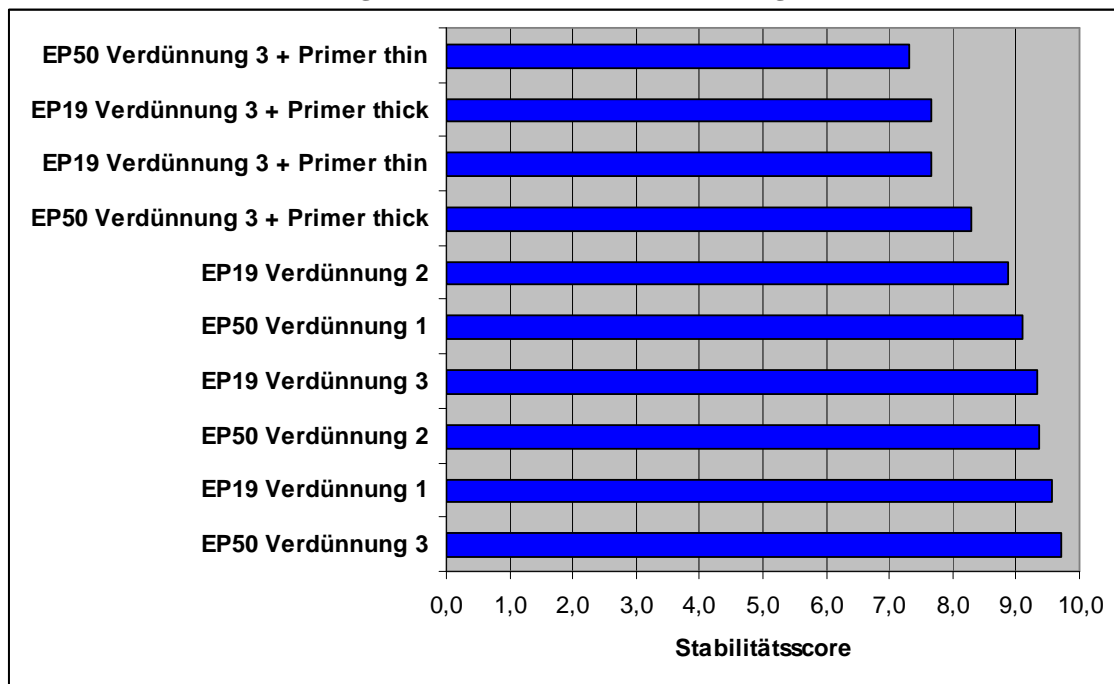
## Vergleich der Kollektive miteinander

Aus den Mittelwert des Ablagerungsscore und dem Mittelwert des Beschichtungsscores wurden die Diagramm 5 und 6 erstellt.

**Diagramm 5: Ablagerungsneigung der Beschichtung**



**Diagramm 6: Stabilität der Beschichtungen**



In den Diagrammen wurden der Ablagerungsscore und der Stabilitätsscore für die verschiedenen Beschichtungen dargestellt. Die Ablagerungstendenz ist am geringsten bei den Proben, die den größten Ablagerungsscore aufweisen. Die Stabilität der Beschichtung ist umso größer, je größer der relative Stabilitätsscore ist.

Das Diagramm zeigt, dass die Stabilität bei den meisten Kollektiven mit gut zu bewerten ist. Die Sol-Gel-Beschichtungen, welche mit einem zusätzlichen Primer versehen wurden, schnitten auch im Gesamtvergleich schlechter ab als die anderen Kollektive. Die verschiedenen Beschichtungen zeigten jedoch in Ihrer Ablagerungstendenz Unterschiede. Außer der Beschichtung EP50AE2, wiesen alle Beschichtungen eine geringere Ablagerungsneigung als die unbeschichtete Teflonprothese auf. Hervorzuheben ist jedoch die Sol-Gel-Beschichtung EP19AE1, welche sowohl eine gute Stabilität der Beschichtung zeigte als auch die geringste Ablagerung auf der Oberfläche hatte.

# Diskussion

## **Allgemeines**

Das Problem der Stentverstopfung wurde von verschiedenen Autoren untersucht. Die Verstopfung von Stents geschieht in mehreren Schritten. Zuerst lagert sich eine Proteinschicht auf der Stentoberfläche ab, an diese lagern sich Bakterien mit Hilfe von Glykoproteinen an. In einem nächsten Schritt vernetzen sich die Bakterien untereinander und lagern Kalziumbilirubinstrukturen ein. So entsteht ein fester Biofilm, der Grundbaustein bei der weiteren Sludgeentstehung.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es durch Veränderung der herkömmlichen Oberflächenstruktur durch Sol-Gel-Beschichtungen den Entstehungsprozess von Sludge indem das Anhaften an der beschichteten Oberfläche erschwert wird. Bei schlechtem Anhaften wird Sludge mit der Galle herausgespült.

Zur Beantwortung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragen wurde experimentell Sludgebildung auf Stents erzeugt und rasterelektronenmikroskopische Vergleichsuntersuchungen neuartiger Sol-Gel-Beschichtungen und herkömmlicher Teflonmaterialien durchgeführt.

## **Rasterelektromikroskopische Auswertung**

Durch die Rasterelektronenmikroskopie konnten wir die Bakterien und ihre Vernetzung durch die Glykokalyx und den Sludge erkennen, was den Schluss nahe legt, dass die Methodik unseres Versuchs als geeignet angesehen werden kann.

Außer diesen Strukturen konnten Stabilität und Ablagerungstendenzen der Beschichtungen beurteilt werden. Die Ablagerung auf der Oberfläche konnte in Form und Verteilung beurteilt werden und die bei der Trocknung entstandenen Artefakte wie z.B. Wellen und Risse konnten bewertet werden.

## **Luft- oder Alkoholrocknung**

In vorangegangenen Untersuchungen wurden die Proben nach der Fixierung in Glutaraldehyd zum Wasserentzug einer aufsteigend konzentrierten Alkoholreihe ausgesetzt. Angenommen wurde, dass durch einen direkten Luftkontakt starke Trocknungsartefakte entstehen würden.

Mit dem Ziel, die Methodik zu vereinfachen, wurde diese Annahme untersucht. Dafür wurde in jedem Kollektiv 1/3 der Proben in 12-Well-Plates über Nacht luftgetrocknet.

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Proben mit einem Score bewertet. Die Proben zeigten teilweise Trocknungsartefakte in unterschiedlichen Ausprägungen. Die Ablagerung zeigte durch den Wasserentzug Defekte (Wellen, aufgerollte Bereiche, fehlende Bezirke). Die Alkoholreihentrocknung zeigte bei der Untersuchung keine großen Unterschiede zur Lufttrocknung. Durch das Bewertungssystem, wurden die beiden Kollektive mit einem Zweistichproben t-Test unter Annahme gleicher Varianz getestet. Ein Unterschied ist nicht nachweisbar.

Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese, dass die Alkoholtrocknung keine Vorteile gegenüber der Lufttrocknung bietet.

### ***Humane Galle und Galle vom Schwein***

Die Sammlung von größeren Mengen humaner Galle ist sehr zeitaufwendig, da beispielsweise bei einer ERCP nur ca. 2-27 ml Galle gesammelt werden können.

Da das Schwein ein ähnliches Verdauungssystem wie der Mensch hat und die Galle geschlachteter Schweine in großen Mengen zur Verfügung steht, wurde die Eignung von Galle vom Schwein zur Bespülung von Prothesen in der aktuellen Arbeit untersucht.

Die Auswertung zeigte keinen signifikanten Ablagerungstendenzunterschied. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass zukünftige Studien auf Galle vom Schwein als einfach verfügbare Alternative zur humanen Galle zurückgreifen könnten.

### ***Sol-Gel-Beschichtungen gegen Stentverstopfung durch Sludge***

In diesem aktuellen Versuch bestätigte sich die Überlegenheit, der mit Sol-Gel beschichteten Proben, die durch ein bestimmtes Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Eigenschaften der Oberfläche eine geringere Ablagerungstendenz von Sludge, im Vergleich zu den herkömmlich mit Teflon beschichteten Proben, aufwiesen.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Ablagerung auf der Oberfläche ist, dass durch einen ausgewogenen Mix aus hydrophilen und hydrophoben Eigenschaft so geringe Adhäsionskräfte erzeugt werden, dass schon geringer Oberflächenspannung die Kohäsionskräfte innerhalb der flüssigen Galle bestehend aus Proteinen, Bakterien, Salzen und Gallensekret die Adhäsionskräfte überwiegen und es zu keiner Benetzung der Oberfläche kommen kann. Dies hat zur Folge, dass das Anhaften von Schmutzpartikeln

und Bakterien verhindert wird. Im Gegensatz dazu kommt es auf völlig unstrukturierten glatten Oberflächen, wie z.B. Teflon zum Gleiten von Flüssigkeitstropfen, dies bewirkt aber nur eine geringfügige Schmutzentfernung [WIENHOLD 2001 und 2003].

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Zusammensetzung und Konzentration der Sol-Gel-Beschichtungen EP19 und EP50 zu optimieren. Zusätzlich sollte zur Optimierung der Oberfläche jeweils eine Verdünnung einer Sol-Gel-Beschichtung, (entweder gekoppelt mit einem niedermolekularem oder gekoppelt mit einem hochmolekularem Epoxid-Harz) mit einem speziell entwickelten Oberflächenstabilisator kombiniert werden. Die Beschichtung mit dem zusätzlichen Oberflächenstabilisator zeigte keine Vorteile gegenüber den Beschichtungen ohne Oberflächenstabilisator.

Die verschiedenen Verdünnungen zeigten geringe Unterschiede in der Ablagerungstendenz, dabei scheint die Verdünnung 1 der Sol-Gel-Beschichtung bei den niedermolekularem Epoxid-Harzen (EP19AE1) und die Verdünnung 3 bei den hochmolekularen Epoxid-Harzen (EP50AE3) tendenziell die geringste Ablagerung bei größter Stabilität zu haben.



## Zusammenfassung

Seit Ende der 70er Jahre gilt das von Prof. Soehendra entwickelte Verfahren des endoskopischen Stenting des Gallengangs mit Kunststoffprothesen zur Palliation des malignen Verschlussikterus als Methode der Wahl. Ein noch ungenügend gelöstes Problem ist die Stentokklusion durch „Sludge“ nach 3 – 6 Monaten. Dieser erfordert endoskopische Reinterventionen, wodurch Patient und Gesundheitssystem zusätzlich belastet werden. Metallstents erzielen eine längere Drainagedauer, kommen aber wegen der hohen Kosten von 1000 € je Stent häufig nicht zum Einsatz.

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, die Zusammensetzung und Konzentration in Voruntersuchungen als überlegen gezeigte nanotechnologischen Sol-Gel-Beschichtungen auf Teflonoberflächen zu optimieren und die Stabilität der Sol-Gel Beschichtung durch einen Primer zu verbessern.

Ein anderes Ziel unserer Arbeit war es, experimentelle Modelle der Sludgeablagerung zu optimieren. Dafür wurde die Alkoholtrocknung mit der Lufttrocknung verglichen und außerdem Galle vom Schwein als Alternative Galle zum Bespülen der Proben untersucht. Dafür wurden 94 Teflonhalbrohre untersucht, darunter waren zwei verschiedene, eine mit einem niedermolekularem und eine mit einem hochmolekularem Epoxid-Harz gekoppelte, Sol-Gel-Beschichtung, die in jeweils drei unterschiedlichen Verdünnungen hergestellt wurden. Die Proben wurden über 42 Tage mit infizierter Galle inkubiert und um eine ähnliche Entstehung des Biofilms wie unter in-vivo Bedingungen zu erhalten mit einer Schwenkvorrichtung 10-mal pro Minute hin- und hergeschwenkt. Die Proben wurden anschließend rasterelektronenmikroskopisch auf die Sludgeablagerung, Trocknungsartefakte und Stabilität hin untersucht.

Es zeigte sich, dass bei der Lufttrocknung keine vermehrten Trocknungsartefakte entstanden sind, somit bietet die Alkoholtrocknung als vermeintlich schonendere Trocknungsart keine Vorteile.

Die mit humaner Galle besepten Prothesen zeigten keine größere Ablagerungstendenz als die mit Galle vom Schwein besepten Prothesen. Dies bestätigt die Hypothese dieser Arbeit, dass sich Galle vom Schwein genauso gut wie humane Galle zum Besepten der Prothesen eignet. Durch die Vereinfachung der Methodik können in Zukunft weitere Untersuchungen schneller und einfacher durchgeführt werden.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass fast alle Proben, die mit Sol-Gel beschichtet waren, geringere Ablagerung als die Teflonhalbproben ohne Beschichtung aufwiesen.

Die verschiedenen Verdünnungen zeigten geringe Unterschiede in der Ablagerungstendenz, dabei scheint die Verdünnung 1 der Sol-Gel-Beschichtung bei den niedermolekularen Epoxid-Harzen (EP19AE1) und die Verdünnung 3 bei den hochmolekularen Epoxid-Harzen (EP50AE3) tendenziell die geringste Ablagerung bei größter Stabilität zu haben.

Für die Zukunft ist zu wünschen, dass diese beiden Beschichtungsarten mit der optimierten Methodik in größeren Kollektiven untersucht werden um in der Zukunft auch Ihre Eignung in-vivo zu testen und die Methodik weiter zu evaluieren.

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsgegenstände</i> .....	13
<i>Tabelle 2: Sammlung der Galle</i> .....	15
<i>Tabelle 3: Zustand der Beschichtung</i> .....	25
<i>Tabelle 4: Fläche der Ablagerung</i> .....	25
<i>Tabelle 5: Höhe der Ablagerung</i> .....	25
<i>Tabelle 6: Form und Verteilung der Ablagerung</i> .....	25
<i>Tabelle 7: Ausmaß der Trocknungsartefakte</i> .....	26

## Diagrammverzeichnis

<i>Diagramm 1: Alkohol- vs. Lufttrocknung</i> .....	28
<i>Diagramm 2: Vergleich humane Galle und Galle vom Schwein</i> .....	29
<i>Diagramm 3: Wirkung des Primers auf die Stabilität der Beschichtung</i> .....	35
<i>Diagramm 4: Wirkung des Primers auf die Ablagerungstendenz</i> .....	35
<i>Diagramm 5: Ablagerungsneigung der Beschichtung</i> .....	36
<i>Diagramm 6: Stabilität der Beschichtungen</i> .....	37

## Abbildungsverzeichnis

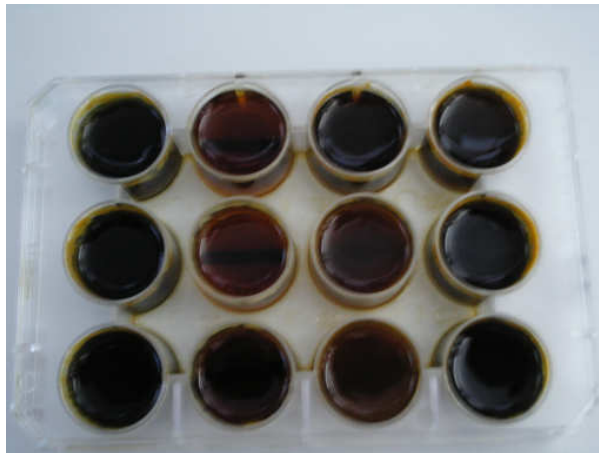
<i>Abbildung 1: Verstopfter Plastikstent</i> .....	9
<i>Abbildung 2: Metallstent Wallstent™ &amp; gecoatete Stents</i> .....	10
<i>Abbildung 3: Nano-Partikel-Effekt am Beispiel Lotusblume/ Lotusan</i> .....	11
<i>Abbildung 4 Schwenkvorrichtung</i> .....	13
<i>Abbildung 5: Antibiotika-Test</i> .....	16
<i>Abbildung 6: Test auf <math>\beta</math>-Glucoronidase-Aktivität</i> .....	18
<i>Abbildung 7: Beschichtete Stents beim Abtropfen</i> .....	20
<i>Abbildung 8 Verpackte Stentstücke</i> .....	21
<i>Abbildung 9: Probe ohne Trocknungsartefakte</i> .....	27
<i>Abbildung 10: Probe mit starken Trocknungsartefakten</i> .....	27
<i>Abbildung 11: Schwenkeinrichtung</i> .....	43
<i>Abbildung 12: Platte 6 bei Versuchende</i> .....	43
<i>Abbildung 13: Platte 3 bei Versuchende</i> .....	43
<i>Abbildung 14: Platte 3 Versuchende</i> .....	44
<i>Abbildung 15: EP19AE1</i> .....	47
<i>Abbildung 16: EP19AE1</i> .....	45
<i>Abbildung 17: EP19AE1</i> .....	45
<i>Abbildung 18: EP19AE1</i> .....	45
<i>Abbildung 19: EP19AE2</i> .....	46
<i>Abbildung 20: EP19AE2</i> .....	46
<i>Abbildung 21: EP19AE2</i> .....	46
<i>Abbildung 22: EP19AE2</i> .....	46
<i>Abbildung 23: EP19AE3</i> .....	46
<i>Abbildung 24: EP19AE3</i> .....	46
<i>Abbildung 25: EP19AE3</i> .....	46
<i>Abbildung 26: EP19AE3</i> .....	46
<i>Abbildung 27: EP19AE3 thin</i> .....	47
<i>Abbildung 28: EP19AE3 thin</i> .....	47
<i>Abbildung 29: EP19AE3 thin</i> .....	47
<i>Abbildung 30: EP19AE3 thin</i> .....	47
<i>Abbildung 31: EP19AE3 thick</i> .....	47
<i>Abbildung 32: EP19AE3 thick</i> .....	47
<i>Abbildung 33: EP19AE3 thick</i> .....	47
<i>Abbildung 34: EP19AE3 thick</i> .....	47
<i>Abbildung 35: EP50AE1</i> .....	48

Abbildung 36: EP50AE1.....	48
Abbildung 37: EP50AE1.....	48
Abbildung 38: EP50AE1.....	48
Abbildung 39: EP50AE2.....	48
Abbildung 40: EP50AE2.....	48
Abbildung 41: EP50AE2.....	48
Abbildung 42: EP50AE2.....	48
Abbildung 43: EP50AE3.....	49
Abbildung 44: EP50AE3.....	49
Abbildung 45: EP50AE3.....	49
Abbildung 46: EP50AE3.....	49
Abbildung 47: EP50AE3 thin.....	49
Abbildung 48: EP50AE3 thin.....	49
Abbildung 49: EP50AE3 thin.....	49
Abbildung 50: EP50AE3 thin.....	49
Abbildung 51: EP50AE3 thick.....	50
Abbildung 52: EP50AE3 thick.....	50
Abbildung 53: EP50AE3 thick.....	50
Abbildung 54: EP50AE3 thick.....	50
Abbildung 55: Teflon unbeschichtet.....	50
Abbildung 56: Teflon unbeschichtet.....	50
Abbildung 57: Teflon unbeschichtet.....	50
Abbildung 58: Teflon unbeschichtet.....	50

## Anhang



**Abbildung 11: Schwenkeinrichtung**



**Abbildung 12: Platte 6 bei Versuchende**



**Abbildung 13: Platte 3 bei Versuchende**



**Abbildung 14: Platte 3 Versuchende**

## Bilder der Rasterelektronenmikroskopie

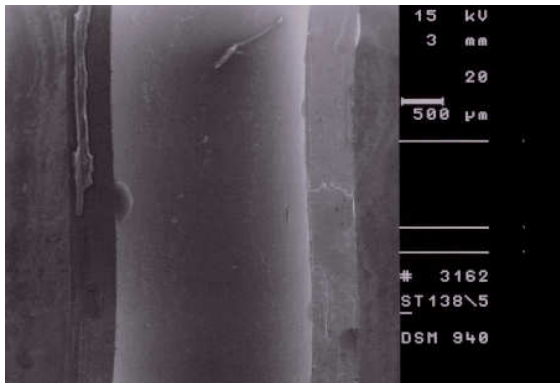


Abbildung 15: EP19AE1

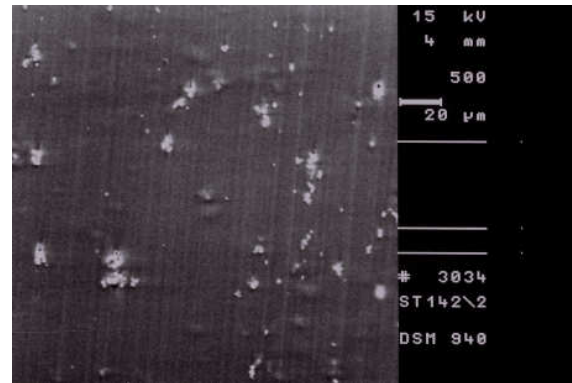


Abbildung 16: EP19AE1

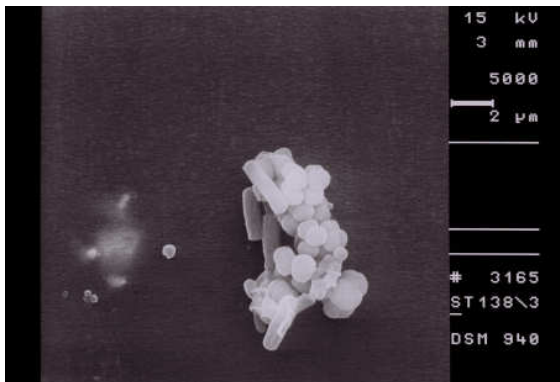


Abbildung 17: EP19AE1

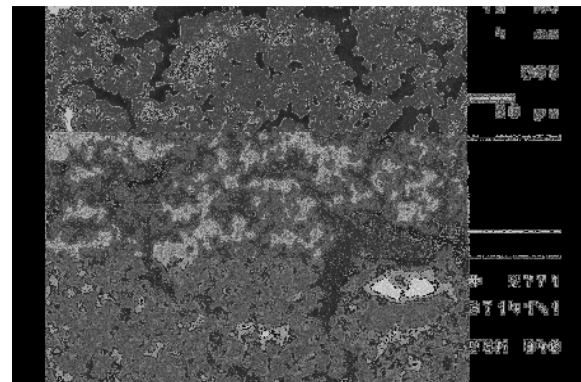


Abbildung 18: EP19AE1

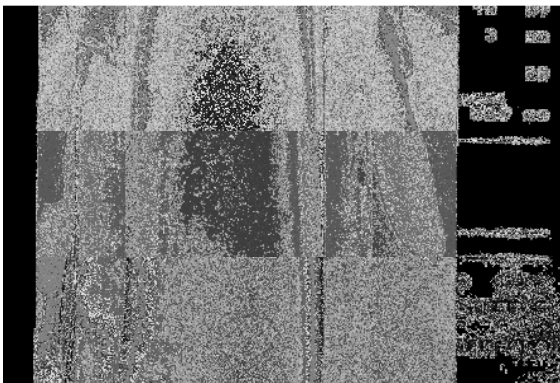


Abbildung 19: EP19AE2

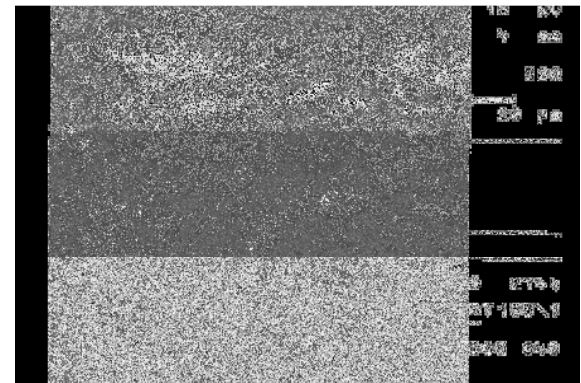


Abbildung 20: EP19AE2



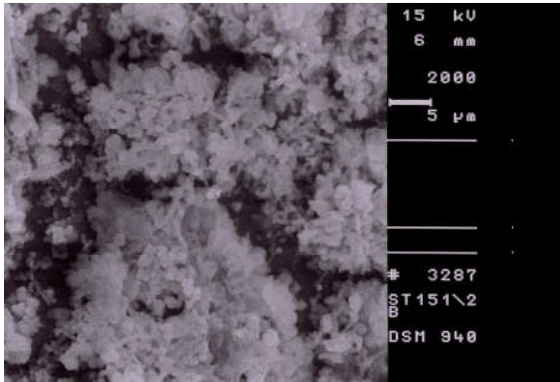


Abbildung 21: EP19AE2

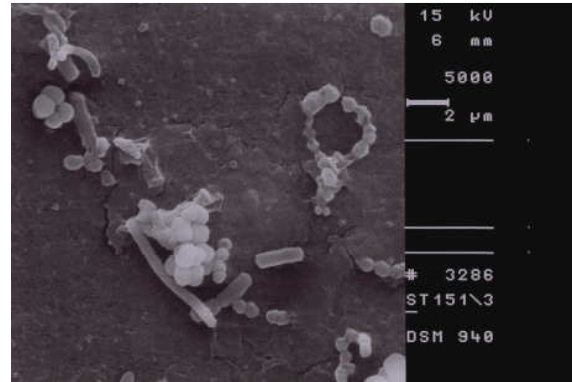


Abbildung 22: EP19AE2

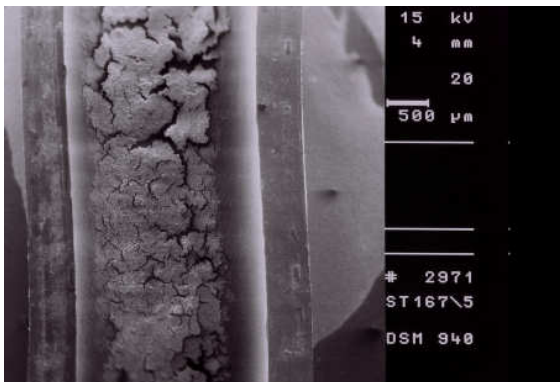


Abbildung 23: EP19AE3

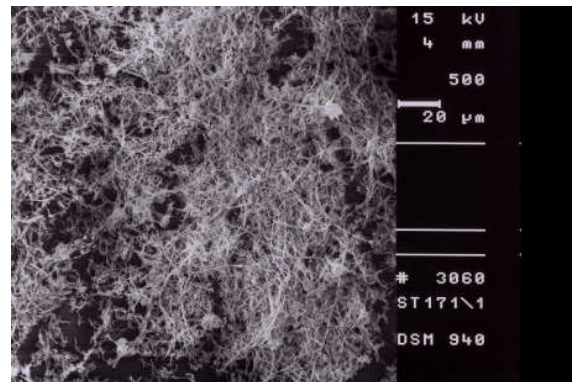


Abbildung 24: EP19AE3

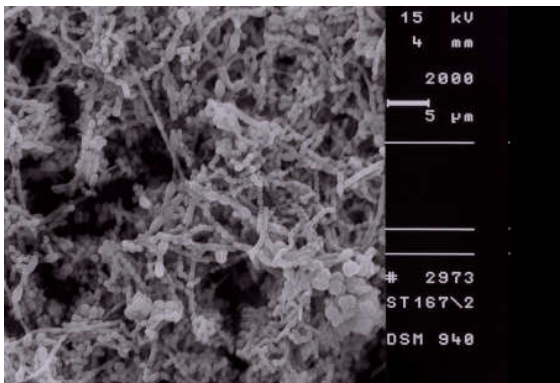


Abbildung 25: EP19AE3

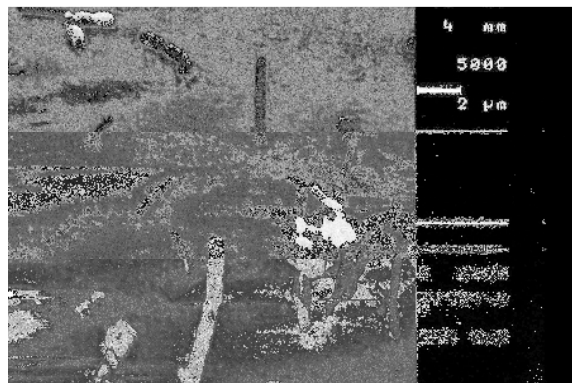


Abbildung 26: EP19AE3



Abbildung 27: EP19AE3 thin

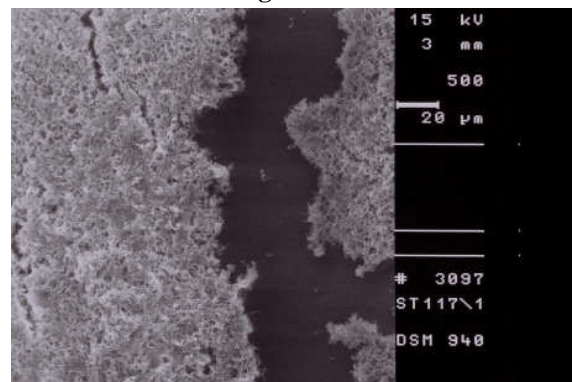


Abbildung 28: EP19AE3 thin



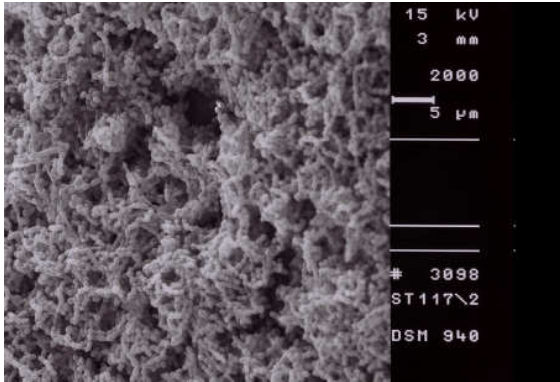


Abbildung 29: EP19AE3 thin



Abbildung 30: EP19AE3 thin

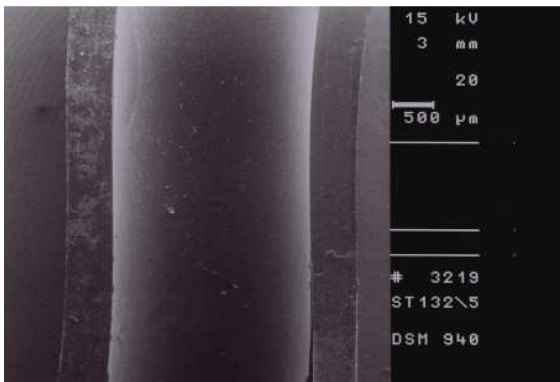


Abbildung 31: EP19AE3 thick

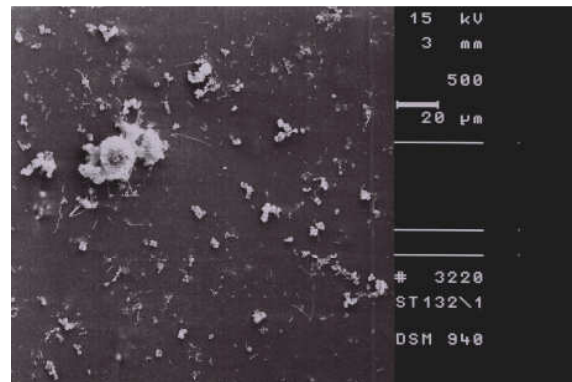


Abbildung 32: EP19AE3 thick

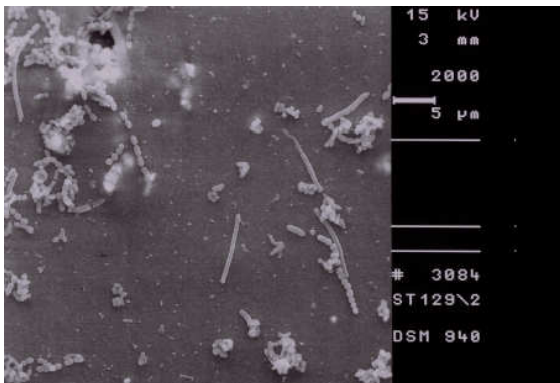


Abbildung 33: EP19AE3 thick

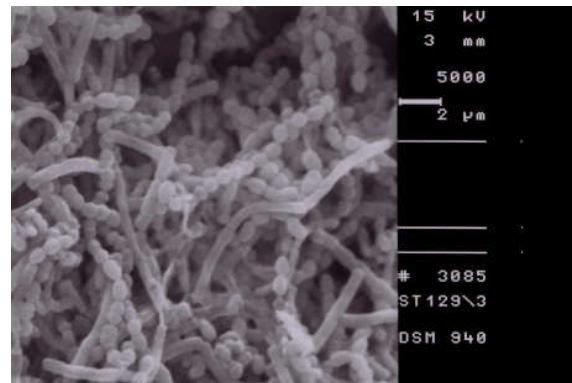


Abbildung 34: EP19AE3 thick

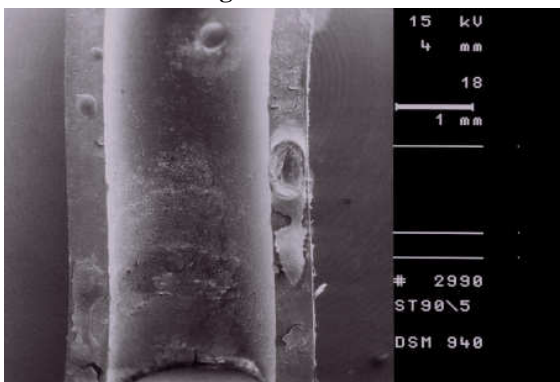


Abbildung 35: EP50AE1

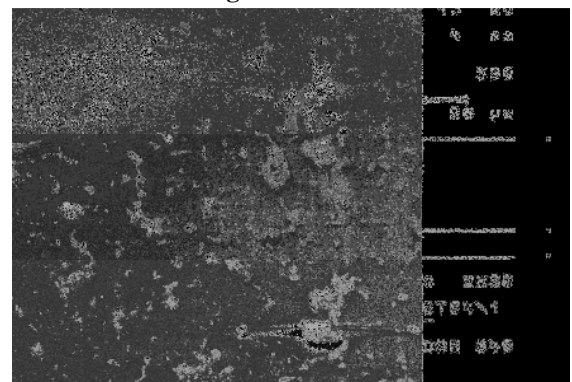


Abbildung 36: EP50AE1



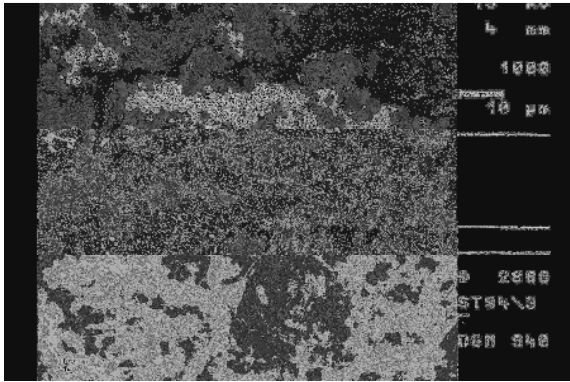


Abbildung 37: EP50AE1

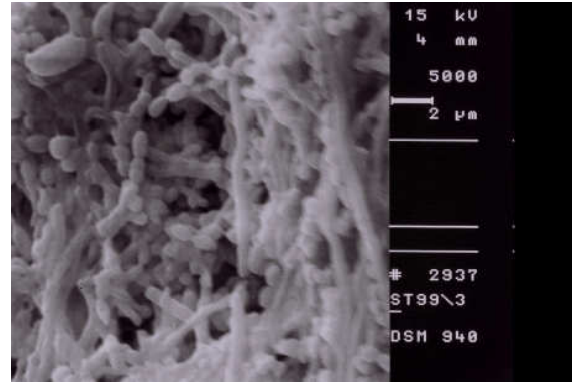


Abbildung 38: EP50AE1

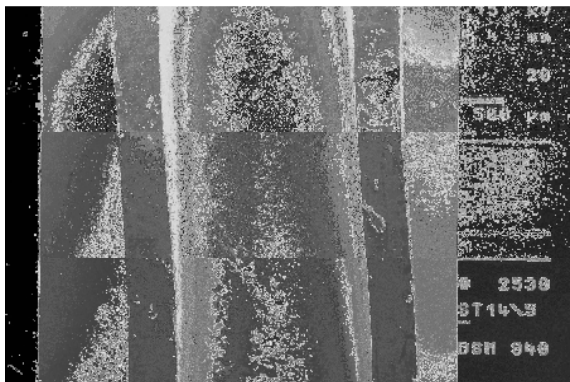


Abbildung 39: EP50AE2

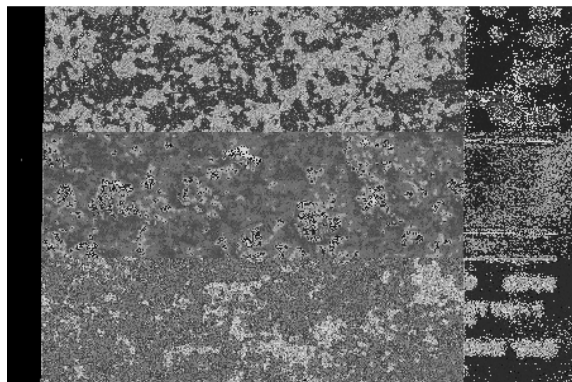


Abbildung 40: EP50AE2

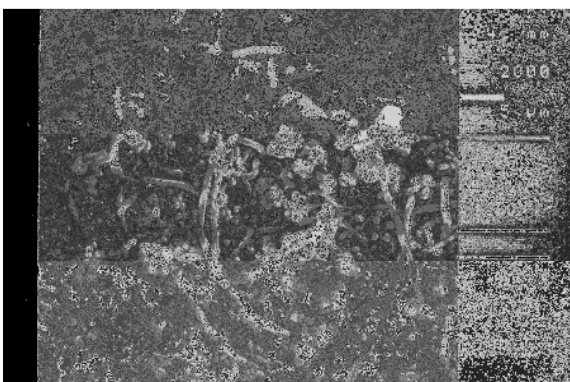


Abbildung 41: EP50AE2

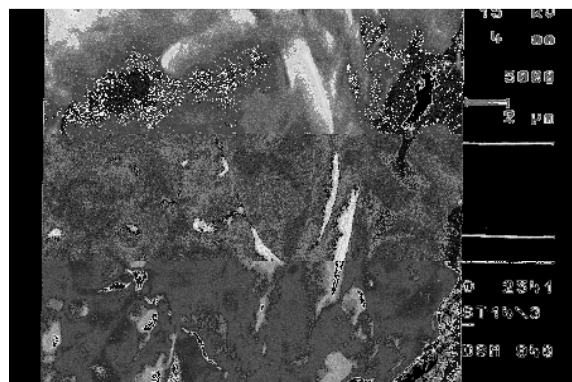


Abbildung 42: EP50AE2

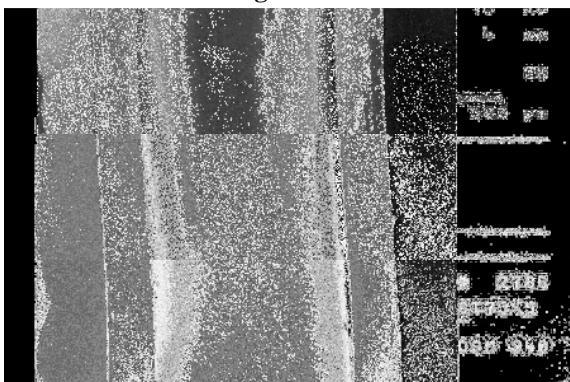


Abbildung 43: EP50AE3

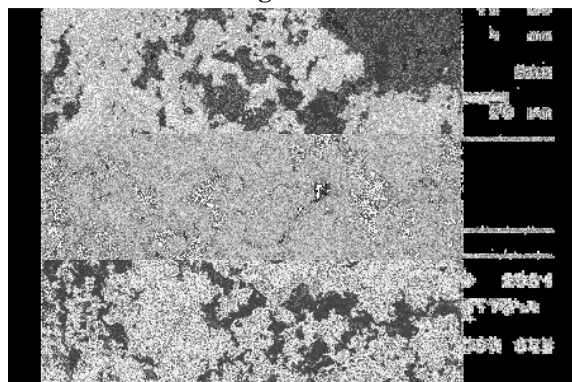


Abbildung 44: EP50AE3

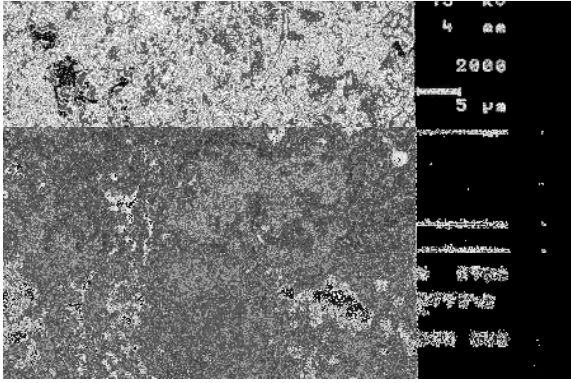


Abbildung 45: EP50AE3

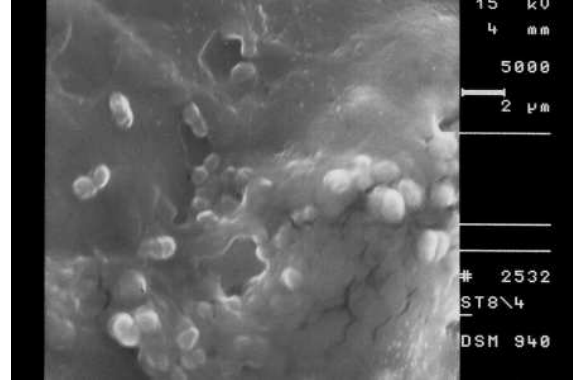


Abbildung 46: EP50AE3

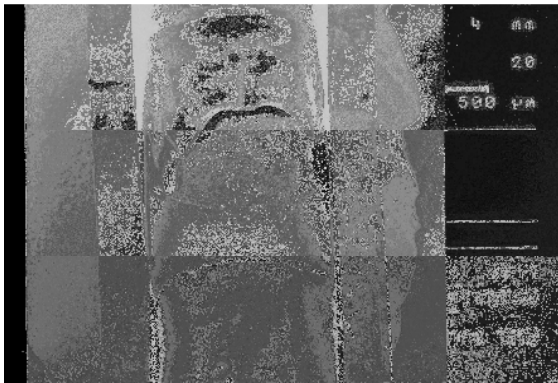


Abbildung 47: EP50AE3 thin

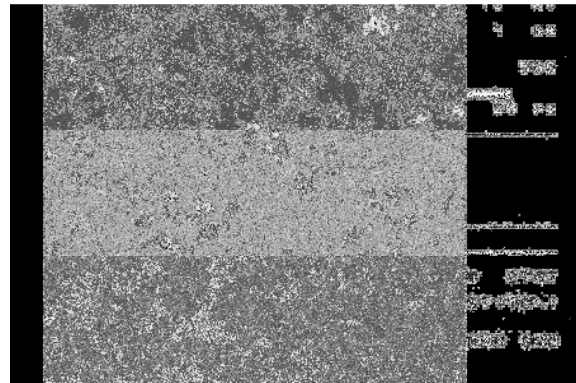


Abbildung 48: EP50AE3 thin

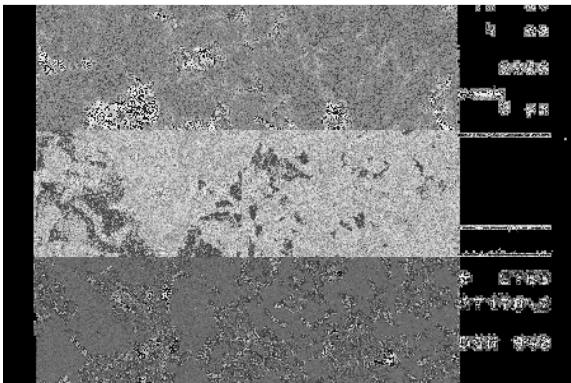


Abbildung 49: EP50AE3 thin

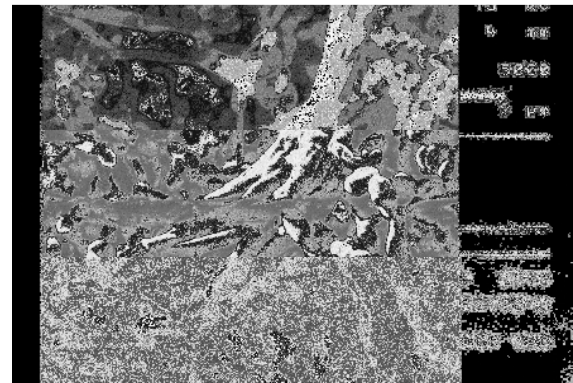


Abbildung 50: EP50AE3 thin

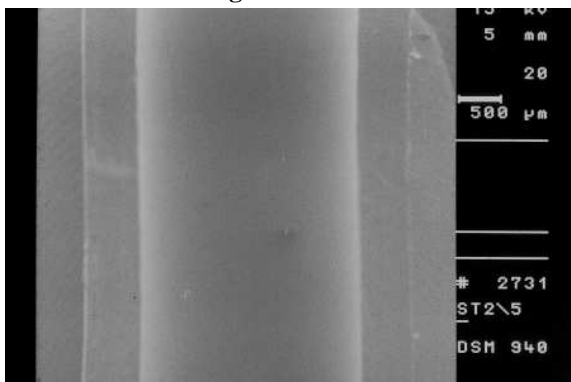


Abbildung 51: EP50AE3 thick

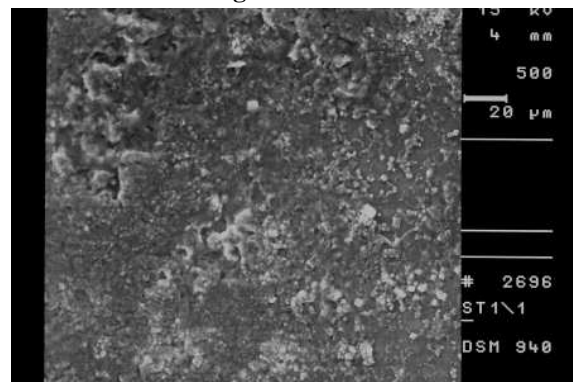


Abbildung 52: EP50AE3 thick



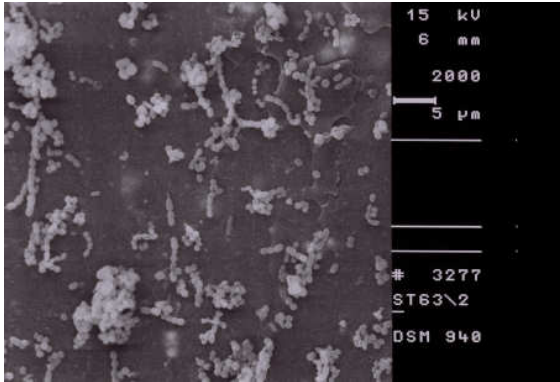


Abbildung 53: EP50AE3 thick

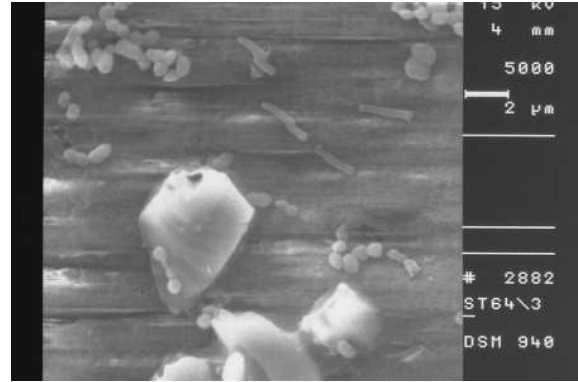


Abbildung 54: EP50AE3 thick

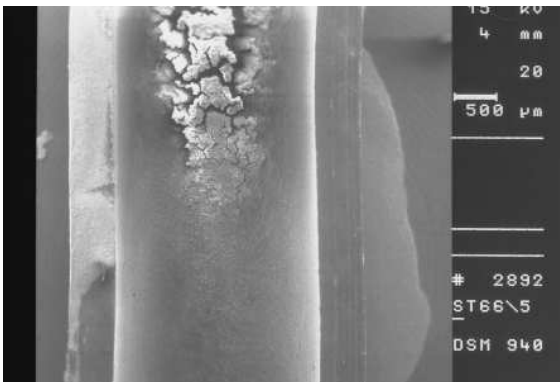


Abbildung 55: Teflon unbeschichtet

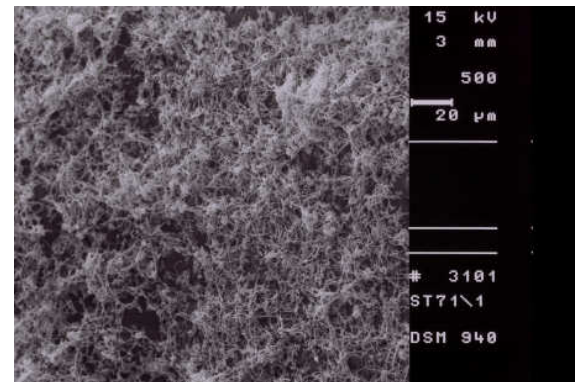


Abbildung 56: Teflon unbeschichtet

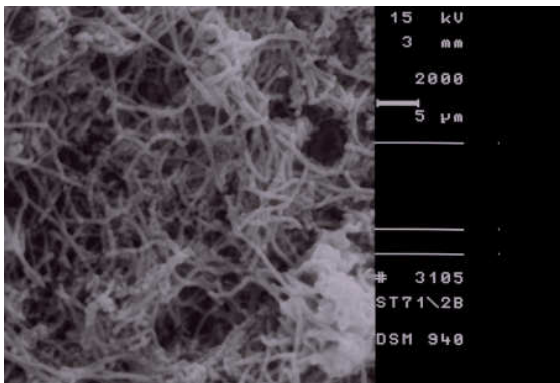


Abbildung 57: Teflon unbeschichtet

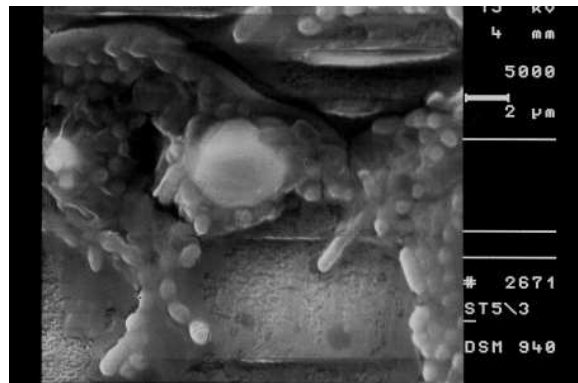


Abbildung 58: Teflon unbeschichtet

## Literaturverzeichnis

Abraham NS, Barkun JS, Barkun AN (2002) Palliation of malignant biliary obstruction: a prospective trial examining impact on quality of life. *Gastrointest Endosc.* 56(6):835-41

Arnold JC, Riemann JF (1998) Endoscopic therapy of solid tumors of the gastrointestinal tract. *Internist* 39(11):1148-58

Ballinger AB, McHugh M, Catnach SM, Alstead EM, Clark ML (1994) Symptom relief and quality of life after stenting for malignant bile duct obstruction. *Gut.* 35(4):467-70

Bethge N, Wagner HJ, Knyrim K, Zimmermann HB, Starck E, Pausch J, Vakil N (1992) Technical failure of biliary metal stent deployment in a series of 116 applications.

*Endoscopy.* 24(5):395-400

Bismuth H, Castaing D, Traynor O (1988) Resection or palliation: Priority of surgery in the treatment of hilar cancer. *World J Surg* 12: 39-47

Boguth L, Tatalovic S, Antonucci F et al. (1994) Malignant biliary obstruction: Clinical and histopathologic correlation after treatment with self-expanding metal prostheses.

*Radiology* 192:669-674

Catalano MF, Geenen JF, Lehman GA, Siegel JH, Jacob L, McKinley MJ, Rajjman I, Meier P, Jacobson I, Kozarek R, Al-Kawas FH, Lo SK, Dua KS, Baille J, Ginsberg GG, Parsons W, Meyerson SM, Cohen S, Nelson DB, McHattie JD, Carr-Locke DL (2002) "Tannenbaum" Teflon stents versus traditional polyethylene stents for treatment of malignant biliary stricture. *Gastrointestinal Endoscopy* 55(3):354-358

Coene PP, Groen AK, Cheng J, Out MM, Tytgat GNJ, Huibregtse K (1990) Clogging of biliary endoprotheses: a new prospective. *Gut* 31:913-7.

Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF (1996) Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 223:273.

Cress RD, Yin D, Clarke L et al. (2006) Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States). *Cancer Causes Control* 17:403

Davids PH, Groen AK , Rauws EA, Tytgat GN, Huibregtse K (1992) Randomised trial of self-expanding metal stents versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction. *Lancet* 340:1488-92.

De Ledingen V, Person B, Legoux JL, Le Sidaner A, Desaint B, Greef M, Moesch C, Grollier G, Ingrand P, Sautereau D, Beauchant M (2000) Prevention of biliary stent occlusion by ursodeoxycholic acid plus norfloxacin: a multicenter randomized trial. *Dig Dis Sci* 45(1):145-50

Dowidar N, Moesgaard F, Matzen P (1991) Clogging and other complications of biliary endoprostheses. *Scand J Gastroenterol* 26:1132-6

Dowidar N, Kolmos HJ, Matzen P (1992) Experimental clogging of biliary endoprostheses: role of bacteria, endoprosthesis material and design. *Scand J Gastroenterol* 27:77-80

England RE, Martin DF, Morris J, Sheridan MB, Frost R, Freeman A, Lawrie B, Deakin M, Fraser I, Smith K (2000) A prospective randomised multicentre trial comparing 10 Fr Teflon Tannenbaum stents with 10 Fr polyethylene Cotton-Leung stents in patients with malignant common duct strictures. *Gut*. 46(3):395-400

Ettinghausen SE, Schwartzentruber DJ, Sindelar WF (1995) Evolving strategies for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. A review. *J Clin Gastroenterol* 21(1):48-60

Galandi D, Schwarzer G, Bassler D, Allgaier HP (2002) Ursodeoxycholic acid and/or antibiotics for prevention of biliary stent occlusion. *Cochrane Database Syst Rev*. (3):CD003043

Ghosh S, Palmer KR (1994) Prevention of biliary stent occlusion using cyclical antibiotics and ursodeoxycholic acid. *Gut* 35(12):1757-9

Groen AK, Out T, Huibregtse K, Delzenne B, Hoek FJ, Tytgat GNJ (1987) Characterization of the content of occluded biliary endoprostheses. *Endoscopy* 19:57-9

Hoepffner N, Foerster EC, Högemann B, Domschke W (1994) Long-term experience in Wallstent therapy for malignant choledochal stenosis. *Endoscopy*. 26(7):597-602

Knyrim K, Wagner HJ, Pausch J, Vakil N (1993) A prospective, randomized, controlled trial of metal stents for malignant obstruction of the common bile duct. *Endoscopy* 25(3): p. 207-12

Kaassis M, Boyer J, Dumas R, Ponchon T, Coumaros D, Delcenserie R, Canard

JM, Fritsch J, Rey JF, Burtin P (2003) Plastic or metal stents for malignant stricture of the common bile duct? Results of a randomized prospective study. *Gastrointest Endosc* 57(2):178-82

Katsinelos P, Paikos D, Kountouras J, Chatzimavroudis G, Paroutoglou G, Moschos I, Gatopoulou A, Beltsis A, Zavos C, Papaziogas B (2006) Tannenbaum and metal stents in the palliative treatment of malignant distal bile duct obstruction: a comparative study of patency and cost effectiveness. *Surq Endosc*. 20(10):1587-93

Johnstone PA, Sindelar WF (1993) Lymph node involvement and pancreatic resection: correlation with prognosis and local disease control in a clinical trial. *Pancreas* 8: 535-539

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1998) Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 48(1):6-29.

Leung JW, Ling TK, Kung JL, Vallance-Owen J (1988) The role of bacteria in the blockage of biliary stents. *Gastrointest Endosc* 34:19–22

Leung JW, Liu YL, Leung P, Inciardi J, Chan RCY, Cheng AF (2001) Expression of bacterial  $\beta$ -glucuronidase in human bile: an in vitro study. *Gastrointest Endosc*. 54:346-50

Leung JW, Yan-lei Liu, Rapheal CY Chan, Thomas KW Ling, Augustine F Cheng (2002) Effects of adherence factors and human bile on bacterial attachment and biliary stent blockage: an in vitro study. *Gastrointest Endosc*. 56

Luman W, Ghosh S, Palmer KR (1999) A combination of ciprofloxacin and Rowachol does not prevent biliary stent occlusion. *Gastrointest Endosc*. 49:316-21

Matsuda Y, Shimakura K, Akamatsu T (1991) Factors affecting the patency of stents in malignant biliary obstructive disease: univariate and multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 86(7): 843-9.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1997) Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 47:5–27.

Raikar GV, Melin MM, Ressa A, Lettieri SZ, Poterucha JJ, Nagorney DM, Donohue JH (1996) Cost-effective analysis of surgical palliation versus endoscopic stenting in the management of unresectable pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 3(5):470-5

Ridwelski K, Meyer F, Ebert M, Malfertheiner P and Lippert H (2001) Prognostic parameters determining survival in pancreatic carcinoma and, in particular, after palliative treatment. *Dig Dis* 19: 85-92

Rieber A, Brambs HJ (1997) Metallic stents in malignant biliary obstruction *Cardiovasc Intervent Radiol* 20:43-49

Schmassman A, von Guten E, Knuchel J, Scheurer U, Fehr HF, Halter F (1996) Wallstent versus plastic stents in malignant biliary obstruction: effects of stent patency of the first and second stent on patient compliance and survival. *Am J Gastroenterol* 91(4):654-9

Schilling D, Rink G, Arnold JC, Benz C, Adamek HE, Jakobs R, Riemann JF (2003) Prospective, randomized, single-center trial comparing 3 different 10F plastic stents in malignant mid and distal bile duct strictures. *Gastrointest Endosc.* 58(1):54-8

Schmidt CM, Powell ES, Yiannoutsos CT, Yiannoutsos CT, Howard TJ, Wiebke EA, Wiesenauer CA, Baumgardner JA, Cummings OW, Jacobsen LE, Broadie TA, Canal DF, Goulet RJ, Curie EA, Cardnes H, Watkins JM, Loehner PJ, Lillemoe KD, Madura JA (2004) Pancreaticoduodenectomy: a 20 year experience in 516 patients. *Arch Surg* 2004; 139:718-727

Seitz U (1996) Makroskopische, mikrobiologische, rasterelektronenmikroskopische und klinische Untersuchungen über die Verstopfung von Gallengangprothesen und Untersuchung eines daraus resultierenden verbesserten Prothesendesigns. *Med. Dissertation. Universität Hamburg*

Seitz U, Vadeyar H, Soehendra N (1994) Prolonged patency with a new-design Teflon biliary prosthesis. *Endoscopy* 26(5):478-82

Seitz U, Block A, Schaefer AC, Wienhold U, Bohnacker S, Siebert K, Seewald S, Thonke F, Wulff H, de Weerth A, Soehendra N (2007) Biliary stent clogging solved by nanotechnology? In vitro study of inorganic-organic sol-gel coatings for teflon stents. *Gastroenterology* 133(1):65-71

Siegel JH, Snady H (1986) The significance of endoscopically placed prostheses in the management of biliary obstruction due to carcinoma of the pancreas: results of nonoperative decompression in 277 patients. *Am J Gastroenterol.* 81(8):634-41

Soehendra N, Reynders-Frederix V (1980) Palliative bile duct drainage - a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain. *Endoscopy* 12(1):8-11



Soehendra N, Maydeo A, Eckmann B, Bruckner M, Nam V C, Grimm H (1990) A new technique for replacing an obstructed biliary endoprosthesis. *Endoscopy* 22(6): 271-2

Speer AG, Cotton PB, Russell RC, Masson RR, Hatfield AR, Leung JW, MacRae KD, Houghton J, Lennon CA (1987) Randomized trial of endoscopic versus percutaneous stent insertion in malignant obstructive jaundice. *Lancet* . 2(8550):57-62

Speer AG, Cotton PB, Rode J, Seddon AM, Neal CR, Holton J, Costerton J W (1988) Biliary stent blockage with bacterial biofilm. A light and electron microscopy study. *Ann Intern Med.* 108(4):546-53

Speer AG, Cotton PB, MacRae KD (1988) Endoscopic management of malignant biliary obstruction: stents of 10 French gauge are preferable to stents of 8 French gauge. *Gastrointest Endosc* 34:412–417

Smit JM, Out MM, Groen AK, Huibregtse K, Jansen PL, van Marle J, Tytgat GN (1989) A placebo-controlled study on the efficacy of aspirin and doxycycline in preventing clogging of biliary endoprostheses. *Gastrointest Endosc.* 35(6):485-9

Sung JJ, Chung SC (1995) Endoscopic stenting for palliation of malignant biliary obstruction. A review of progress in the last 15 years. *Dig Dis Sci.* 40(6):1167-73

Sung JJ, Chung SC, Tsui CP, Co AL, Li AK (1994) Omitting sideholes in biliary stents does not improve drainage of the obstructed biliary system: a prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc.* 40:321-5

Tarnasky PR, Cotton PB (1995) Randomized trial of prevention of biliary stent occlusion by ursodeoxycholic acid plus norfloxacin. *Gastrointest Endosc.* 42(1):103-4

Terruzzi V, Comin U, De Grazia F, Toti GL, Zambelli A, Beretta S, Minoli G (2000) Prospective randomized trial comparing Tannenbaum Teflon and standard polyethylene stents in distal malignant biliary stenosis. *Gastrointest Endosc.* 51:23-7

Tringali A, Mutignani M, Perri V, Zuccalà G, Cipolletta L, Bianco MA, Rotondano G, Philipper M, Schumacher B, Neuhaus H, Schmit A, Devière J, Costamagna G (2003) A prospective, randomized multicenter trial comparing double layer and polyethylene stents for malignant distal common bile duct strictures. *Endoscopy.* 35(12):992-7

van Berkel AM, Boland C, Redekop WK, Bergman JJ, Groen AK, Tytgat GN, Huibregtse K (1998) A prospective randomized trial of Teflon versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction. *Endoscopy.* 30(8):681-6

van Berkel AM, van Marle J, van Veen H, Groen AK, Huibregtse K (2000) A scanning electron microscopic study of biliary stent materials. *Gastrointest Endosc.* 51(1):19-22

van Berkel, Huibregtse IL, Bergman JJ, Rauws EA, Bruno MJ, Huibregtse K (2004) A prospective randomized trial of Tannenbaum-type Teflon-coated stents versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 16(2):213–7

Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman JA, Hodgin MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ (2006) 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: a single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 10(9):1199-1211

Wienhold U (2001) Alternatives Bindemittelkonzept für Sol-Gel Beschichtungsmaterialien. *Schriftenreihe VILF-Vorträge* 4:98-108

Wienhold U, Wagner G (2003) Billige Alternative - Organische Polymere können in hybriden Sol-Gel-Beschichtungen teure modifizierte Silane ersetzen. *Farbe & Lack* 109: 82-87

Yu J, Anderson R, Ljungh A (1996) Protein adsorption and bacterial adhesion to biliary stent materials. *J Surg Res* 62:69-73

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Soehendra danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit. Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. U. Seitz für seine unterstützende und umfassend freundliche Betreuung und für die entscheidenden Anstöße, mich mit dem Thema auseinanderzusetzen.

Bei Herrn Dr. med. A. Block bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Experimente in seinem Labor durchführen zu können. Besonders gebührt mein Dank Herrn Dr. U. Wienhold und Herrn H.-C. Grosse für die Herstellung und Bereitstellung aller Testmaterialien.

Auch danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für interdisziplinäre Endoskopie des UKE für die geduldige Hilfe bei der zeitraubenden Probensammlung.

Ferner sei Frau Dr. Lubitz aus dem Institut für Transfusionsmedizin des UKE gedankt für die Erlaubnis, das Blutbestrahlungsgerät zur Probenvorbereitung nutzen zu können.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Schumacher aus dem Institut für Neuroanatomie des UKE für das zur Verfügung stellen des Rasterelektronenmikroskops. Für die technische Betreuung beim Anfertigen der Aufnahmen sowie für wertvolle Hinweise und Vorarbeiten danke ich Herrn K. Siebert. Außerdem danke ich auch Herrn Dr. Riazi von der TU Harburg, das er uns bei der Besputterung der Proben so kurzfristig helfen konnte.

Ganz besonderen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, weil Sie zu jederzeit mir zur Seite standen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Tolga Ağdırlıoğlu