

Aus dem Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies
(BCRT) in Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Herstellung und Charakterisierung von Kalziumkarbonat-
Mikropartikeln als Drugcarrier für eine lokale antibiotische
Therapie der Osteomyelitis mit Vancomycin –
eine *in vitro* Studie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephanie Hoessrich

aus Kronberg

Gutachter/in: 1.: Priv.-Doz. Dr. H. Bäuml
 2.: Prof. Dr. rer. nat. B. Wildemann
 3.: Prof. Dr. med. N. Goebels

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Osteomyelitis	11
1.1.1 Definition	11
1.1.2 Pathologie	13
1.1.3 Klinik und Diagnose	14
1.1.4 Therapie	15
1.2 Vancomycin (VM)	16
1.3 Carrier	17
1.4 Kalziumkarbonat	19
1.5 Zielstellung	20
2 Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Biologische Materialien	21
2.1.2 Chemikalienliste	21
2.1.3 Puffer/ Lösungen	23
2.2 Geräte	23
2.2.1 Photometer	23
2.2.2 Hochdruck-Flüssigkeitschromatography (HPLC)	23
2.2.3 Bestimmung der Vancomycinkonzentration in wässrigen Lösungen	24
2.2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	25
2.2.5 Geräteliste	25
2.3 CaCO₃-Mikropartikelherstellung	26
2.3.1 Beladung mit VM nach Präzipitation der CaCO ₃ -Partikel („VM-CaCO ₃ -nP“)	26
2.3.2 Präzipitation der CaCO ₃ -Partikel in Anwesenheit von VM („VM-CaCO ₃ -bP“)	26
2.3.3 Auflösen der Partikel	27
2.3.4 VM-Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit Biopolymeren	27
2.4 Langzeitversuche	29
2.4.1 Langzeitversuch A	29
2.4.2 Langzeitversuch B	30
2.5 Diffusionskoeffizient	30
2.6 Knochenmodell	31
2.6.1 Knochenvorversuch	32
2.6.2 Knochenversuch	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Größenverteilung der Partikel	34
3.2 Eichkurven Photometrie und HPLC	35
3.3 Waschschrte	37
3.3.1 VM-Verlust in Waschschrten W1-W3 bei VM-CaCO ₃ -bP-Partikeln	37
3.3.2 Übersicht des VM-Verlusts bei W1-W3 aller Partikel	37
3.4 VM-Konzentration in VM-CaCO₃-Partikeln nP versus bP	38
3.5 Beladungseffizienz	40

3.6 Langzeitversuche	42
3.6.1 VM-CaCO ₃ -Partikel nP versus bP	42
3.6.2 VM-CaCO ₃ -HSA 1-Partikel	43
3.6.3 VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikel	44
3.6.4 VM-CaCO ₃ -Dextran 1-Partikel	45
3.6.5 VM-CaCO ₃ -Dextran 2-Partikel	46
3.6.6 Vergleich der VM-CaCO ₃ -Dextran 2-Partikel mit den VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikeln	48
3.6.7 VM-CaCO ₃ -Fibrinpartikel	49
3.6.8 Fibrinpartikel + Enzyme (VM-CaCO ₃ -PV-Partikel)	51
3.7 Diffusionskoeffizient	55
3.8 Knochenversuche	57
3.8.1 Knochenvorversuch mit VM-Lösung	57
3.8.2 Knochenversuch mit VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikeln	58
4 Diskussion	60
4.1 VM-CaCO₃-Partikel	61
4.2 Oberflächenmodifikationen	65
4.2.1 Albumin	65
4.2.2 Fibrin	66
4.2.3 Fibrin und Enzyme	68
4.2.4 Dextran	68
4.3 Knochenversuch	70
4.4 Verlust bei Waschsritten	71
4.5 Beladungseffizienz	72
4.6 Diffusionskoeffizient	72
4.7 Fazit der Beladung	75
4.8 Vorschläge zur Optimierung der Mikropartikel	76
4.9 Vancomycin (VM)	77
4.10 Alternative Antibiotika	80
4.11 Behandlungskonzept mit Kalziumkarbonatpartikeln	82
5 Zusammenfassung	84
6 Literaturverzeichnis	86
Erklärung an Eides Statt	92
Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anatomische Stadien der Osteomyelitis bei Erwachsenen nach Cierny und Mader. I) medulläre OM, II) superfizielle OM, III) lokalisierte OM, IV) diffuse OM, [8].	11
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Knochenmodells. Der Spongiosaquader wurde in einem Deckelglas durch einen Plastikring fixiert und war bis zur Oberkante von einer PBS-Lösung umgeben. Die Probe der Mikropartikel wurde auf die apikale Fläche des Knochens appliziert, das Glas mit einem Deckel verschlossen und in den Wärmeschrank bei 37°C gestellt.	32
Abb. 3:	Partikeldurchmesser (MW und SA n=30) in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit R (1-3) und der Rührdauer von 10s, 20s und 40s. Die Abhängigkeit der Partikelgröße von Rührtempo und Rührdauer wird im Säulendiagramm sichtbar	34
Abb. 4:	Darstellung der MW und SA (n=3) der experimentell, mittels HPLC und Photometrie, bestimmten VM-Konzentrationen in Abhängigkeit von der eingewogenen VM-Menge. Die mittels linearer Regression bestimmten Eichkurven liegen im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mg/ml VM. Es ist sichtbar, dass sich in den vorgegebenen Konzentrationen eine lineare Abhängigkeit zwischen gemessenen und gewogenen Werten ergibt. Der relative Fehler war nicht größer als 5%, weshalb er in der Abbildung nicht erkennbar ist.	35
Abb. 5:	CLSM Bilder zur Übersicht der Größenverteilung der CaCO ₃ -Partikel, in 9 verschiedenen Partikelansätzen mit Geschwindigkeit R I - R III und der Dauer von 10s, 20s und 40s. Anhand der Bilder wird ersichtlich, dass in Probe I-10s, d.h. Rührgeschwindigkeit R I für 10s, die größten Mikropartikel entstehen. Bereits die Verlängerung der Rührdauer auf 20s oder 40s bei gleich bleibendem Tempo hat eine ausgeprägte Veränderung der Partikelmorphologie zufolge.	36
Abb. 6:	MW und SA (n=3) der VM-Verluste bei den Waschsritten W1-W3 der VM-CaCO ₃ -bP-Partikel (bei Präzipitation). In W1 geht der Großteil an VM verloren und bei W3 weniger als 1%.	37
Abb. 7:	Säulendiagramm des MW und der SA (n=3) der VM-Verluste bei Waschsritten W1-W3 der folgenden VM-CaCO ₃ -Partikel: nP, bP, HSA 1, HSA 2, Dextran 1 und Dextran 2. Es wird ersichtlich, dass die D 1- und nP-Partikel am meisten VM während der Waschschrte verlieren.	38
Abb. 8:	VM-Konzentrationen (MW und SA n = 3) in mg/ml der VM-CaCO ₃ -Partikel nP (nach Präzipitation), bP (bei Präzipitation) nach Lyse des CaCO ₃ in HCl. Die bP-Partikel enthalten ein Vielfaches an VM.	39
Abb. 9:	CLSM Bilder der VM-CaCO ₃ -Partikel nach Zugabe von A) HCl und B) EDTA. Es ist sichtbar, dass die Partikel durch die HCl- und die EDTA-Lösung aufgelöst werden.	39
Abb. 10:	Darstellung der MW und SA (n=3) der Beladungseffizienzen der verschiedenen VM-CaCO ₃ -Partikeltypen in Prozent. Je höher die	40

Abbildungsverzeichnis

	Prozentzahl liegt, desto größer ist die Beladungseffizienz. Das heißt, der Anteil des eingesetzten VM, der letztendlich in den Partikeln vorliegt ist größer und weniger VM geht bei der Herstellung verloren. Es wird ersichtlich, dass die höchste Beladungseffizienz von den F-, PV- und HSA 2-Partikeln erreicht wird. Die Prozentzahlen der HSA 1-, Dx 1- und Dx 2-Partikel besitzen im Gegensatz dazu mit ca. 10% die kleinsten Werte.	
Abb. 11:	VM-Konzentrationen im Überstand der Partikelsuspension der VM-CaCO ₃ -nP- und VM-CaCO ₃ -bP-Partikel, MW und SA (n=3).	42
Abb. 12:	MW und SA (n=3) der freigesetzten VM-Konzentration in mg/ml in den Überständen aus VM-CaCO ₃ -HSA 1-Partikeln (Inkubation der VM-CaCO ₃ -Partikel mit HSA erfolgte nach der Präzipitation) und VM-CaCO ₃ -Kontrollpartikeln (VM-CaCO ₃ -Partikel ohne HSA) im zeitlichen Verlauf über 72h. Es ist erkennbar, dass die Kontrollpartikel ohne HSA deutlich mehr VM abgeben, als die mit HSA nachträglich inkubierten Partikel.	44
Abb. 13:	VM-Konzentrationen (MW und SA n=3) in mg/ml der Überstände der VM-CaCO ₃ -HSA 1- und der VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikel über 48h. Die HSA 2-Partikel geben das 10fache an VM ab. (HSA 1= Zugabe HSA nach Präzipitation, HSA 2= Zugabe HSA bei Präzipitation)	45
Abb. 14:	VM-Konzentrationen (MW und SA n=3) in mg/ml der Überstände der VM-CaCO ₃ -Dx-Partikel Typ 1 (Zugabe Dextran bei der Präzipitation) mit 70kD oder 464 kD Dextran, von 0 - 44h. Die 70kD-Dextran 1-Partikel enthalten eine höhere Konzentration an VM.	46
Abb. 15:	Vergleich der VM-Konzentrationen in mg/ml der Überstände der VM-CaCO ₃ -Dx 1-Partikel (Zugabe Dextran nach Präzipitation) und VM-CaCO ₃ -Dx 2-Partikel (Zugabe Dextran bei Präzipitation) mit und ohne weitere Nachinkubation mit VM nach Fertigstellung der Partikel über 24h, MW und SA (n=3).	47
Abb. 16:	Graphischer Vergleich der VM-Konzentrationen in mg/ml der Überstände der VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikel (Zugabe HSA bei der Präzipitation) und VM-CaCO ₃ -Dextran 2-Partikel (Zugabe des Dextrans 70kD bei der Präzipitation) von 0 - 96h, MW und SA (n=3).	48
Abb. 17:	VM-Konzentration in mg/ml im Überstand der F-Partikel (Zugabe Fibrin bei Präzipitation) in PBS bei 37°C bis 24h, Verdünnungsfaktor herausgerechnet. MW und SA (n=3). In den ersten 8h läuft der Großteil der Freisetzung ab.	49
Abb. 18:	VM-Konzentration im Überstand der F-Partikel in PBS bei 37°C bis 264h, Verdünnungsfaktor herausgerechnet. MW und SA (n=3), die F-Partikel geben VM ab, nach 24h beginnt die VM-Konzentration zu sinken.	49
Abb. 19:	FITC-BSA markierte VM-CaCO ₃ -Fibrinpartikel (Zugabe Fibrin bei der Präzipitation) A) in Wasser B) Fibrinhüllen nach Lyse des Kalziumkarbonats durch HCl. Zu erkennen sind die runden Mikropartikel, die das FITC-BSA aufgenommen haben (A) und die Fibrinhüllen, die noch FITC-BSA aufweisen, nachdem das Kalziumkarbonat durch das HCl gelöst wurde (B).	50
Abb. 20:	VM-Konzentration der Überstände der PV-Partikel (VM-CaCO ₃ -	51

Abbildungsverzeichnis

	Fibrinpartikel mit Plasminogen und Alteplase im Überstand bei 37°C in 24h, Verdünnungsfaktors berechnet. MW und SA (n=3).	
Abb. 21:	AFM-Bilder (Atomic Force Microscopy) der Fibrin- und PV-Partikel (mit Alteplase und Plasmin), Ausmessung des vertikalen und horizontalen Durchmessers. Die Fibrinhülle der VM-CaCO ₃ -Fibrinpartikel ist dicker als die Fibrinhülle der VM-CaCO ₃ -PV-Partikel.	53
Abb. 22:	CLSM Aufnahmen mit FITC-BSA markierten VM-CaCO ₃ -PV-Partikeln unter zeitgleicher Zugabe der lysierenden Enzyme Plasminogen und Alteplase bei 37°C. Die Bilder 1 - 6 wurden im 30s Takt aufgenommen. Der Fluoreszenzintensitätsverlauf wurde entlang des roten Strichs in einem Beispielpartikel gemessen. Die Abnahme der Intensität über die Zeit wird deutlich.	54
Abb. 23:	Diffusionskoeffizienten von VM in cm ² /s der verschiedenen Partikelpräparationen mit EXDIF berechnet und MW und SA (n=3). Je kleiner der Diffusionskoeffizient, desto stärker wird die Diffusion des VM aus den Partikeln heraus behindert. Im Säulendiagramm mit den unterschiedlichen Partikelvariationen wird deutlich, dass die HSA 1- und 2-, Dextran 1- und 2- und bP-Partikel die kleinsten Diffusionskoeffizienten besitzen.	55
Abb. 24:	Freisetzung von VM in mg/ml aus VM-CaCO ₃ -bP 1-Partikeln (Zugabe von VM bei Präzipitation, Probe 1) in 24h, mit Fit aus EXDIF-Programm, der an die experimentell gemessenen Werte angepasst wird.	56
Abb. 25:	VM-Konzentrationen in mg/ml im Überstand der Knochen ohne Partikel, Verdünnungsfaktor rausgerechnet, MW und SA (n=3). Nach 4h hat sich ein Gleichgewicht in der Lösung eingestellt.	57
Abb. 26:	MW und SA (n=3) der VM-Konzentration in mg/ml im Überstand der Knochenversuche mit VM-CaCO ₃ -HSA 2-Partikeln (Zugabe von HSA und VM bei der Präzipitation), Verdünnungsfaktor herausgerechnet, a) bis 96h und b) bis 28h. Erkennbar ist der steile Konzentrationsanstieg binnen der ersten 5h und die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der VM-Konzentration in den Partikeln und im Überstand. Im weiteren Verlauf schwanken die Werte bis 96h, verändern sich aber nicht mehr wesentlich.	58
Abb. 27:	SEM Bilder der CaCO ₃ -BSA Partikel	63
Abb. 28:	Schematische Darstellung der CaCO ₃ -Mikropartikelformation, [45].	63
Abb. 29:	Schematische Darstellung der Entstehung eines Fibringerüsts durch Thrombin und Faktor XIII aus Fibrinogendimeren	66
Abb. 30:	Strukturmodell des Vancomycins [74].	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Cierny-Mader Klassifikation der Osteomyelitis [8]	12
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien mit Angabe der Molekulargewichte (MW in g/mol) und der Bezugsquellen	21
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte, mit Typ- und Herstellerangabe	25
Tabelle 4: Übersicht der Diffusionskoeffizienten und Beladungseffizienzen der verschiedenen CaCO ₃ -Partikelsubtypen (nP und bP beziehen sich auf die Anwesenheit von VM im Präzipitationsprozess)	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielles Peptid
BE	Beladungseffizient
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bP	bei Präzipitation
ca.	circa
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Evtl.	eventuell
EXDIF	Experimentelles Diffusionsmodell
FDG	Fluordesoxyglucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ggfs.	gegebenenfalls
HCl	Hydrogenchlorid
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie
HSA	Humanes Serumalbumin
LDH	Lactatdehydrogenase
MP	Mikropartikel
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NW	Nebenwirkungen
nP	nach Präzipitation
OM	Osteomyelitis
PBS	phosphat gepufferte Salzlösung
PMMA	Polymethylmethacrylat

Abkürzungsverzeichnis

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
spp.	species pluralis
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
Ü	Überstand
VM	Vancomycin
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin resistenter Staphylokokkus aureus
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Osteomyelitis

1.1.1 Definition

Die Osteomyelitis (OM) ist eine schwerwiegende und häufig zu Chronifizierung neigende Erkrankung mit einer Inzidenz von 2 - 16% nach offenen Frakturen [1, 2]. Es handelt sich dabei um eine Infektion des Knochens, die Knochenmark, Spongiosa, Kortikalis und Periost befallen kann [3]. Die OM wird unterteilt in die endogene OM, die durch hämatogene Bakterienstreuung entsteht und die exogene OM. Die exogene OM entsteht in der Regel nach offenen Frakturen, Gelenkersatzoperationen oder z.B. durch Infektionen des diabetischen Fußes [4, 5]. Da diese Ätiologien sowie Hochgeschwindigkeitstraumata und Antibiotikaresistenzen erwartungsgemäß ansteigen werden, ist von einer ansteigenden Inzidenz der OM auszugehen [6]. Weil der Anteil der exogenen OM an allen Knocheninfektionen 80% beträgt [7], soll diese Form der OM in dieser Arbeit im Vordergrund stehen. Die endogene Osteomyelitis, die auf hämatogenem Weg entsteht kommt vor allem bei Kindern gehäuft vor. Bei Erwachsenen hingegen entstehen nur 20% der Osteomyelitiden durch eine hämatogen gestreute Infektion [5]. Dabei entsteht die Inflammation nicht durch lokale Infektverschleppung bei Traumata oder Operatio-

nen, sondern durch eine Erregerverschleppung über die Blutbahn. Die Keime werden über das Blut in den Knochen transportiert, vermehren sich dort und lösen die Entzündung aus [3].

Die Osteomyelitis kann entsprechend verschiedener Kriterien klassifiziert werden. Die Waldvogel Klassifikation und die Cierny-Mader Klassifikation stellen die zwei wichtigsten Einteilungen dar (siehe Tabelle 1) [5].

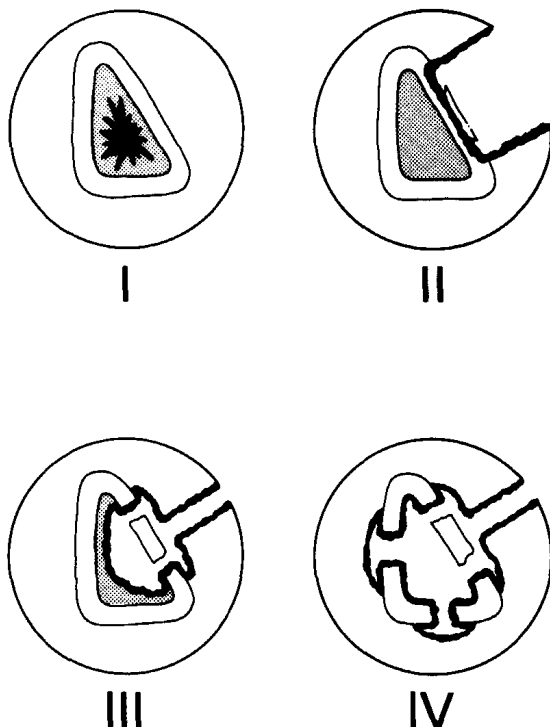


Abb. 1: Anatomische Stadien der Osteomyelitis bei Erwachsenen nach Cierny und Mader. I) medulläre OM, II) superfizielle OM, III) lokalisierte OM, IV) diffuse OM, [8].

Einleitung

Es wird zwischen der hämatogenen Genese und der sekundär durch einen infektiösen Fokus entstandenen Osteomyelitis unterschieden. Letztere wird in Abhängigkeit von einer vaskulären Insuffizienz weiter differenziert [5].

Bei der Cierny-Mader Klassifikation handelt es sich um eine detailliertere Klassifikation, denn es werden vier verschiedene anatomische Varianten und drei verschiedene Patientenphysiologien unterschieden [5]. Im Rahmen der anatomischen Varianten wird zwischen (I) medullärer, (II) oberflächlicher, (III) lokaler und (IV) diffuser Osteomyelitis differiert. Die Zuordnung der Patientenphysiologie beinhaltet einen (A) gesunden Patienten, (B) lokale oder systemische Risikofaktoren oder (C) lokale und systemische Komorbidität, wie zum Beispiel eine lokale Einschränkung der Immunität, Vaskularisierungsstörungen, sowie systemische Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, Immunsuppression und Niereninsuffizienz. Anhand dieser Einteilung können zwölf verschiedene Stadien der Osteomyelitis beschrieben werden [5].

Tabelle 1: Cierny-Mader Klassifikation der Osteomyelitis [8]

Stadium 1	Medulläre Osteomyelitis	Markraum und Endost von Nekrose und Infekt betroffen (hämatogen oder bei Marknagel)
Stadium 2	Oberflächliche Osteomyelitis	Corticalis alleine von Nekrose betroffen, Osteitis (von tiefer Wunde ausgehend oder benachbartem Focus)
Stadium 3	Lokalisierte Osteomyelitis	Kombination von 1 und 2, lokalisiert und mechanisch stabil (ursächlich Operation oder Trauma, fortgeschrittenes Stadium 1 oder 2)
Stadium 4	Diffuse Osteomyelitis	Infektion und Nekrose betreffen die gesamte Zirkumferenz, mechanische Instabilität (Ursächlich Trauma, OP oder fortgeschrittenes Stadium 3)
Physiologischer Zustand	Systemisches Risiko (Bs)	Malnutrition, Nieren- oder Leberinsuffizienz, Diabetes mellitus, respiratorische Insuffizienz, Immundefizienz, Malignom, Neugeborene oder geriatrische Patienten, Immunsuppression
	Lokales Risiko (Bl)	Chronisches Lymphödem, chronisch venöse Insuffizienz, Makroangiopathie, Arthritis, ausgedehnte Narbenbildung, Strahlenfibrose, Vaskulitis, Neuropathie, Nikotinabusus
A-Patient	Keine Comorbidität	
B-Patient	Risikofaktoren	Systemische Risikofaktoren, lokale Risikofaktoren
C-Patient		Behandlung belastender als Krankheit

Eine weitere Unterteilung in akute und chronische Osteomyelitis hat sich aus klinischen Aspekten als unnötig erwiesen [9]. Definitionsgemäß jedoch handelt es sich um eine akute OM, wenn diese innerhalb von vier Wochen nach einem Trauma oder einer Ope-

ration entsteht und um eine chronische OM, wenn die symptomatische Entzündung später als vier Wochen postoperativ oder Jahre danach auftritt [3].

1.1.2 Pathologie

Die exogene OM basiert auf einer Kontamination mit Bakterien, die durch ein Trauma in das Gewebe eindringen. Das Knochen- und Weichteilgewebe kann durch systemische Erkrankungen wie u.a. Diabetes mellitus, chronische Lymphödeme und Vaskulitiden (siehe Tabelle 1) bereits ein Immundefizit aufweisen [3]. Die Bakterien können durch einen Unfall direkt, intraoperativ oder zum Beispiel auf nosokomiale Weg über Drainagen, in die Wunde eintreten [5].

Dabei bietet avitales und minderperfundierte Gewebe, wie beschädigter Knochen und Weichteile, eine optimale Oberfläche, an der Bakterien anhaften und sich vermehren können. Anschließend kommt es durch die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen zu einer Inflammation und zusätzlich häufig durch das entstehende Ödem zu einem Knochenmarksinfarkt. Die Folge stellen lokale Abszesse dar, die sich innerhalb des Knochens ausbreiten, bis sie dessen Oberfläche durchbrechen und mit dem Abheben des Periostes die Blutversorgung unterbrechen. Dadurch entstehen Nekrosen, Sequester und Weichteilabszesse mit Fisteln. Die Eradikation von Bakterien in diesen ischämischen und nekrotischen Arealen stellt sich als besonders schwierig dar [3, 5].

Das Erregerspektrum unterscheidet sich je nach Genese der Erkrankung. Beim diabetischen Fußulkus bilden *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Enterokokken und Peptostreptokokken die häufigsten Bakterienstämme. Bei der Besiedlung von künstlichen Gelenken dominieren koagulase negative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und Streptokokken. Im Gegensatz dazu spielen bei der OM durch offene Frakturen auch andere Keime wie *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Nocardia* spp., Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Plesiomonas* und *Pseudomonas aeruginosa* eine wichtige Rolle. Insgesamt stellt *Staphylococcus aureus* auch in Form von MRSA, gefolgt von *Staphylococcus epidermidis* die häufigste Bakterienart als Ursache der OM dar.

Deutschland ist eines der europäischen Länder mit dem stärksten Anstieg der MRSA-Problematik [10] und da die Resistenzentwicklung rasch zunimmt und bei 60% der koagulasenegativen Staphylokokken eine Methicillinresistenz wahrscheinlich ist, muss eine adäquate Therapie sorgfältig erarbeitet werden [11].

1.1.3 Klinik und Diagnose

Die ersten Symptome treten am häufigsten einen Monat nach Inokulation der Bakterien auf. Die Patienten leiden klinisch unter leichtem Fieber, vermehrtem Wundsekret, lokaler Rötung, Überwärmung und Schmerzen. Laborchemisch zeigt sich eine BSG-Erhöhung und Leukozytose [5]. Da diese Symptome insgesamt sehr unspezifisch sind, gehören für die Diagnostik einer OM Histologie und Mikrobiologie zum Goldstandard [12].

Vor Durchführung einer Operation kann eine Blutkultur zur Keimidentifikation und Diagnosesicherung führen. Da die Blutkultur allerdings in 40% der Fälle falsch negative Ergebnisse bringt, sollte bei einer auffälligen Klinik und negativer Blutkultur eine Knochenbiopsie, z.B. als Feinnadelbiopsie, durchgeführt werden [11, 13].

Intraoperativ entnommene Knochenproben stellen bei drei positiven Proben des gleichen Erregers den gesicherten Nachweis einer OM dar. In der histologischen Untersuchung wird die Anzahl der Leukozyten ermittelt, ab 5 Leukozyten je Gesichtsfeld gilt eine Inflammation als nachgewiesen [14]. Neben Leukozyten liegen im Zusammenhang mit der OM auch vermehrt Plasmazellen und Fibroblasten vor [13].

Zusätzlich zu der Mikrobiologie und Histologie spielen bildgebende Verfahren bei der Diagnostik der OM eine entscheidende Rolle. Eingesetzt werden das konventionelle Röntgen, die Skelett- und Entzündungsszintigraphie, die CT (Computertomographie), die MRT (Magnetresonanztomographie) und die F-FDG-PET (Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie) [15]. Im Röntgenbild ist die Dichteabnahme der Knochensubstanz erst Wochen nach Beginn der Entzündung sichtbar und bedeutet, dass bereits 50-70% der Knochenmatrix abgebaut wurden [5]. Jedoch können auch periostale Knochenanbauten und eine Gelenkspaltverbreiterung im Röntgenbild auf eine OM hinweisen. Die CT stellt Sequester und intraossäres Gas dar, doch auch dieses bildet sich erst im Verlauf der Inflammation [16].

Technetium-99-Knochenszintigraphien zeigen im Zusammenhang mit der OM eine hohe Sensitivität von bis zu 100%, allerdings eine sehr geringe Spezifität von nur 8% [13]. Die höchste Spezifität und Sensitivität weist die MRT auf. Sie stellt Ödeme, exsudative Infektionen, Weichteilabszesse und eine mögliche Knochenmarksbeteiligung dar und sollte daher für die Diagnostik einer OM genutzt werden [16].

1.1.4 Therapie

Die Therapie der OM richtet sich nach dem jeweiligen Stadium der Erkrankung. In der Regel umfasst sie die fünf folgenden Therapieschritte [4, 5, 17]:

- Keimisolierung
- chirurgisches Debridement mit Sequestrektomie
- Weichteilrekonstruktion mit Vaskularisierung
- Knochenrekonstruktion
- Antibiotische Therapie

Dabei kommt stadienunabhängig dem chirurgischen Debridement nach der Keimisolierung zur Infektsanierung die größte Bedeutung zu. Es ist für die Heilungschance elementar, dass der Knochen- und Weichteilmantel bis zu normal durchbluteten Gewebsrändern reseziert wird [4].

Auch das Totraummanagement ist extrem wichtig, denn die freie Knochenhöhle füllt sich mit Blut und Serum, so dass ein Nährboden für Bakterien entsteht [18]. Dieser freie Raum kann mit Knochentransplantaten, PMMA-Kugeln, Keramik oder mit einem alternativen Füllmaterial gefüllt werden [4, 5]. Die Knochenstabilität kann in der Übergangslösung mit Platten, Schrauben oder einem Fixateur externe erreicht werden, ein Fixateur interne wäre prinzipiell auch möglich, birgt allerdings ein höheres Risiko für eine Sekundärinfektion [5]. Auch bei der implantatassoziierten OM fällt der Wechselwirkung von Erreger und Implantat eine bedeutende Rolle zu. Osteosynthesematerial wird direkt im Anschluß an die Operation von körpereigenen Proteinen, wie Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen, Laminin und Vitronectin, ummantelt. Genau für diese Proteine besitzt *Staphylococcus aureus* Rezeptoren, über die sich das Bakterium an das Implantat binden und sich der antibiotischen Therapie entziehen kann. Die adhärenenten Bakterien besitzen eine gesteigerte Antibiotikaresistenz, welche nur im Rahmen von *in-vivo* Labortests simuliert werden kann. Die Wirksamkeit von Antibiotika auf gebundene Keime in der stationären Wachstumsphase ist daher maßgebend.

Andere Bakterien, wie z.B. koagulase negative Staphylokokken, bilden extrazelluläre Polysaccharide, die einen Schutz vor Phagozytose und eine Antibiotikaresistenz bewirken [11]. Die systemische Antibiose im Anschluss an die Operation sollte sechs Wochen lang erfolgen, da die Revaskularisation des operierten Knochens erst nach ca. 4 Wochen eintritt [5]. Bei chronischen Knochenmarksentzündungen sind sechs bis zwölf Monate oraler Antibiose indiziert [19].

Bei den eingesetzten Antibiotika handelt es sich unter anderem um Vancomycin, Clindamycin, Linezolid und Fosfomycin, die durch ihr grampositives Spektrum auch gegen MRSA auffallen und in Kombinationen mit Rifampicin, Levofloxazin u.v.m. sehr wirksam sind [3, 5].

Problematisch bei der systemischen Antibiose ist die Tatsache, dass sie ihren Wirkungsort, den mäßig durchbluteten Knochen und das entzündete Gewebe, wegen der Diffusionsbarrieren nur in geringer Konzentration erreichen kann. Erschwerend kommt hinzu, dass die Maximaldosis durch die starken Nebenwirkungen der antibiotischen Therapie vor allem auf Niere und Leber stark limitiert ist [4, 20]. Die starken Nebenwirkungen fördern eine negative Compliance der Patienten und die großen Mengen an zu verabreichenden Antibiotika bewirken einen hohen Kostenfaktor.

Daher stellt die lokale antibiotische Therapie, vor allem wegen der geringeren Nebenwirkungen, eine sehr interessante Therapiealternative zur systemischen Einnahme dar [4].

1.2 Vancomycin (VM)

Ein optimales Antibiotikum sollte eine gute Bioverfügbarkeit, eine ausreichende Knochenpenetration und eine niedrige Toxizität aufweisen [5]. Des Weiteren sollte es wasserlöslich, bakterizid und hypoallergen sein [21].

Vancomycin (VM) ist ein Breitspektrum Glykopeptidantibiotikum gegen grampositive Organismen [6]. Es hemmt die Zellwandsynthese und stört somit die osmotische Stabilität der Zellmembran. Mit diesem Mechanismus zerstört VM Bakterien wie MRSA, *S. epidermidis*, Streptokokken und Enterokokken [21].

Außerdem werden VM und Aminoglykoside bei der Besiedlung von *S. aureus*, MRSA und *S. epidermidis* am häufigsten verwendet, da sie hypoallergen und hitzestabil sind und ein breites Wirkspektrum besitzen [17, 22]. Im Gegensatz zu Aminoglykosiden, Cefazolin, Rifampicin und Chinolonen, weist VM weniger Nebenwirkungen (NW) auf das Knochenwachstum auf [17]. VM besitzt eine Plasmahalbwertszeit von 6h und liegt im Blut zu 50% gebunden an Plasmaproteine vor. Es diffundiert in extrazelluläre Flüssigkeiten, wie Synovial-, Pleural- und Perikardflüssigkeit, und weist als wichtigste Nebenwirkungen eine Nephro- und Ototoxizität auf [6].

Wegen der oben genannten Eigenschaften stellt VM die bislang etablierteste Substanz zur Therapie der OM dar und wurde in dieser Arbeit als Modell-Antibiotikum verwendet [6].

1.3 Carrier

Am häufigsten werden als Trägersubstanzen mit Antibiotika beladene Kugeln, Nägel oder Zement aus Polymethylmethacrylat (PMMA), Knochentransplantate, Kollagenschwämme und Keramik (aus Hydroxyapatit, Carbonatapatit oder Kalziumsulfat) verwendet [4]. Sie besitzen den Vorteil, dass anhand einer einmaligen Applikation Antibiotika über einen langen Zeitraum lokal freigesetzt werden können [23].

Die antibiotischen PMMA-Ketten, die Tobramycin oder Gentamycin enthalten, werden nach 2-4 Wochen entfernt und anschließend durch ein Knochentransplantat ersetzt [5, 22]. Der Nachteil der Ketten besteht in der initial hohen Konzentration an Antibiotikum, die im weiteren Verlauf rapide abfällt [24]. Dabei erhöht vor allem eine längere Freisetzung niedriger Konzentrationen das Risiko für die Entstehung von Resistenzen [20]. Ungünstig ist außerdem die Tatsache, dass zur Entfernung der eingewachsenen Ketten ein weiterer operativer Eingriff notwendig ist [4, 23]. In diesem Zusammenhang bietet der PMMA-Nagel Vorteile, denn durch seine metallische Verstärkung vermag er die Knochenstabilität aufrechtzuerhalten und wird weniger von Granulationsgewebe umwachsen, so dass er auch noch nach einem längeren Zeitraum einfach entfernt werden kann [22].

Bei den standardmäßig genutzten PMMA-Gentamycinketten bilden sich häufig so genannte small colony variants des Erregers *S. aureus*. Diese persistieren bei einer adäquaten antibiotischen Therapie, indem sie von Phagozyten aufgenommen aber nicht vollständig abgebaut werden und Monate später zu einer Reinfektion führen können [11]. *In vitro* Studien konnten nachweisen, dass Bakterienwachstum auch auf dem mit Antibiotikum beladenen Zement stattfindet [25].

Weitere Nachteile des PMMA-Materials (z.B. als PMMA-Zement) bestehen in seiner lokalen Immunsuppression, durch Hemmung der Leukozyten und in der aseptischen Lockerung von Prothesen [4, 5]. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass das PMMA-Material Makrophagen anlockt und diese, wenn sie PMMA-Bruchstücke phagozytieren, selbst der Zellyse verfallen und LDH (Lactatdehydrogenase) freisetzen. Die Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren führt im Knochen zu Fibrose und Kno-

Einleitung

chenresorption. Insgesamt entspricht der Vorgang einer granulomatösen Reaktion des Wirtes auf das PMMA, und als Folge kann eine Prothesenlockerung entstehen [26]. Zusätzlich geben die PMMA-Kugeln nur 50% des enthaltenen Antibiotikums nach 4 Wochen ab [21] und der PMMA-Knochenzement gibt nur ca. 5% der enthaltenen Antibiotika an die Umgebung ab [27]. Mit Antibiotikum inkubierte Knochentransplantate besitzen die beste Knochenbindung und werden aus der Fibula oder dem Os ilium entnommen, auch Allografte können verwendet werden, jedoch können sie infektiöse Krankheiten übertragen [5, 28].

Der Kollagenschwamm besitzt die günstige Eigenschaft, dass er nicht entfernt werden muss und in seiner Form flexibel angepasst und dadurch optimal in den Totraum eingesetzt werden kann. Die Freisetzungskinetik ist anfangs zufriedenstellend hoch, gewährleistet jedoch keine langfristige Abgabe [20]. Auch Keramik kann mit Antibiotika beladen werden und besitzt eine mechanische Stabilität, die mit Knochen vergleichbar ist. Vorteile diesen Materials bestehen darin, dass es eine weitere Operation und das Totraummanagement erspart und eine [3, 29] vielfach höhere Antibiotikakonzentration als akrylischer Knochenzement aufweist [30, 31]. Allerdings besteht bei Persistenz der Infektion oder bei einer Reinfektion die Gefahr einer Fremdkörperreaktion auf die Keramik [31]. Auch die implantierte Medikamentenpumpe mit Clindamycin und Amikacin [5] muss am Ende der Behandlung operativ entfernt werden [18]. VM kann aufgrund seiner Instabilität in flüssigem Medium nicht in der Pumpe verwendet werden [24].

Eine optimale Trägersubstanz für die antibiotische Therapie sollte am Zielort ausreichend hohe Mengen an Arzneimittel abgeben, eine langsame und kontinuierliche Freisetzung über einen Zeitraum von 4-6 Wochen gewährleisten und biologisch abbaubar sein, damit kein weiterer Eingriff notwendig wird [21]. Besonders vorteilhaft ist, dass resorbierbare Substanzen im Knochen nur langsam zersetzt werden und sich dadurch das regenerative Knochenwachstum anpassen kann, ohne dass ein weiteres Totraummanagement nötig wäre [21].

Als biologisch abbaubare Trägersubstanzen für die Antibiotika wurden bisher Kalziumpolyphosphat, Kalziumphosphatzement, Gipskugeln, Chitosanmikrosphären, Liposomen und Polymere (aus Polylactide-Polyglykolid, Polycaprolacton, oder Polylactide) untersucht [22].

Sasaki et al. 2005 zeigten, dass Kalziumphosphatzement eine besonders gute Knochenbindung aufweist und *in vitro* zwei Wochen lang höhere Antibiotikamengen freiset-

zen kann als Knochenzement [32]. Chitosanmikrosphären wurden von Cevher et al. 2006 untersucht. Sie stellten fest, dass das Chitosan bis zu 300h lang Antibiotika freisetzen kann [6]. Petrone et al. 2008 arbeiteten mit Kalziumpolyphosphat und bemerkten, dass eine Antibiotikaabgabe über 500h möglich ist und verschiedene Antibiotika kombiniert werden können [1]. Mousset et al. 1995 betrachteten die Freisetzung verschiedener Antibiotika aus Gipskugeln. Dabei stellten sie fest, dass die aus Kalziumsulfathemihydrat bestehenden Kugeln eine hohe Biokompatibilität aufweisen und physiologisch resorbiert werden [18]. Liu et al. 1999 zeigten, dass Polylactide-Polyglykolid Polymere, die aus einem Polymer mit größerer molekularer Masse hergestellt wurden, zu einer verlängerten Freisetzung an Antibiotika führen [21]. Hendricks et al. 2001 stellten dar, dass Polycaprolactonimplantate beladen mit Tobramycin zu einer höheren Tobramycinkonzentration im Knochen führen als PMMA-Material [33].

Die Polycaprolactonpolymere setzen *in vitro* Antibiotika für bis zu 40 Wochen lang frei und sind *in vivo* mehrere Wochen lang wirksam. Allerdings weisen sie eine verminderte Knochenbindung auf und provozieren gelegentlich ungünstige Gewebsreaktionen [34].

Biologisch abbaubare Substanzen als Carrier für die antibiotische Therapie sind aus mehreren Gründen anzustreben: sie benötigen keinen weiteren invasiven Eingriff zur Entfernung, hinterlassen keine Hohlräume und stellen langfristig keinen Fremdkörper dar, an den sich die Bakterien anhaften können, um zu persistieren [4].

Es wird bei der Therapie der Osteomyelitis eine Kombination von systemischer und lokaler antibiotischer Therapie angestrebt, und eine Sensitivitätsprüfung der Keime auf das Antibiotikum sollte vor Therapiebeginn unbedingt erfolgen [20, 21].

Jedoch ist bislang der Einsatz dieser physiologisch abbaubaren Substanzen *in vivo* stark limitiert, da die Aufnahme der Medikamente in die Trägerstoffe, die eingeschränkte Medikamentenfreisetzung und komplizierte Herstellungsverfahren noch nicht optimiert werden konnten [20, 33].

1.4 Kalziumkarbonat

Als abbaubare Trägersubstanz wurde Kalziumkarbonat ausgewählt, da dieses einen festen Bestandteil biologischer Systeme darstellt und dadurch eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Resorbierbarkeit aufweist [35]. Aus diesem Grund wird Kalziumkarbonat bereits vielfältig in der Industrie eingesetzt. Darunter unter anderem in Kosmetika, Zahnpasta und in der Papierindustrie [36]. CaCO_3 -Partikel besitzen Poren und Ka-

näle im Nanometerbereich, anhand derer sie Makromoleküle, wie Proteine, aufnehmen und abgeben können [35].

Der isoelektrische Punkt dieser Partikel liegt bei $\text{pH} = 8,5$, d.h. dass sie bei einem niedrigeren pH-Wert positiv geladen vorliegen und es somit mit einem negativ geladenen Molekül zu einer optimalen Beladung kommen könnte. Die poröse Oberfläche der Kalziumkarbonatkugeln variiert stark durch hinzugefügte Substanzen während der Herstellung. Ihr Einfluss auf die Partikelmorphologie und die kinetischen Eigenschaften soll in dieser Arbeit untersucht werden [37].

1.5 Zielstellung

Vancomycin ist zur Behandlung einer MRSA assoziierten Osteomyelitis ein etabliertes Antibiotikum [17, 21]. Es muss in hohen Dosen intravenös appliziert werden, um einen therapeutisch wirksamen Arzneimittelspiegel im Knochen zu erreichen. Es ist deshalb erstrebenswert, eine lokale Darreichungsform von VM zur Verfügung zu stellen, die bei einmaliger Anwendung über mehrere Tage wirksam ist. Dadurch könnten bei lokal höherer Wirksamkeit die ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen vermieden werden. Ausgehend von der Vorstellung, dass Antibiotika enthaltende Mikropartikel vollständig vom Knochen resorbiert werden, sollen Kalziumkarbonat-Mikropartikel hergestellt, mit VM beladen und der Release von VM aus den Mikropartikeln quantifiziert werden. Die Mikropartikel sollen in einem Copräzipitationsverfahren in Gegenwart verschiedener Biopolymere hergestellt werden, die ihrerseits nach der Präzipitation vernetzt werden. Die Beladungseffizienz und die Freisetzungskinetik von VM werden in Abhängigkeit von der Art der Biopolymere sowie deren Vernetzung untersucht.

Anhand der Ergebnisse werden Möglichkeiten für einen therapeutischen Einsatz der modifizierten Mikropartikel im Rahmen der Osteomyelitistherapie aufgezeigt und diskutiert.

2 Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Materialien

Plasma

Das Plasma wurde aus Vollblut von freiwilligen Spendern der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité gewonnen, deren schriftliche Zustimmung vorliegt. Das Blut wurde mit Heparin antikoaguliert, die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 x g, 10 min) und das Plasma wurde abgenommen.

Knochen

In der Gewebekbank des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité wurden 1 cm³ große, entfettete und sterilisierte Spongiosawürfel hergestellt [38]. Das Ausgangsmaterial wurde unter Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen entnommen.

2.1.2 Chemikalienliste

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien mit Angabe der Molekulargewichte (MW in g/mol) und der Bezugsquellen

Chemikalie	MW (g/mol)	Bezugsquelle
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	105,99	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetonitril (CH ₃ CN)	41,05	Merck KGaA
Actilyse (Alteplase)	59007,9	Boehringer Ingelheim Pharme GmbH & Co. KG
Amphotericin B	924,08	Biochrom AG
Ampuwa Aqua dest.	18	Fresenius Medical Care
Bovines Serum Albumin (BSA)	66432,3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Methoden

Calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	147,02	Merck KGaA
Dextran (von <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	464	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dextran (von <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	70	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Divinylsulfon 97% ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$) $_2\text{SO}_2$	118,15	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid)	78,13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	292,24	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol 96%	46,07	Merck KGaA
FITC-BSA (Fluorescein isothiocyanate bovines Serumalbumin)	66432,3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FITC-Dextran (Fluorescein isothiocyanate Dextran)	4.400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Humanes Serum Albumin (HSA)	66248	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat ($\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$)	136,09	Merck KGaA
Lysinhydrochlorid	182,65	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	40	Merck KGaA
Phosphat Buffer Saline (PBS)	73,85	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Plasminogen	81000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	36	Merck KGaA
Tissuecol Duo S 0,5ml (Thrombinlösung: Thrombin 250 IE, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,94 mg)	36.147	Baxter GmbH
Vancomycinhydrochlorid	1449,25	Cellpharm GmbH

2.1.3 Puffer/ Lösungen

PBS

1 l 0,01 M PBS-Lösung von Sigma-Aldrich Chemie GmbH enthält 0,138 M NaCl und 0,027 M KCl.

Die mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung wurde in 1 l Aqua dest. gelöst und auf pH 7,4 und pH 8,0 eingestellt.

HCl

37%ige rauchende Salzsäure (HCl) von Merck KGaA wurde in 1 l Aqua dest. zu einer 0,1 M und 0,2 M HCl-Lösung verdünnt.

EDTA

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 99% Titration von Sigma-Aldrich Chemie GmbH wurde mit Aqua dest. zu einer 0,4 M Lösung mit pH 4 verdünnt.

Plasminogen

Plasminogen wurde in PBS pH 7,4 mit 20 mM Lysinhydrochlorid zur physiologischen Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt. Zur Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin wurde Alteplase 0,005 mg/l hinzugegeben.

2.2 Geräte

2.2.1 Photometer

Für die photometrischen Messungen wurde das Spektrophotometer K2800 der Firma Hitachi (Tokio, Japan) genutzt. Dieses ermöglicht die Aufnahme von Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 190-1100 nm [39].

2.2.2 Hochdruck-Flüssigkeitschromatography (HPLC)

In der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) werden Substanzen nach ihren chemischen Eigenschaften räumlich aufgetrennt und anschließend werden die Konzentrationen photometrisch im UV-Spektralbereich bestimmt [40]. Im Vergleich zu anderen Messverfahren wie Bioassay, Radio-immunoassay (RIA), Fluoreszenz-

polarisations-immunoassay (FPIA) und Enzyme-multiplied-immunoassay (EMIT) ist die HPLC zuverlässiger und sensitiver [41, 42]. Für dieses chromatografische Trennverfahren wurde die HPLC Hp 1050 Series und eine Hyperclon 3M BDS C8 130 Säule (Phenomenex) genutzt. Eine Vorsäule (guard cartridge KJO 4282, Phenomenex) schützte vor Verschmutzung der Hauptsäule. Die Reverse Phase HPLC ermöglicht es, Vancomycin bei einer Wellenlänge von 282 nm quantitativ zu detektieren [43]. Dazu werden Acetonitril und eine Lösung 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat mit pH 2,8 als Laufmittel verwendet. Dies erfolgt unter Gradiententrennung, indem während der Analyse die Zusammensetzung der mobilen Phase wie folgt variiert wird: 3% Acetonitril für 1,5 min, stufenweise Erhöhung auf 20% bei 11,5 min, Beibehaltung dieser Konzentration bis 14 min und anschließend graduelle Senkung auf 3% bei 15 min. Dieses Konzentrationsverhältnis (3% Acetonitril und 97% Kaliumdihydrogenphosphat) wird noch für weitere 10 min beibehalten. Die Laufzeit beträgt insgesamt 25 min bei einem Fluss von 1,5 ml/min [43]. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (20-22°C).

2.2.3 Bestimmung der Vancomyckonzentration in wässrigen Lösungen

Die Konzentration wässriger Vancomycinlösungen (VM) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 282 nm bestimmt, da VM dort im UV-Wellenlängenbereich ein Absorptionsmaximum besitzt. [6]

Um Eichkurven im Photometer für die Konzentrationsbereiche 0,005 - 0,4 mg/ml von Vancomycin zu erstellen, wurden Messreihen beginnend mit der niedrigsten Konzentration immer in derselben Plastikkuvette (Sarstedt Deutschland, Acrylic No. 67.740) durchgeführt und jede Probe zweimal gemessen. Alle Konzentrationen wurden sechsmal angesetzt, wie oben beschrieben gemessen, anschließend der Mittelwert bestimmt und eine Eichgerade erstellt, so dass insgesamt die Anzahl der Messwerte je Konzentration 12 betrug.

Um mögliche Tagesschwankungen der Photometerlampen auszugleichen wurde vor jeder weiteren Messung die Absorption von drei bekannten Konzentrationen ermittelt. Entsprechend der Erstellung einer Eichkurve des Photometers, wurde diese Verdünnungsreihe auch für die HPLC erstellt. Anschließend wurden die beiden Eichkurven miteinander verglichen und auf ihre Linearität geprüft.

2.2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Verwendet wurde das CLSM 510 META (Carl Zeiss AG). Es ermöglicht das Erkennen von Strukturen einer Größe bis zu 0,2 μm und eine dreidimensionale Präsentation einzelner Strukturen als Z-Stacks, d.h. als vertikale Folge einzelner horizontaler Schnitte. Zusätzlich besitzt das CLSM verschiedene Laser, darunter sichtbare und UV-Laser, mit einem Wellenlängenbereich von insgesamt 351 - 633 nm [44].

Es wurden Aufnahmen der Partikel im Durchlichtverfahren und bei Fluoreszenzanregung nach Inkubation der Partikel mit FITC-BSA (Anregung durch die 488 nm Emissionslinie des Argonlasers) angefertigt.

2.2.5 Geräteliste

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte, mit Typ- und Herstellerangabe

Gerät	Typ	Hersteller
HPLC Computer	Hp 1050 Series	Hewlett Packard GmbH
HPLC Säule	Hyperclon 3M BDS C8 130	Phenomenex Inc.
HPLC Säulenwechsler	Lab Pro	TechLab GmbH
HPLC Vorsäule	guard cartridge KJ0-4282	Phenomenex Inc.
Konfokales Lasermikroskop	LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG
Magnetrührer	HA 56.1	Carl Roth GmbH & Co.KG
PH Meter	766 Climatic	Knick GmbH & Co.KG
Spektrophotometer	K 2800	Hitachi GmbH
Probenbehälter	Gewindeflasche	VWR International GmbH
Probendeckel	Schraubdeckel	VWR International GmbH
Rollator 1	RM 5 Assistent 348	Hecht-Assistent GmbH & Co.KG
Rollator 2	Intellimixer RM-2L	Elmi Ltd
Trockenschrank	Function line	Heraeus GmbH
Ultraschallbad	Transsonic 420	Elma GmbH & Co.KG
Vortex	Vortexgenie 2	Scientific Industries Inc.
Waage	Explorer No E 10640	Ohaus GmbH
Wärmeschrank	Typ B 26	Memmert GmbH & Co.KG
Zentrifuge 1	Typ 1705	Hettich GmbH & Co.KG
Zentrifuge 2	Mikro 22R	Hettich GmbH & Co.KG

2.3 CaCO₃-Mikropartikelherstellung

Die Synthese der CaCO₃-Mikropartikel erfolgte aus einer CaCl₂- und einer Na₂CO₃-Lösung [35, 37]. Es wurde jeweils mit 0,3 M Lösungen gearbeitet. Der CaCl₂-Lösung wurde unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer die Na₂CO₃-Lösung zugegeben.

Um die Auswirkungen von Rührgeschwindigkeit und Rührdauer auf die Partikelgröße zu untersuchen, wurden diese variiert. Insgesamt wurden 9 verschiedene Verfahren getestet - jeweils 3 Geschwindigkeitsstufen RI-RIII (4, 7 und 10 Umdrehungen pro Sekunde) für eine Rührzeit von 10 s, 20 s und 40 s. Jede der 9 verschiedenen Gruppen wurde dreimal angesetzt.

Die entstehende trübe Suspension wurde bei 2.500 x g eine Minute lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und auf dem Vortex gemischt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, um überschüssiges NaCl zu entfernen. Nach dem dritten Waschvorgang lag das Präzipitat in klarem Wasser vor und wurde mikroskopisch analysiert.

2.3.1 Beladung mit VM nach Präzipitation der CaCO₃-Partikel („VM-CaCO₃-nP“)

Die CaCO₃-Partikel wurden wie unter 2.3 beschrieben synthetisiert und gewaschen. Anschließend wurden sie eine Stunde lang auf dem Rollator in einer VM-Lösung (2,5 g/dl bzw. 1 g/dl Lösung) resuspendiert und 1 h lang inkubiert, um eine Adsorption des Antibiotikums an den porösen Partikel zu erreichen [37, 45]. Abschließend wurden die Partikel dreimal gewaschen.

2.3.2 Präzipitation der CaCO₃-Partikel in Anwesenheit von VM („VM-CaCO₃-bP“)

Im Gegensatz zu 2.3.1 können die Partikel auch bereits während der Präzipitation mit VM beladen werden. Dabei wurde die Substanz, in diesem Fall VM, bereits vor der Partikelherstellung dem CaCl₂ zugefügt. Geschah dies mit einer VM-Lösung, dann wurde das Na₂CO₃ äquimolar mit Wasser verdünnt oder aber das VM in Pulverform zu der CaCl₂-Lösung hinzugegeben, so dass drei verschiedene VM-Konzentrationen

eingestellt wurden (Endkonzentration in den Lösungen 1 g/dl, 1,66 g/dl und 2,5 g/dl) [37, 46].

2.3.3 Auflösen der Partikel

Die VM-CaCO₃-Partikel können mit einer 0,4 M EDTA- oder einer 0,2 M HCl-Lösung aufgelöst werden [37]. Dabei wurde die Suspension klar und H₂CO₃ wurde frei. Anschließend konnte die in den Partikeln enthaltene VM-Konzentration photometrisch ermittelt werden.

2.3.4 VM-Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit Biopolymeren

Die Kalziumkarbonat-Mikropartikel wurden in Kombination mit verschiedenen Polymeren, wie Humanes Serumalbumin (HSA), Dextran und Fibrin, hergestellt. Bei den folgenden Variationen wurde das VM immer bereits während der Präzipitation der CaCO₃-Partikel hinzugegeben, entsprechend den VM-CaCO₃-bS-Partikeln. Die Polymere wurden jeweils in zwei verschiedenen Formen appliziert, indem die Partikel erst nach der Präzipitation mit HSA-, Dextran- oder Fibrin oder bereits bei der CaCO₃-Präzipitation anwesend waren. So dass ein Einschluss dieser Stoffe zusammen mit VM stattfand.

Im Einzelnen werden diese Herstellungsverfahren in den folgenden Abschnitten erläutert.

2.3.4.1 Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM und HSA-1 („VM-CaCO₃-HSA 1“)

Die Partikel wurden in 40ml einer CaCl₂-Na₂CO₃-Lösung mit 12,5 mg/ml VM präzipitiert und anschließend mit einer HSA-PBS-Lösung (10 mg/ml) eine Stunde auf dem Rollator inkubiert.

Anschließend wurden die Partikel dreimal mit PBS pH = 7,4 gewaschen. und nach Abnahme des Waschüberstandes wurden 15 ml PBS auf die VM-CaCO₃-Partikel gegeben. Abschließend erfolgte eine Aufteilung auf 15 Eppendorftubes mit jeweils 1 ml Inhalt.

2.3.4.2 Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM und HSA-2 („VM-CaCO₃-HSA 2“)

Die Partikel wurden mit 40 ml der CaCl₂-Na₂CO₃-Lösung, die 12,5 mg/ml VM enthielt, unter Zugabe von 20 ml einer 10 mg/ml HSA-Lösung, hergestellt. HSA und VM lagen während der Präzipitation vor. Nach dem Waschvorgang wurde das Sediment bis auf 30 ml PBS aufgefüllt und auf 30 Eppendorftubes je 1 ml verteilt.

2.3.4.3 Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM und Dextran-1 („VM-CaCO₃-Dx 1“)

Herstellung der Partikel mit 12,5 mg/ml VM in 40 ml einer CaCl₂-Na₂CO₃-Lösung bei der Präzipitation. Anschließend wurden auf das Sediment 20 ml einer 200 mg/ml Dextranlösung (464 kD oder 70 kD) gegeben und für eine Stunde auf den Rollator gelegt.

Nach drei Waschvorgängen, davon zwei mit PBS und einer mit NaOH 0,1 M wurde der Überstand nach Zentrifugation (1 min. bei 2000 x g) abgenommen.

Die Vernetzung des absorbierten Dextrans erfolgte in 10 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung, die 0,001 mg/ml Divinylsulfon enthielt, für 2 h auf dem Rollator [47].

Abschließend wurden die Partikel dreimal mit PBS gewaschen und auf Eppendorfröhrchen verteilt.

2.3.4.4 Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM und Dextran-2 („VM-CaCO₃-Dx 2“)

Die Partikelsynthese wurde wie in 2.3.4.3 durchgeführt, allerdings mit dem Unterschied, dass das Dextran (4 g, 70 kD) auch bereits bei der Präzipitation der CaCO₃-VM Partikel dazugegeben wurde. Anschließend erfolgten die zweistündige Vernetzung mit 10 µL Divinylsulfon in 5 ml 0,2 M NaOH und die 3 Waschvorgänge.

Zusätzlich wurde ein Teil der Partikelproben nach der Vernetzung für eine Stunde in eine 12,5 mg/ml VM-Lösung gegeben und mit VM nachinkubiert.

Die Partikel wurden bis auf 30 ml PBS aufgefüllt und auf 30 Eppendorfröhrchen verteilt.

2.3.4.5. Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM und Fibrin („VM-CaCO₃-Fibrin“)

Plasma wurde für 10 min bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand ohne Thrombozyten weiterverarbeitet. Anschließend erfolgte die Herstellung einer 31,25 mg/ml Na₂CO₃-Plasma-Lösung (0,25 g Na₂CO₃ auf 8 ml Plasma, entsprach 0,3 M).

In 8 ml einer 0,3 M CaCl₂-Lösung wurden 300 mg VM gelöst, zu einer 37,5 mg/ml VM-Konzentration. Aus den jeweils 8 ml wurden wie oben beschriebenen VM-CaCO₃-Partikel hergestellt und dreimal mit einer 18 mg/ml VM-Lösung (entsprach Ausgangskonzentration) gewaschen. Anschließend wurden die Partikel nach Abnahme des Waschüberstandes auf 3 Eppendorfröhrchen verteilt und in jedes Röhrchen 0,15 ml einer Thrombinlösung gegeben. Nach Durchmischen auf dem Vortex wurden diese für 10 min auf den Rollator gelegt.

Danach wurden sie bei 500 x g für 1 Minute dreimal mit Aqua dest. gewaschen und in dieser Form in den entsprechenden Versuchen eingesetzt.

2.3.4.6. Kalziumkarbonat-Mikropartikel mit VM, Fibrin und Enzymen („VM-CaCO₃-PV“)

Die Fibrinpartikelherstellung erfolgte wie unter 2.3.4.5, anschließend wurde ein Langzeitversuch im Wärmeschrank bei 37°C durchgeführt, bei dem insgesamt 6,5 ml einer 0,2 mg/ml Plasminogen-Lösung und 0,0005 mg/ml einer Alteplase-Lösung zugegeben wurden. Dies entsprach physiologischen Konzentrationen [48].

Als Kontrolle der Vernetzung wurden die aufgelösten Fibrinpartikel stark zentrifugiert (10 min 20000 x g), und die transparenten, nicht aufgelösten Fibrinhüllen wurden als Sediment sichtbar.

2.4 Langzeitversuche

2.4.1 Langzeitversuch A

Die Langzeitversuche erfolgten mit den oben genannten Partikeln, indem zu diesen eine bekannte Menge an PBS-Lösung (ggfs. mit Enzymen) gegeben wurde, und die Probe nach gründlichem Vermischen auf Eppendorfröhrchen in 1 ml Portionen aufgeteilt wurde.

Anschließend konnte zeitabhängig jeweils ein Eppendorfröhrchen ausgewertet werden. Dazu wurden die Röhrchen zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Par-

tikel mit 0,2 M HCl-Lösung aufgelöst und quantitativ die VM-Konzentration untersucht. Diese Methode wurde, abgesehen von den Fibrinpartikeln, für alle Langzeitversuche angewendet.

2.4.2 Langzeitversuch B

Dieser Versuchsaufbau wurde für die VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-PV-Partikel sowie die Knochenversuche angewendet. Auch hier wurde zu den Partikeln eine bekannte Menge an PBS-Lösung (ggfs. mit Enzymen) gegeben, allerdings wurde die Probe anschließend nicht aufgeteilt, sondern verblieb in einem großen Falckontube auf dem Rollator oder im Wärmeschrank bei 37°C. Zeitabhängig wurde nach Zentrifugation (1 min 2000 x g) ein Teil des Überstandes (350 µL) abgenommen und auf die enthaltene VM-Menge untersucht. Die entnommene Flüssigkeitsmenge wurde durch ein gleiches Volumen an frischer Lösung ersetzt.

Da dieser Vorgang zu einer Verdünnung der eigentlichen VM-Konzentration führte, wurde bei den Ergebnissen der Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Folgende Formel wurde in diesem Zusammenhang verwendet:

$$C_{i+1}(\text{VM}) = C_{\text{mess}} + (V_{i+1}/V_{\text{des}}) \times \sum_{j=1}^i C_j$$

2.5 Diffusionskoeffizient

Der Flux einer Materie verläuft proportional zum Gradienten der Konzentration [49]. Das 1. Ficksche-Diffusionsgesetz beschreibt den Diffusionsstrom M als die Substanzmenge, welche eine Schicht der Dicke d und Fläche F , direkt proportional zur Konzentrationsdifferenz C , durchdringt ($M = D \times F/d \times C$).

Dabei ist der Diffusionskoeffizient D ein Proportionalitätsfaktor, der von der Temperatur, den diffundierenden Molekülen und dem Diffusionsmedium abhängig ist [50].

Wenn der Konzentrationsgradient zeitlich nicht konstant ist, gelangt das 2. Ficksche Diffusionsgesetz zur Anwendung. Dies träfe auf die vorliegende Arbeit eigentlich zu, da durch den Austritt an VM der Gradient stets verändert wird und die Konzentration an VM in den Partikeln kontinuierlich abnimmt.

Da der Aufwand für die Modellierung aber erheblich ist und für eine vergleichende Untersuchung des Einflusses unterschiedlich hergestellter MP keine zusätzlichen qualitativen Informationen liefert, wurde die Auswertung anhand des 1. Diffusionsgesetzes durchgeführt.

Mit der Diffusionsgleichung nach dem ersten Fickschen Gesetz (siehe unten) kann der Koeffizient D berechnet werden, welcher die Diffusionseigenschaften von Molekülen in Materialien definiert:

$$D = k \times T / (6 \times \pi \times \eta \times r)$$

Dabei ist k die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität des Lösungsmittels, r der hydrodynamische Radius des Moleküls.

k : $1,38 \times 10^{-23}$ J/K

T : 310 K

η : 0,9 mPas

r (VM): 1,1 [51]

Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten erfolgt mit dem Computerprogramm EX-DIF. Es handelt sich dabei um ein Regressionsprogramm, welches ein Diffusionsprofil findet, das am besten an die experimentellen Daten angepasst ist und anhand dieser die Diffusionskonstante berechnet [52].

Der Diffusionskoeffizient wurde zur Interpretation der Daten herangezogen, wohlwissend, dass den experimentellen Daten keine reine Diffusion zu Grunde liegt, sondern zusätzlich eine Konvektion überlagert ist. Da aber die Rotation unter stets identischen Bedingungen stattgefunden hat, sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar.

2.6 Knochenmodell

Die entfetteten, sterilisierten und auf 1 cm^3 zugeschnittenen Spongiosaquader (Gewebebank, Institut für Transfusionsmedizin, Charité) wurden in einem Plastikring befestigt und in die „Deckelgläser“ gestellt. Durch den Plastikring konnte ein Verrutschen des Knochens verhindert werden. Die Materialien, mit denen der Quader in Kontakt kam, wurden zuvor mit Alkohol ausgesprüht und getrocknet, um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit Keimen zu minimieren.

Methoden

Umgeben waren die Spongiosaquader von PBS pH = 7,4 mit Amphotericin B (125 µl/ml), um ein Pilzwachstum auf der Spongiosa zu inhibieren.

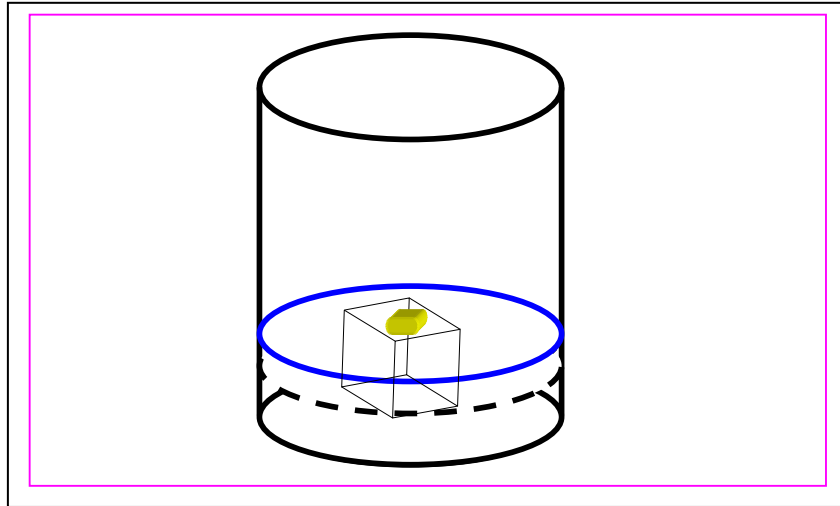


Abb. 2: Schematische Darstellung des Knochenmodells. Der Spongiosaquader wurde in einem Deckelglas durch einen Plastikring fixiert und war bis zur Oberkante von einer PBS-Lösung umgeben. Die Probe der Mikropartikel wurde auf die apikale Fläche des Knochens appliziert, das Glas mit einem Deckel verschlossen und in den Wärmeschrank bei 37°C gestellt .

2.6.1 Knochenvorversuch

Im Rahmen der Vorversuche wurden die Spongiosapräparate wie oben beschrieben vorbereitet und eine VM-Lösung bekannter Konzentration auf den Knochen gegeben. Anschließend konnte zeitabhängig ermittelt werden, wie schnell das VM in die den Knochen umgebende Flüssigkeit übertrat

Durchgeführt wurde dieser Versuch mit denselben Knochen, die anschließend für den Versuch mit Partikeln genutzt wurden.

Es wurden 100 µl Lösung mit einer Konzentration von 8 bzw. 16 mg/ml verwendet. Jeder Ansatz wurde dreifach durchgeführt.

Da für jede Probenabnahme 350 µL Flüssigkeit entnommen werden mussten, wurde diese durch 350 µL frische PBS-Amphotericin-Lösung ersetzt.

In der Ergebnisinterpretation wurde der Verdünnungsfaktor herausgerechnet (Formel s.2.4.2).

2.6.2 Knochenversuch

Für die Knochenversuche wurden VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel aus einer 25 mg/ml VM-CaCl₂-Lösung und 10mg/ml HSA-Na₂CO₃-Lösung synthetisiert (125 mg VM in 5 ml CaCl₂ und 50 mg HSA in 5 ml Na₂CO₃). Die Präzipitation des CaCO₃ erfolgte in Anwesenheit von VM und HSA. Das Sediment wurde mit 80 µL Aqua dest. verdünnt und insgesamt 50 µL Partikel auf die Knochen gegeben.

Die PBS-Amphotericin-Lösung wurde exakt bis zur Oberkante der Knochenquader in die Bechergläser gegeben, so dass diese vollständig mit der Flüssigkeit getränkt waren aber nicht darin schwammen. Dies war notwendig, um zu garantieren, dass ein Tropfen, der auf die Spongiosaoberfläche gegeben wurde, erst in die Spongiosa diffundierte und nicht direkt in die umgebende Flüssigkeit. Dieser Versuch wurde auf drei verschiedenen Knochenproben durchgeführt. Auf Knochen-1: 4,8 ml und auf Knochen-2 und Knochen-3: je 4,7 ml. Danach wurden die Bechergläser mit dem Deckel verschlossen, in den Wärmeschrank bei 37°C platziert und ein Langzeitversuch B (s. 2.4.2) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche umfassen die Herstellung von unterschiedlichen Partikeln aus reinem Kalziumkarbonat, und die weiterführende Behandlung mit Albumin, Dextran und Fibrin. Die Eigenschaften dieser Partikel in Bezug auf ihre Beladungseffizienz mit VM, ihre Freisetzungskinetik von VM und ihre Diffusionskoeffizienten wurden untersucht und verglichen. Abschließend wurden die Albumin- und Fibrinpartikel auf Knochenproben gegeben und die VM-Freisetzungskinetik wurde quantitativ mit der HPLC analysiert.

Es handelt sich um exemplarische Ergebnisse, die dreifach wiederholt wurden und im Anschluss graphisch dargestellt vorliegen.

3.1 Größenverteilung der Partikel

CaCO₃-Partikel wurden, wie in 2.1 genannt, hergestellt. Da die Größe der Partikel von Rührgeschwindigkeit und Rührdauer abhängig ist, wurden mit drei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten R1-R3 (4, 7 und 10 Umdrehungen pro Sekunde) und drei verschiedenen Zeitspannen (10 s, 20 s und 40 s) insgesamt 9 unterschiedliche Proben hergestellt und die durchschnittliche Größe im CLSM ausgemessen. Für jede der 9 Proben wurden aus 3 verschiedenen Ansätzen insg. je 10 Partikel ausgemessen, so dass n = 30 je Probe beträgt.

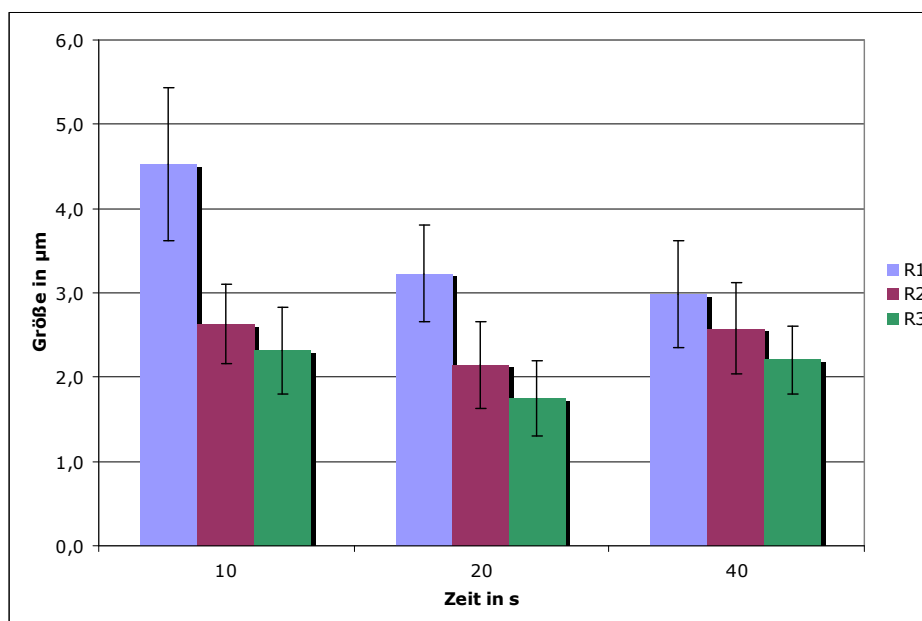


Abb. 3: Partikeldurchmesser (MW und SA n=30) in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit R (1-3) und der Rührdauer von 10s, 20s und 40s. Die Abhängigkeit der Partikelgröße von Rührtempo und Rührdauer wird im Säulendiagramm sichtbar.

Ergebnisse

In Abbildung 4 wird sichtbar, dass das R 1 mit der kürzesten Rührdauer von 10 s die größten Partikel hervorbringt. Zwar besitzen diese auch die größte Standardabweichung (0,9 μm) aber sie sind im Mittel 4,53 μm groß. Insgesamt treten bei Rührdauer R 1 die größten Unterschiede hinsichtlich der Größenverteilung auf.

Im Gegensatz dazu entstehen bei Geschwindigkeit R 3 und einer Rührdauer von 20 s die kleinsten Partikel mit einer Größe im Mittelwert von 1,75 μm .

3.2 Eichkurven Photometrie und HPLC

Die Eichkurven für Vancomycin wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen erstellt (s. 2.2.1.1/2.2.2.1). Sie stellen in Abbildung 1 in Photometrie und HPLC lineare Geraden dar, die im Nullpunkt schneiden. Eine direkte lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration und Absorption von VM war in beiden Fällen sichtbar.

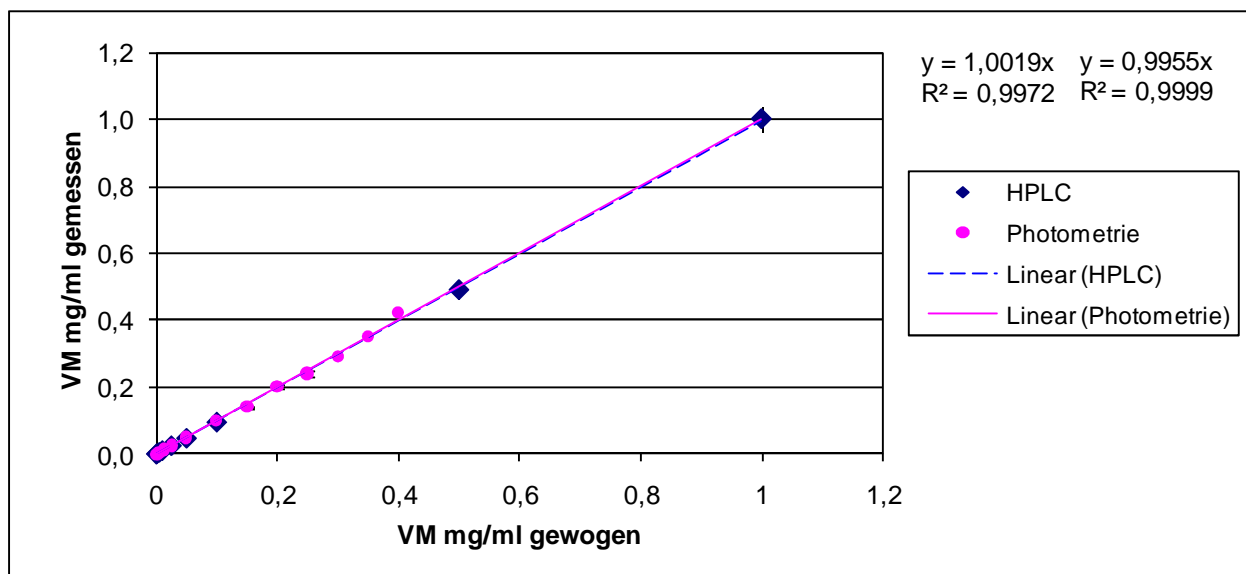


Abb. 4: Darstellung der MW und SA (n=3) der experimentell, mittels HPLC und Photometrie, bestimmten VM-Konzentrationen in Abhängigkeit von der eingewogenen VM-Menge. Die mittels linearer Regression bestimmten Eichkurven liegen im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mg/ml VM. Es ist sichtbar, dass sich in den vorgegebenen Konzentrationen eine lineare Abhängigkeit zwischen gemessenen und gewogenen Werten ergibt. Der relative Fehler war nicht größer als 5%, weshalb er in der Abbildung nicht erkennbar ist.

Der lineare Bereich erstreckt sich bei einer reinen photometrischen Messung nur bis zu einer VM Konzentration von 0,4 mg/ml, während sich der lineare Bereich mittels HPLC-Bestimmung bis zu 1 mg/ml VM erstreckte. Der relative Fehler war nicht größer als 5%.

Ergebnisse

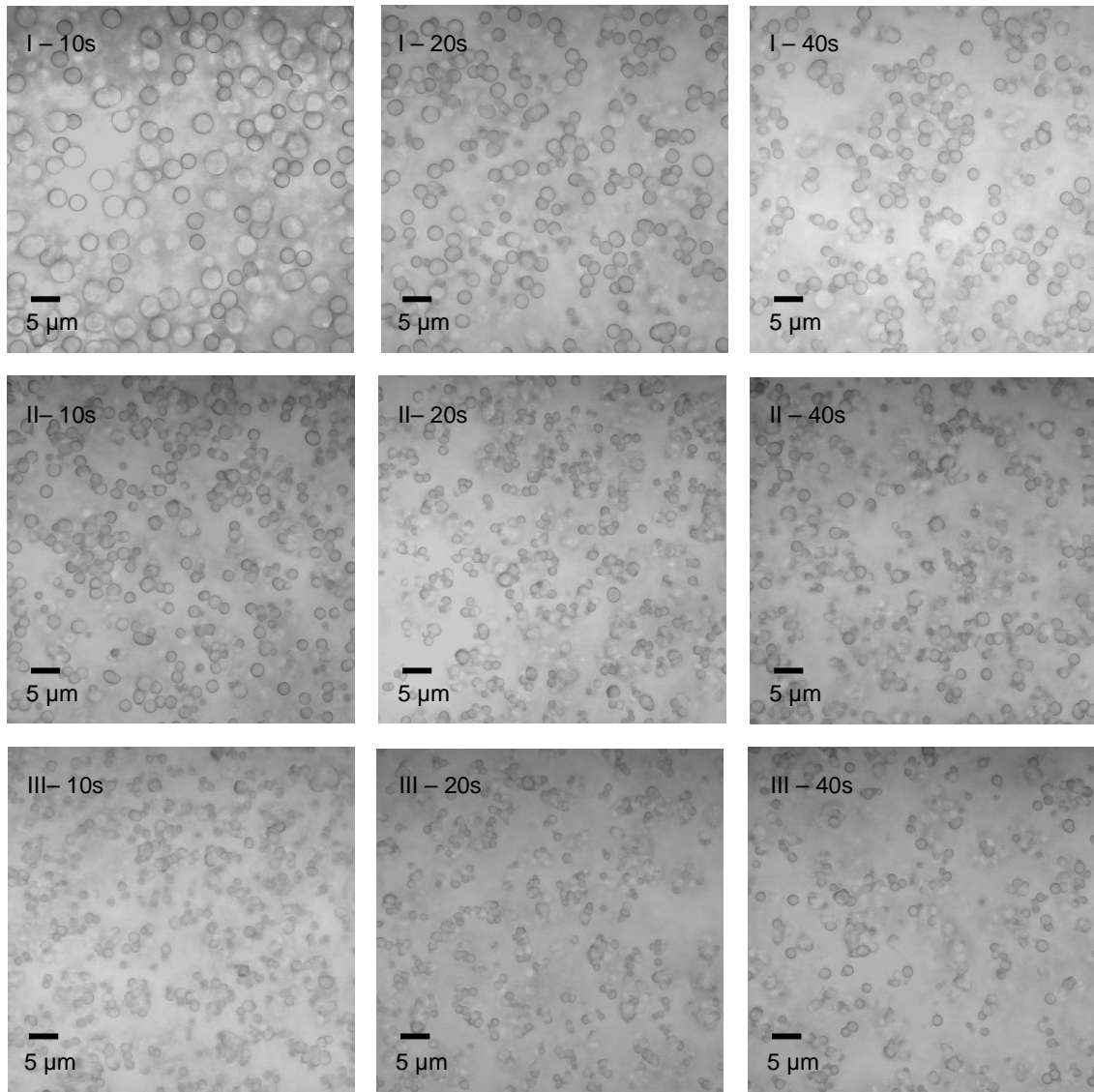


Abb. 5: CLSM Bilder zur Übersicht der Größenverteilung der CaCO_3 -Partikel, in 9 verschiedenen Partikelansätzen mit Geschwindigkeit R I - R III und der Dauer von 10s, 20s und 40s. Anhand der Bilder wird ersichtlich, dass in Probe I-10s, d.h. Rührgeschwindigkeit R I für 10s, die größten Mikropartikel entstehen. Bereits die Verlängerung der Rührdauer auf 20s oder 40s bei gleich bleibendem Tempo hat eine ausgeprägte Veränderung der Partikelmorphologie zufolge.

Die zum Säulendiagramm in Abb.4 gehörigen Aufnahmen im CLSM sind in Abbildung 5 dargestellt. Hier wird verdeutlicht, dass die größten und homogensten Partikel mit Rührgeschwindigkeit R I für 10 s entstehen.

3.3 Waschschritte

3.3.1 VM-Verlust in Waschschritten W1-W3 bei VM-CaCO₃-bP-Partikeln

Die Partikel wurden dreimal mit jeweils 50ml PBS pH = 7,4 gewaschen. Der prozentuale Verlust an VM während der Waschschritte W1 – W3 wurde exemplarisch für die VM-CaCO₃-bP-Partikel berechnet. Die MW der % Verluste der Waschvorgänge W1-W3 von CaCO₃-bP-Partikeln wurden in Abbildung 6 aufgetragen.

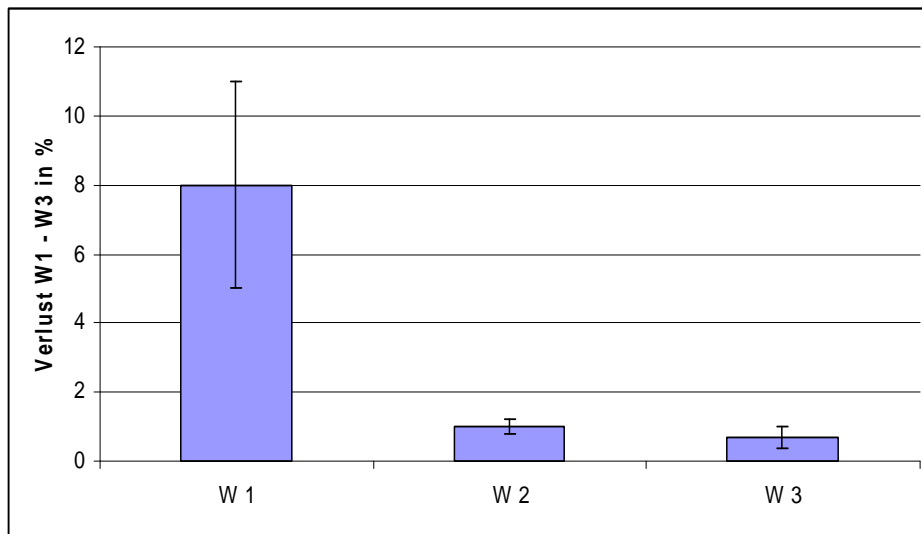


Abb. 6: MW und SA (n=3) der VM-Verluste bei den Waschschritten W1-W3 der VM-CaCO₃-bP-Partikel (bei Präzipitation). In W1 geht der Großteil an VM verloren und bei W3 weniger als 1%.

Direkt nach der Synthese der Partikel wird die Konzentration des VM in der Lösung, die die Partikel umgibt als „Ü1“ bestimmt. In der Annahme, dass diese Konzentration der Konzentration im Kern der Partikel entspricht, wird sie 100% gleichgesetzt. Demnach entweichen während des ersten Waschvorgangs 8%, während W2 0,985% und während W3 0,69% des an die Partikel gebundenen VM. Insgesamt sind dies im Durchschnitt 10% des in und an den Partikeln haftenden VM, die während des Waschens verloren gehen.

3.3.2 Übersicht des VM-Verlusts bei W1-W3 aller Partikel

Gewaschen wurde bei allen Partikeln, abgesehen von den VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-PV-Partikeln, mit 50 ml PBS. Bei den VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-PV-Partikeln wurde nur mit 15 ml PBS gewaschen, da mit kleineren Falconröhrchen gearbeitet wurde, weshalb diese im vergleichenden Graphen 7 nicht dargestellt werden.

Ergebnisse

Einen Überblick über den gesamten Verlust der drei addierten Waschschrte für die einzelnen Partikelsorten stellt Abbildung 7 dar. Die verschiedenen Partikelsorten verlieren unterschiedlich viel VM während der Waschvorgänge. Am wenigsten verlieren die VM-CaCO₃-bP-Partikel mit 9,62%, die VM-CaCO₃-HSA 1-Partikel mit durchschnittlich 10,5% und die VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel mit 11,35%. Am meisten verlieren die VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel mit 40,45%.

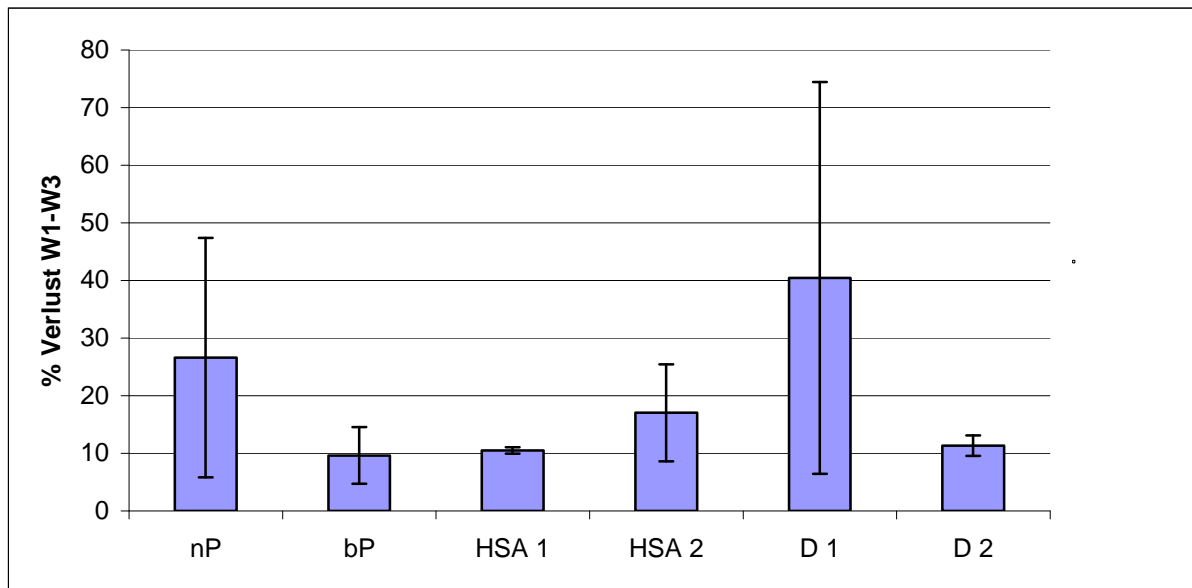


Abb. 7: Säulendiagramm des MW und der SA (n=3) der VM-Verluste bei Waschschrten W1-W3 der folgenden VM-CaCO₃-Partikel: nP, bP, HSA 1, HSA 2, Dextran 1 und Dextran 2. Es wird ersichtlich, dass die D 1- und nP-Partikel am meisten VM während der Waschschrte verlieren.

(nP = Zugabe von VM zu den CaCO₃-Partikeln nach Präzipitation des CaCO₃; bei allen übrigen Partikeltypen war das VM bereits bei der Präzipitation (VM-CaCO₃-bP) des CaCO₃ enthalten. Bei den folgenden Partikeln erfolgte zusätzlich eine Zugabe von den Molekülen HSA, Dextran oder Fibrin zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Rahmen der VM-CaCO₃-Synthese: HSA 1= Zugabe HSA nach Präzipitation, HSA 2= Zugabe HSA bei Präzipitation, D 1= Zugabe Dextran nach Präzipitation, D 2= Zugabe Dextran bei Präzipitation).

3.4 VM-Konzentration in VM-CaCO₃-Partikeln nP versus bP

Zwei Subtypen an VM-CaCO₃-Partikeln wurden hergestellt und im Anschluss an die Waschvorgänge sofort in HCl aufgelöst, um die darin enthaltene VM-Konzentration zu bestimmen. Partikel, die nach der Präzipitation (nP) und bei der Präzipitation (bP) mit identischen Konzentrationen an VM inkubiert wurden, wurden verglichen. Es handelt

Ergebnisse

sich hierbei um die absoluten Konzentrationen, mit MW und SA, die gemessen wurden.

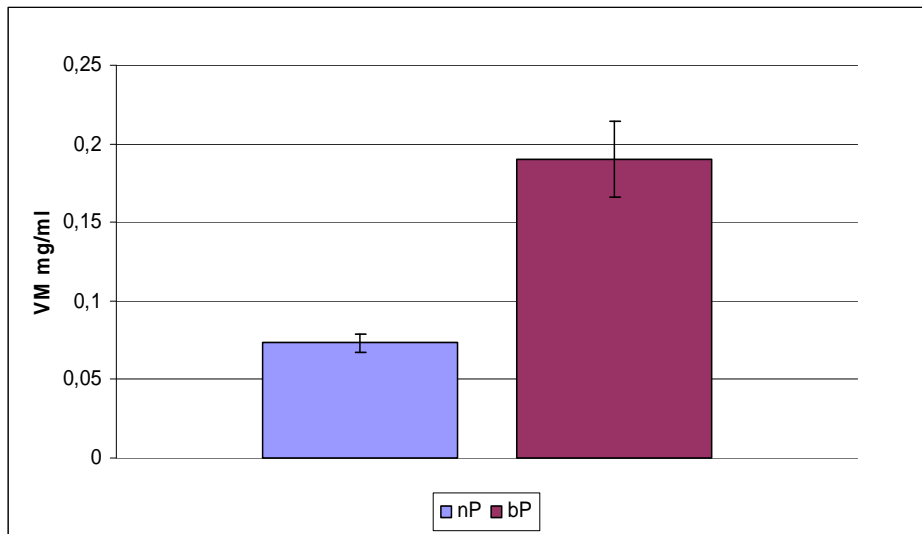


Abb. 8: VM-Konzentrationen (MW und SA $n = 3$) in mg/ml der VM- CaCO_3 -Partikel nP (nach Präzipitation), bP (bei Präzipitation) nach Lyse des CaCO_3 in HCl. Die bP-Partikel enthalten ein Vielfaches an VM.

Anhand der Graphik in Abbildung 8 wird deutlich, dass die VM- CaCO_3 -Partikel, die sich ausschließlich in der Inkubationsart des VM voneinander unterscheiden, deutlich unterschiedliche Mengen an VM enthalten.

Die Partikel wurden direkt nach der Herstellung und den Waschschrinen aufgelöst und die sich darin befindende VM-Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Partikel, bei denen das VM bereits bei der Präzipitation der Kristalle zugegeben wurde, enthalten mehr als das doppelte an VM (MW bP 0,19 mg/ml im Gegensatz zu MW nP 0,073 mg/ml). Wie in Abbildung 9 sichtbar ist, können die VM- CaCO_3 -Partikel mit HCl- und EDTA-Lösung lysiert werden.

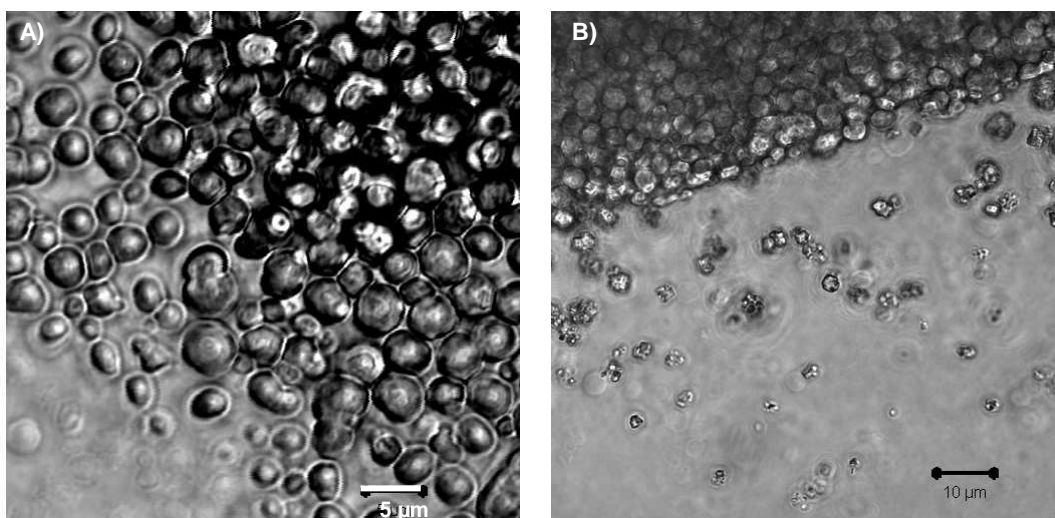


Abb. 9: CLSM Bilder der VM- CaCO_3 -Partikel nach Zugabe von A) HCl und B) EDTA. Es ist sichtbar, dass die Partikel lysiert werden.

3.5 Beladungseffizienz

Die VM-Konzentration in den MP wurde unmittelbar nach den Waschvorgängen und Auflösung der MPs bestimmt.

Anhand der gemessenen VM-Konzentration im Sediment und der eingesetzten VM-Konzentration bei der Partikelherstellung, konnte die Beladungseffizienz mit der unten genannten Formel errechnet werden.

$$BE = (\text{mg/ml VM in den Partikeln} / \text{mg/ml VM eingesetzt}) \times 100\%$$

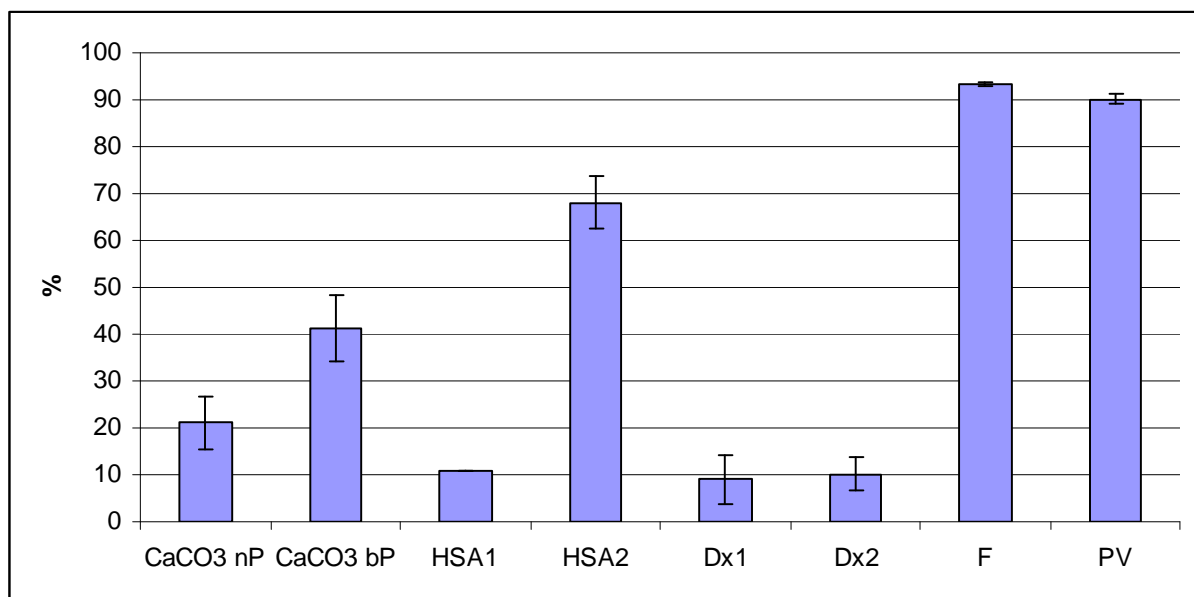


Abb. 10: Darstellung der MW und SA (n=3) der Beladungseffizienzen der verschiedenen VM-CaCO₃-Partikeltypen in Prozent. Je höher die Prozentzahl liegt, desto größer ist die Beladungseffizienz. Das heißt, der Anteil des eingesetzten VM, der letztendlich in den Partikeln vorliegt ist größer und weniger VM geht bei der Herstellung verloren. Es wird ersichtlich, dass die höchste Beladungseffizienz von den F-, PV- und HSA 2-Partikeln erreicht wird. Die Prozentzahlen der HSA 1-, Dx 1- und Dx 2-Partikel besitzen im Gegensatz dazu mit ca. 10% die kleinsten Werte.

(nP = Zugabe von VM zu den CaCO₃-Partikeln nach Präzipitation des CaCO₃; bei allen übrigen Partikeltypen war das VM bereits bei der Präzipitation (CaCO₃-bP) des CaCO₃ enthalten. Bei den folgenden Partikeln erfolgte zusätzlich eine Zugabe von den Molekülen HSA, Dextran oder Fibrin zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Rahmen der VM-CaCO₃-Synthese: HSA 1 = Zugabe HSA nach Präzipitation, HSA 2 = Zugabe HSA bei Präzipitation, D 1 = Zugabe Dextran nach Präzipitation, D 2= Zugabe Dextran bei Präzipitation, F = Fibrin Zugabe bei Präzipitation, Vernetzung durch Thrombin im Anschluss an Synthese, PV = Herstellung wie F-Partikel, mit Zugabe von den Enzymen Plasminogen und Al-teplase in den Überstand)

Ergebnisse

Das Säulendiagramm in Abbildung 10 zeigt, dass die Beladungseffizienz für die VM-CaCO₃-Fibrinpartikel mit 93% der eingesetzten VM-Konzentration am höchsten war. Die VM-CaCO₃-PV-Partikel lagen mit 90% nur geringfügig unter der Effizienz der VM-CaCO₃-Fibrinpartikel. Mit deutlichem Abstand (68%) folgten dann die VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel.

Die VM-CaCO₃-Partikel ohne Polymere besitzen, je nachdem ob das VM bereits bei der Präzipitation hinzugegeben wurde oder eine Nachinkubation stattfand, unterschiedliche Effizienzen in der Beladung: 41% bei der Präzipitation (bP) im Gegensatz zu 21% nach der Präzipitation (nP).

Die niedrigsten Werte ergeben die Beladungen der VM-CaCO₃-HSA 1-, VM-CaCO₃-Dextran 1- und VM-CaCO₃-Dextran 2- Partikel. Ihre Beladungseffizienzen liegen mit 11% (HSA 1), 9% (Dextran 1) und 10% (Dextran 2) unterhalb von den Werten der VM-CaCO₃-Partikel ohne Biopolymere.

3.6 Langzeitversuche

3.6.1 VM-CaCO₃-Partikel nP versus bP

Wie unter 2.3.1 und 2.3.2 erläutert, wurde ein Langzeitversuch mit den CaCO₃-Kristallen mit VM-Inkubation nach und bei der Präzipitation durchgeführt. Dabei wurden die zwei unterschiedlichen VM-CaCO₃-Partikel, nach Präzipitation (nP) und bei Präzipitation (bP), über 24 Stunden beobachtet und bei jeder Probenentnahme die VM-Konzentration im Überstand bestimmt.

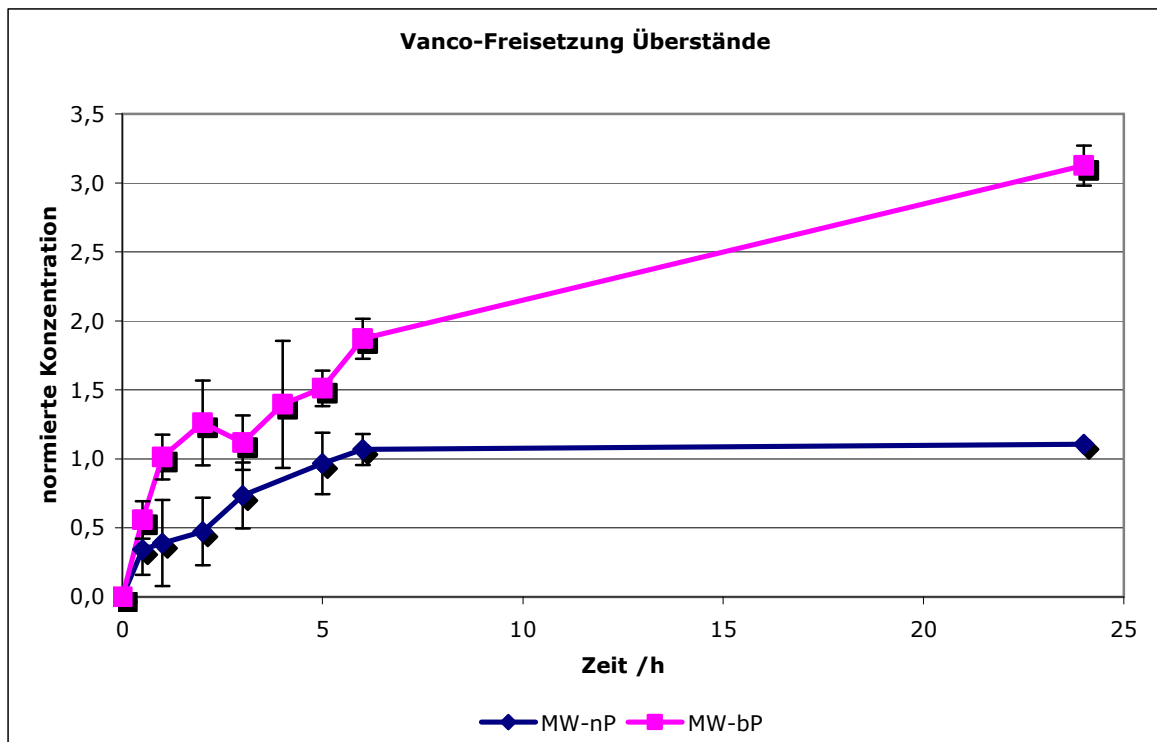


Abb. 11: VM-Konzentrationen im Überstand der Partikelsuspension der VM-CaCO₃-nP- und VM-CaCO₃-bP-Partikel, MW und SA (n=3). (nP = Zugabe VM nach Präzipitation des CaCO₃, bP = Zugabe VM bei Präzipitation des CaCO₃) im Verlauf von 24h. Die Werte sind auf Ausgangskonzentration normiert. Anhand des Graphen wird deutlich, dass die VM-CaCO₃-bP-Partikel mehr VM enthalten und dieses über einen längeren Zeitraum abgeben als die VM-CaCO₃-nP-Partikel.

Die Werte wurden jeweils zum Zeitpunkt (x h) auf die Ausgangskonzentration, welche zum Zeitpunkt 0 h gemessen wurde, mit der unten genannten Formel normiert. So dass es sich hier um prozentuale Mengen an VM handelt, die freigesetzt wurden.

Formel Normierung der Ausgangskonzentration:

Wert normierte Probe (x h) = [VM Konzentration Probe (x h) / VM Konzentration Probe (0h)] - 1

Im dargestellten Graphen (Abb.11) wird erkennbar, dass die VM-CaCO₃-nP-Partikel erwartungsgemäß weniger VM enthalten und daher einer herabgesetzten Diffusion unterliegen. Typ bP-Partikel, die das VM bereits bei der Herstellung erhalten, geben mehr VM ab und führen dadurch zu einer höherer VM-Konzentration im Überstand. Dabei handelt es sich insgesamt um die dreifache Menge der auf den Ausgangswert normierten Konzentration: 3,13 bei bP zum Zeitpunkt 24h im Vergleich zu 1,11 bei nP-Partikeln, die erst nach der Präzipitation mit VM inkubiert wurden zum selben Zeitpunkt. Zusätzlich zu der größeren Menge an freigesetztem VM, geben diese Partikel auch bis 24h weiter VM ab. Die Partikel der Inkubation Typ A geben nur bis zu 6h lang VM ab, in den folgenden Stunden bleibt die Konzentration in der umgebenden Lösung konstant. Das heißt, dass bei letzteren Partikeln bereits ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationsgradienten innerhalb und außerhalb der Partikel eingetreten ist, weshalb die Diffusion zum Erliegen kommt. Hinsichtlich des Graphen wird deutlich, dass die Partikel das VM über die Zeit hinweg wieder abgeben. Zusätzlich wird die unterschiedliche Beladungseffizienz in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Beladung bei der Herstellung der Partikel bestätigt.

3.6.2 VM-CaCO₃-HSA 1-Partikel

Als Oberflächenmodifikation der Partikel wurden diese nach der Herstellung für eine Stunde in eine HSA-Lösung gegeben (wie unter 2.3.4.1 beschrieben). Diese VM-CaCO₃-HSA 1-Partikel wurden im Vergleich zu VM-CaCO₃-Partikeln ohne Polymere in Langzeitversuchen untersucht und die VM-Konzentrationen in den Überständen bestimmt.

Ergebnisse

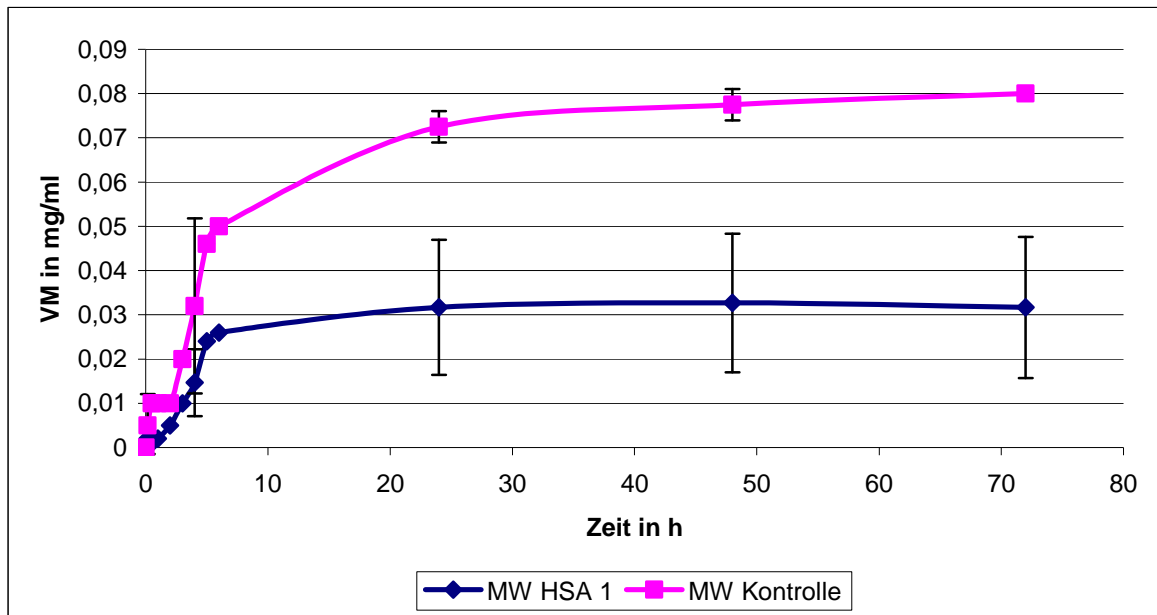


Abb. 12: MW und SA (n=3) der freigesetzten VM-Konzentration in mg/ml in den Überständen aus VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln (Inkubation der VM-CaCO₃-Partikel mit HSA erfolgte nach der Präzipitation) und VM-CaCO₃-Kontrollpartikeln (VM-CaCO₃-Partikel ohne HSA) im zeitlichen Verlauf über 72h. Es ist erkennbar, dass die Kontrollpartikel ohne HSA deutlich mehr VM abgeben, als die mit HSA nachträglich inkubierten Partikel.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte für beide Partikelarten eine rasche Freisetzung in den ersten Stunden beobachtet werden, die anschließend bei beiden Proben in einen gesättigten Verlauf überging. Nach 5h ist der Großteil an VM bereits aus den Partikeln herausdiffundiert. Die VM-CaCO₃-HSA 1-Partikelprobe enthielt, trotz identischer Behandlung beider Proben, nur halb so viel VM wie die Probe ohne HSA, insgesamt nach 72h 0,08 mg/ml im Gegensatz zu 0,04 mg/ml im Überstand. Dieser Konzentrationsunterschied innerhalb der Partikel zu Beginn des Versuches führt zu einer langsameren Diffusion aus den VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln. Die Ausgangskonzentration zu Beginn des Versuches lag bei den VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln bei 0,1 mg/ml und bei den VM-CaCO₃-bP-Partikeln bei 0,16 mg/ml.

3.6.3 VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel

VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel wurden mit 200 mg HSA hergestellt, indem dieses bereits vor der Präzipitation zu dem Na₂CO₃ hinzugefügt wurde (s. 2.3.4.2). Anschließend wurde in einem Langzeitversuch die zeitabhängige VM-Freisetzung in mg/ml ermit-

Ergebnisse

telt. In Abbildung 13 wird dieser Konzentrationsanstieg im Vergleich zu VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln dargestellt.

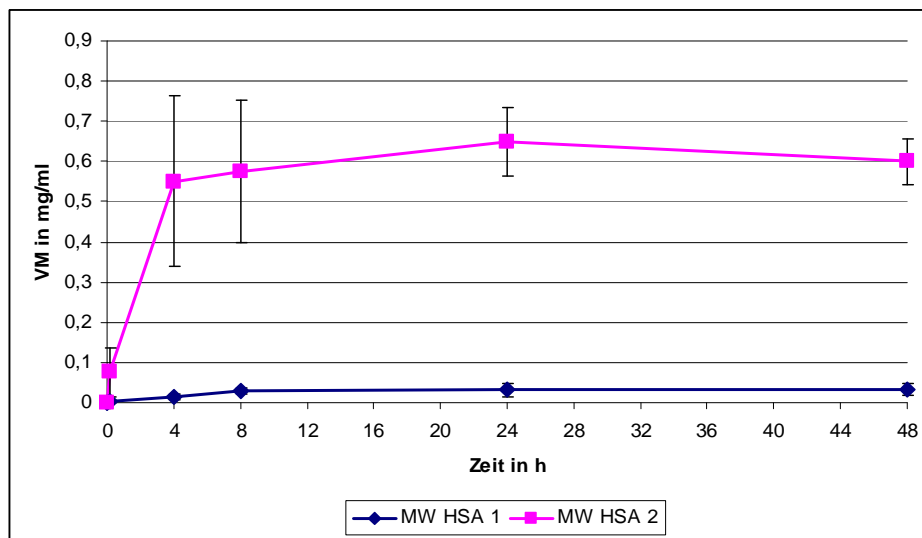


Abb. 13: VM-Konzentrationen (MW und SA n=3) in mg/ml der Überstände der VM-CaCO₃-HSA 1- und der VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel über 48h. Die HSA 2-Partikel geben das 10fache an VM ab. (HSA 1= Zugabe HSA nach Präzipitation, HSA 2= Zugabe HSA bei Präzipitation)

Es ist in Abb. 13 deutlich erkennbar, dass die mit Albumin umhüllten Partikel VM-CaCO₃-HSA 2, das 10fache an VM im Vergleich zu den VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln an den Überstand abgeben. Insgesamt 0,65 mg/ml (nach 24h) im Gegensatz zu 0,03 mg/ml (nach 24h). Aufgrund der niedrigeren Konzentration an VM in den VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln ist auch der Diffusionsgradient aus diesen MP heraus geringer.

In der VM-CaCO₃-HSA 2-Probe sind nach 8h 90% der Maximalkonzentration von VM im Überstand erreicht und nach 24h beginnen die VM Konzentrationen im Überstand der VM-CaCO₃-HSA 2-Proben zu sinken, um 9,8% von 24h auf 48h.

3.6.4 VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel

VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel wurden nach der Herstellung für eine Stunde in eine Lösung mit Dextran 70 kD oder Dextran 464 kD gegeben und anschließend für 2 Stunden mit Divinylsulfon vernetzt (s. 2.3.5.1). Die Freisetzung des VM in den Überstand wurde in Langzeitversuchen für 44h beobachtet.

Anhand des Graphen in Abb.14 wird ersichtlich, dass die Partikel, welche mit dem kleineren 70 kD Dextran behandelt wurden, zu höheren VM-Konzentrationen im

Ergebnisse

Überstand führen als die Partikel mit dem 464 kD Dextran. Nach 20h sind bereits 84% des 44h Wertes der 70 kD Probe und 85,7% der 464 kD Partikel in den Überstand übergetreten. Da jeweils mit 12,5 mg/ml VM inkubiert wurde, wird deutlich, dass es sich hier insgesamt um sehr niedrige Konzentrationen an VM im Überstand handelt, dies bestätigt die Ergebnisse der Beladungseffizienz der VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel.

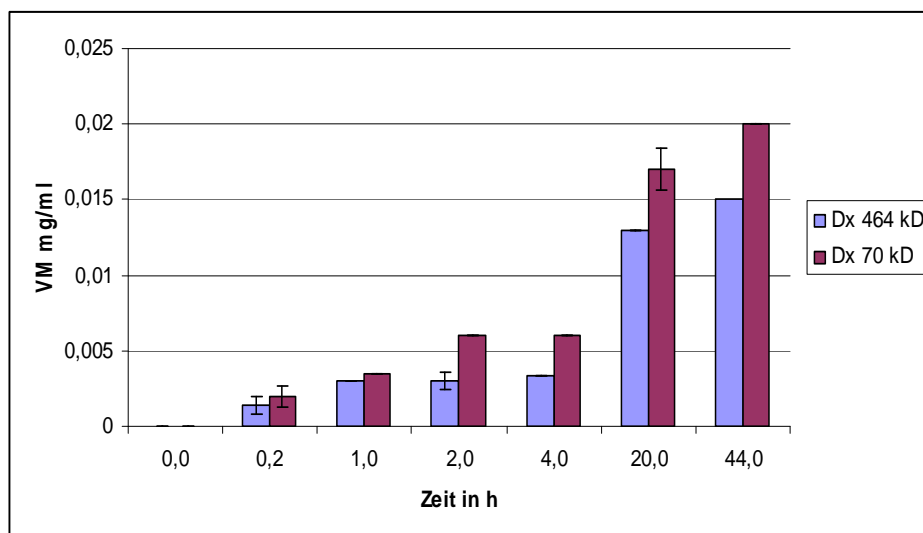


Abb. 14: VM-Konzentrationen (MW und SA n=3) in mg/ml der Überstände der VM-CaCO₃-Dx-Partikel Typ 1 (Zugabe Dextran bei der Präzipitation) mit 70kD oder 464 kD Dextran, von 0 - 44h. Die 70kD-Dextran 1-Partikel enthalten eine höhere Konzentration an VM.

3.6.5 VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel

Es wurden zwei unterschiedliche Arten an VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikeln hergestellt (s. 2.3.4.4). Ein Teil der Probe wurde mit VM in einer 12,5 mg/ml VM-Lösung für eine Stunde nachträglich inkubiert, der andere Teil der Probe wurde nicht weiter behandelt. Im Langzeitversuch wurden die VM-Konzentrationen beider Proben im Überstand untersucht. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde ausschließlich mit dem kleineren Dextran von 70 kD gearbeitet. In beiden Fällen wurde das Dextran bereits bei der Präzipitation der Kristalle hinzugefügt und anschließend vernetzt.

Ergebnisse

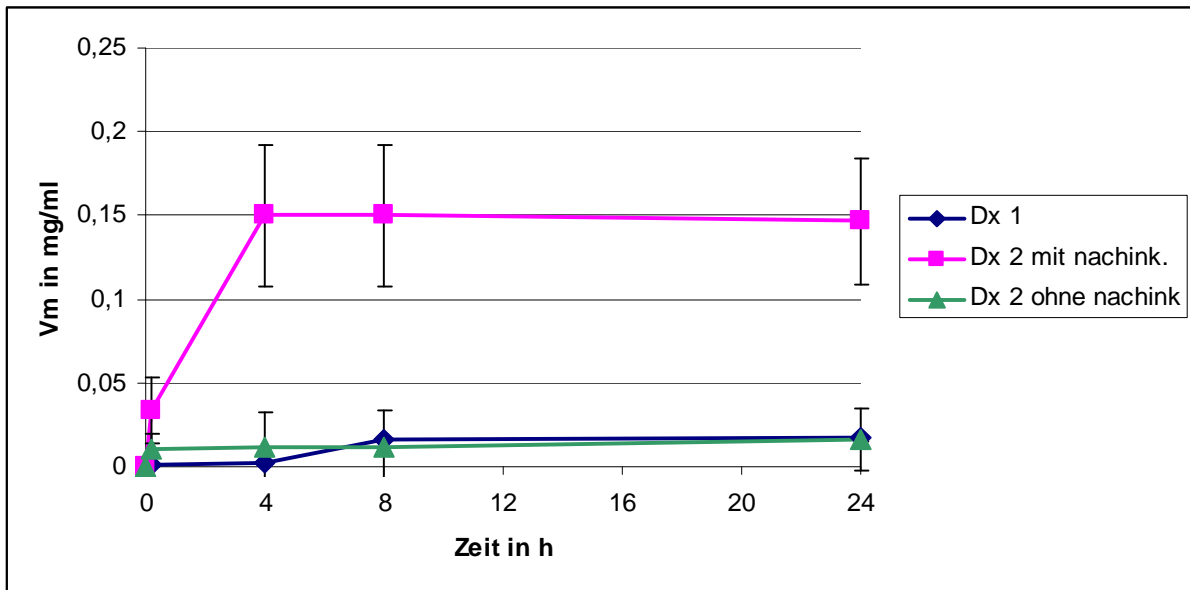


Abb. 15: Vergleich der VM-Konzentrationen in mg/ml der Überstände der VM-CaCO₃-Dx 1-Partikel (Zugabe Dextran nach Präzipitation) und VM-CaCO₃-Dx 2-Partikel (Zugabe Dextran bei Präzipitation) mit und ohne weitere Nachinkubation mit VM nach Fertigstellung der Partikel über 24h, MW und SA (n=3). Der Graph zeigt, dass die Konzentration der Dx 1- und Dx 2-Partikel sich nicht wesentlich unterscheidet, die Dx 2-Partikel mit Nachinkubation jedoch das 10fache an VM freisetzen. Nach 4h hat sich ein Gleichgewicht zwischen der VM-Konzentration in den Partikeln und im Überstand eingestellt.

Die Dextranpartikel, die im Anschluss an die Vernetzung noch einmal mit einer VM-Lösung (12,5 mg/ml) inkubiert wurden, zeigen in Abb. 15 eine deutlich erhöhte VM-Konzentration im Überstand, im Gegensatz zu den Partikeln, die nicht weiter inkubiert wurden. Insgesamt differieren die Werte um eine 10er Potenz: 0,014 mg/ml im Vergleich zu 0,148 mg/ml nach 15h.

Im Vergleich zu den VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikeln liegen in Abbildung 15 auch die Überstände der VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel vor. Es ist erkennbar, dass die Konzentrationen in den Überständen der Typ 1 und Typ 2 VM-CaCO₃-Dextranpartikel sich nicht signifikant unterscheiden, sondern lediglich die Nachinkubation mit VM eine deutliche Differenz hervorbringt. Nach 4h ist der Release bereits abgelaufen und ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen innerhalb der Partikel und außerhalb im Überstand eingetreten. Aufgrund des Gleichgewichts tritt keine weitere Konzentrationssteigerung ein, obwohl die Partikel noch VM enthalten.

3.6.6 Vergleich der VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel mit den VM-CaCO₃-HSA 2-Partikeln

Die Ergebnisse der Versuche der VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel (2.3.4.2) und der VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel 2 (2.3.5.2) wurden zusammengefasst in einem Graphen aufgetragen.

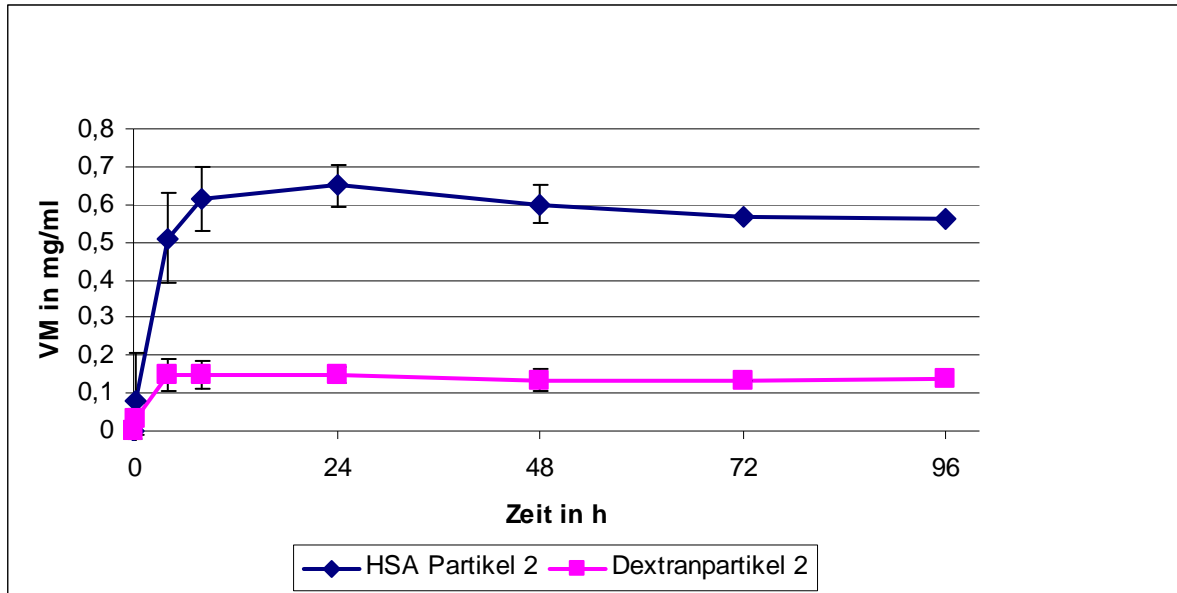


Abb. 16: Graphischer Vergleich der VM-Konzentrationen in mg/ml der Überstände der VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel (Zugabe HSA bei der Präzipitation) und VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel (Zugabe des Dextrans 70kD bei der Präzipitation) von 0 - 96h, MW und SA (n=3).

Zu sehen ist, dass die gemessenen Werte der HSA 2-Partikel deutlich über den Werten der Dextran 2-Partikel liegen. Im Verlauf der Zeit nimmt die Konzentration des VM in beiden Proben dezent ab.

Die Graphik in Abbildung 16 zeigt deutlich, dass die vernetzten VM-CaCO₃-Dextranpartikel weniger VM enthalten als die unvernetzten VM-CaCO₃-HSA-Partikel. Genau genommen beläuft sich dieser Unterschied nach 24h auf 0,65 mg/ml zu 0,15 mg/ml, das heißt, dass die Dextranpartikel nur 23% der VM-Menge der HSA-Partikel in den Überstand freisetzen, obwohl sie mit der gleichen Ausgangskonzentration an VM hergestellt wurden.

Dies bestätigt die Ergebnisse der Beladungseffizienzen. Die freigesetzten Konzentrationen und das Tempo der Diffusion sind proportional abhängig zu der Beladungseffizienz.

3.6.7 VM-CaCO₃-Fibrinpartikel

VM-CaCO₃-Fibrinpartikel wurden angesetzt (s. 2.3.6.1), indem die in Plasma synthetisierten Partikel mit Thrombin vermengt wurden und somit eine Fibrinhülle entstand. Die Freisetzungskinetik des VM wurde, anhand der Konzentrationen in den Überständen, im Langzeitversuch untersucht. Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor entsprechend der Formel (s. 2.4.2) herausgerechnet.

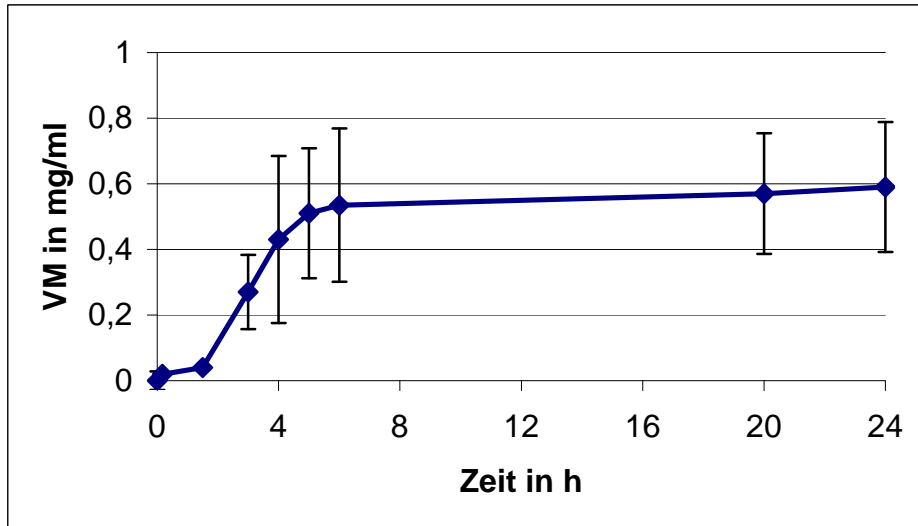


Abb. 17: VM-Konzentration in mg/ml im Überstand der F-Partikel (Zugabe Fibrin bei Präzipitation) in PBS bei 37°C bis 24h, Verdünnungsfaktor herausgerechnet. MW und SA (n=3). In den ersten 8h läuft der Großteil der Freisetzung ab.

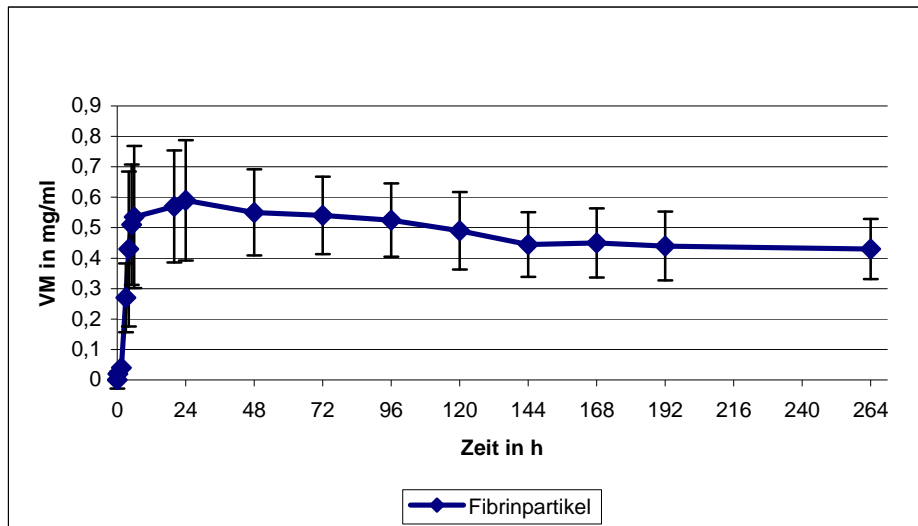


Abb. 18: VM-Konzentration im Überstand der F-Partikel in PBS bei 37°C bis 264h, Verdünnungsfaktor herausgerechnet. MW und SA (n=3), die F-Partikel geben VM ab, nach 24h beginnt die VM-Konzentration zu sinken.

Die mit Fibrin umhüllten Partikel gaben in den ersten 20 h den größten Teil an VM an den Überstand ab, so dass nach 20h ein Gleichgewicht mit einer Konzentration von 0,57 mg/ml erreicht wurde. Die größten Konzentrationssprünge des VM im Überstand

Ergebnisse

finden in den ersten 8 Stunden statt. Nach 24h beginnt die VM-Konzentration zu sinken: im Durchschnitt um 4,83% alle 24h.

Die Umhüllung der VM- CaCO_3 -Partikel mit einer Fibrinschicht (s.2.3.6.1) ist, wie anhand des CLSM-Bildes in Abbildung 19 sichtbar, gelungen:

Besonders deutlich sind die Fibrinhüllen sichtbar, wenn das CaCO_3 mit HCl aufgelöst wurde und ausschließlich die Hüllen übrig bleiben.

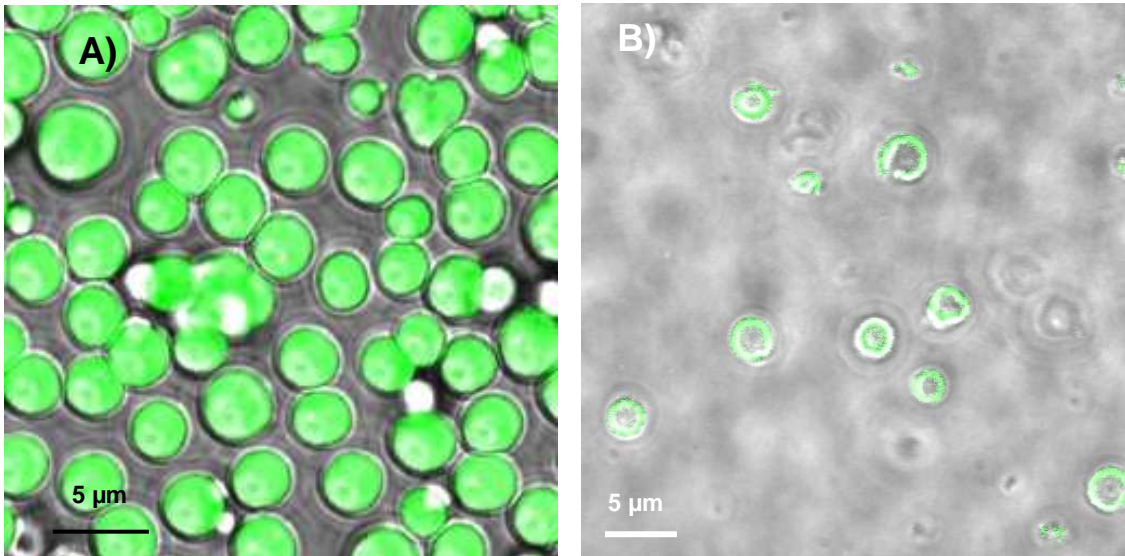


Abb. 19: FITC-BSA markierte VM- CaCO_3 -Fibrinpartikel (Zugabe Fibrin bei der Präzipitation) A) in Wasser B) Fibrinhüllen nach Lyse des Kalziumkarbonats durch HCl. Zu erkennen sind die runden Mikropartikel, die das FITC-BSA aufgenommen haben (A) und die Fibrinhüllen, die noch FITC-BSA aufweisen, nachdem das Kalziumkarbonat durch das HCl gelöst wurde (B).

3.6.8 Fibrinpartikel + Enzyme (VM-CaCO₃-PV-Partikel)

Um eine physiologische Umgebung *in vitro* zu simulieren wurden in den Überstand der Fibrinpartikel die Enzyme Plasminogen und Alteplase in physiologischen Konzentrationen (Plasminogen 0,2 mg/ml, Actilyse 0,005 mg/l) hinzugegeben (s. 2.3.6.2).

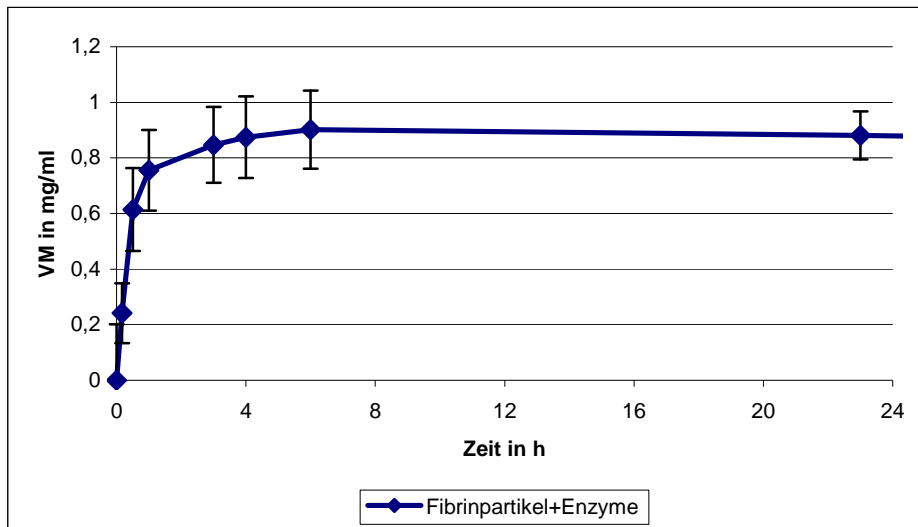


Abb. 20: VM-Konzentration der Überstände der PV-Partikel (VM-CaCO₃-Fibrinpartikel mit Plasminogen und Alteplase im Überstand bei 37°C) in 24h, Verdünnungsfaktors berechnet. MW und SA (n=3).

In 24h Rythmen wurde bis 240h weitergemessen. Die VM-Konzentration im Überstand blieb dabei konstant. In Abbildung 20 wird der MW der VM-Konzentration im Überstand der VM-CaCO₃-PV-Partikel graphisch dargestellt. Der Anstieg verläuft zu Beginn sehr steil und flacht nach 4h ab. Nach 6h ist das Maximum mit einer Konzentration von 0,9 mg/ml erreicht. Die Messungen wurden bis 240h (nicht in Abbildung 20 dargestellt) fortgeführt. Dabei fand keine weitere signifikante Veränderung der Konzentration statt. Nach 240h hatte sich die VM-Konzentration auf 0,857 mg/ml gesenkt, dies entspricht einem Verlust von 4,7% im Vergleich zum 6h Wert.

Zur weiteren Untersuchung der Unterschiede zwischen Fibrinpartikeln und PV-Partikeln wurden AFM (Atomic Force Microscopy)-Bilder angefertigt.

Besonders hervorzuheben ist, dass dabei ein vertikales Profil der getrockneten Partikel abgebildet werden kann. Das vertikale Profil zeigt an, welche Dicke die Fibrinhülle der jeweiligen Partikel besitzt. Dadurch können Informationen über die Auswirkungen der lysierenden Enzyme, die zu den PV-Partikeln gegeben wurden, auf die Dicke der Fibrinhülle gewonnen werden.

In Abbildung 21 sind die AFM-Bilder dargestellt. Die Dicke der Fibrinpartikel-Hülle liegt bei 524,11 nm und der Durchmesser bei 2,56 µm. Im Vergleich besitzen die VM-

Ergebnisse

PV-Partikel eine Dicke von 326,9 nm und einen Durchmesser von 2,328 μm . Das bedeutet, dass die Dicke der Fibrinhülle nach Zugabe der Enzyme um 197,2 nm (37,6%) abgenommen hat.

Zur weiteren Darstellung der lysierenden Wirkung der Enzyme auf die Fibrin-Hülle der PV-Partikel wurde eine Zeitserie mit dem CLSM aufgenommen. Während der Präzipitation der PV-Partikel wurde FITC-BSA hinzugegeben, welches in die CaCO_3 -Partikel und in den Fibrinmantel aufgenommen wurde.

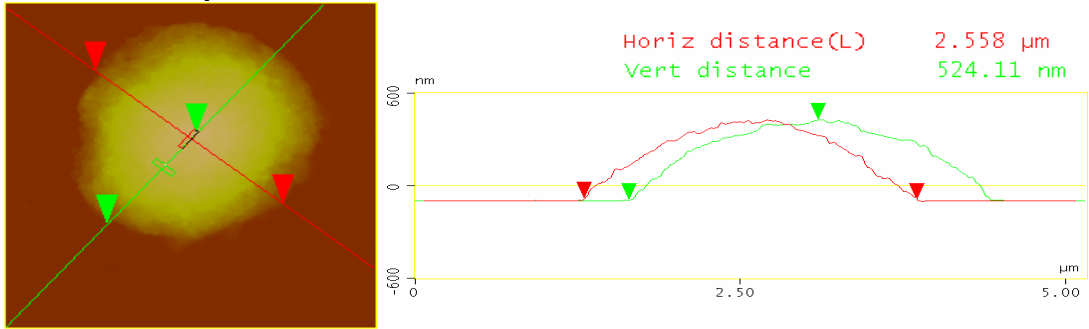
Bei 37°C wurde eine Plasminogen-Alteplase-Lösung auf die Partikel gegeben und in Abständen von 30 Sekunden Bilder angefertigt. Mittels des Mikroskops konnte die Intensität in einem MP entlang des roten Pfeils gemessen werden.

In Abbildung 22 zeigt der Vergleich der sechs Aufnahmen im Zeitverlauf, dass mit zunehmender Zeit die Intensität der FITC-BSA-Markierung des MP abnahm.

Diese Intensitätsabnahme begann im Zentrum des Partikels und wirkte sich mit der Zeit auch auf die Fibrinhülle aus.

Ergebnisse

VM-CaCO₃-Fibrinpartikel



VM-CaCO₃-PV-Partikel (mit lysierendem Enzym bei 37°C)

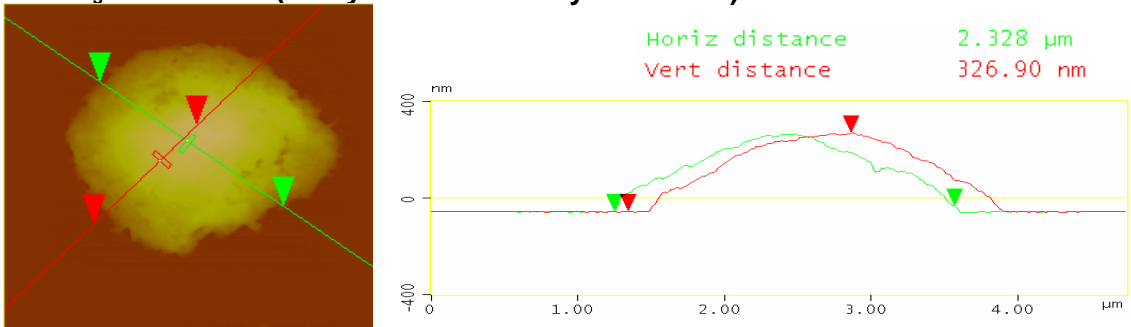
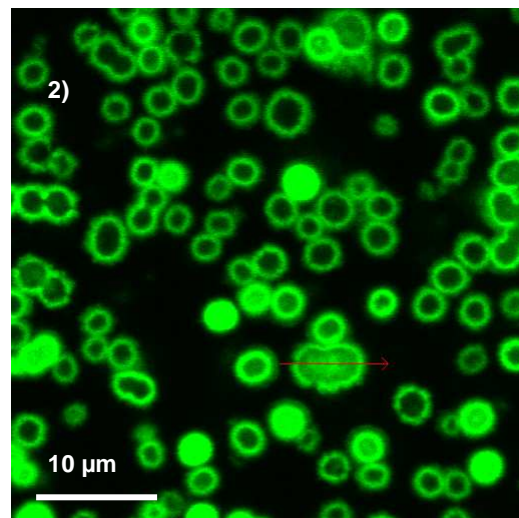
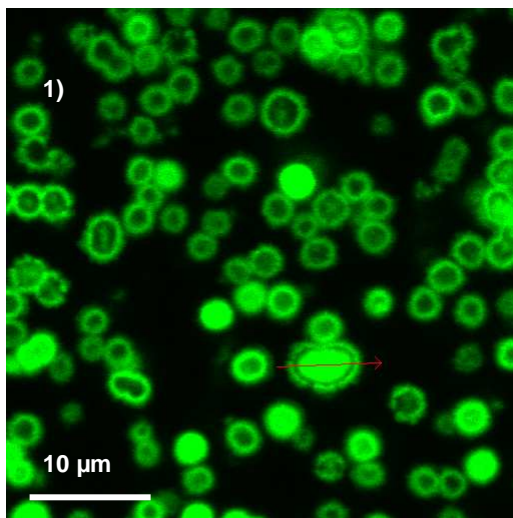


Abb. 21: AFM-Bilder (Atomic Force Microscopy) der Fibrin- und PV-Partikel (mit Alteplase und Plasmin), Ausmessung des vertikalen und horizontalen Durchmessers. Die Fibrinhülle der VM-CaCO₃-Fibrinpartikel ist dicker als die Fibrinhülle der VM-CaCO₃-PV-Partikel.



Ergebnisse

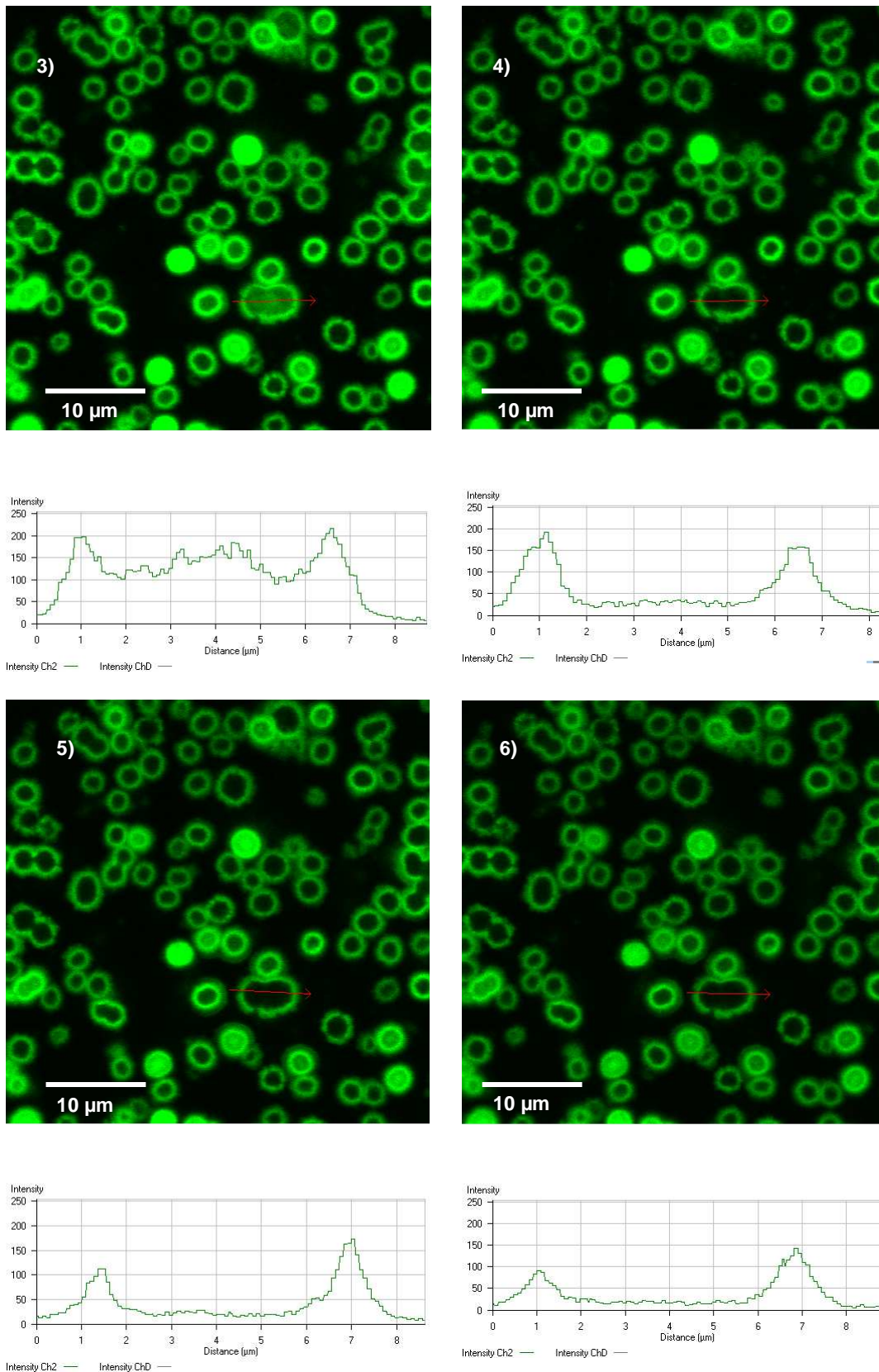


Abb. 22: CLSM Aufnahmen mit FITC-BSA markierten VM-CaCO₃-PV-Partikeln unter zeitgleicher Zugabe der lysierenden Enzyme Plasminogen und Alteplase bei 37°C. Die Bilder 1 - 6 wurden im 30s Takt aufgenommen. Der Fluoreszenzintensitätsverlauf wurde entlang des roten Strichs in einem Beispielpartikel gemessen. Die Abnahme der Intensität über die Zeit wird deutlich.

3.7 Diffusionskoeffizient

Entsprechend 2.5 wurde mit dem EXDIF-Diffusionsprogramm der Diffusionskoeffizient berechnet.

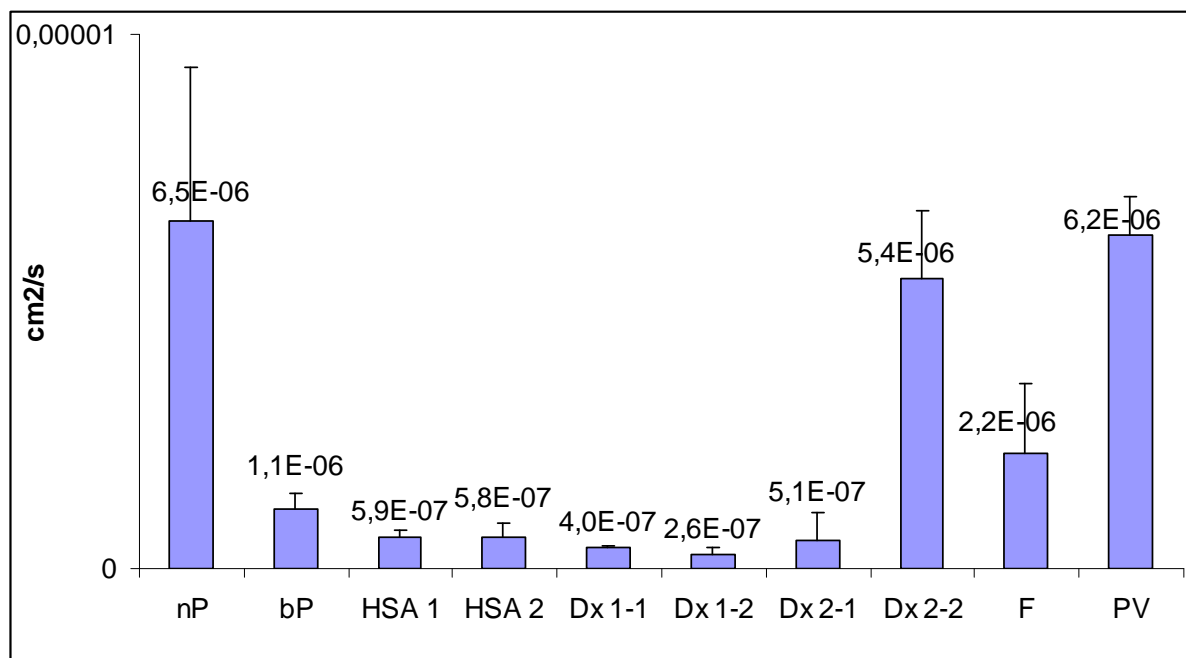


Abb. 23: Diffusionskoeffizienten von VM in cm²/s der verschiedenen Partikelpräparationen mit EXDIF berechnet und MW und SA (n=3). Je kleiner der Diffusionskoeffizient, desto stärker wird die Diffusion des VM aus den Partikeln heraus behindert. Im Säulendiagramm mit den unterschiedlichen Partikelvariationen wird deutlich, dass die HSA 1- und 2-, Dextran 1- und 2- und bP-Partikel die kleinsten Diffusionskoeffizienten besitzen.

(nP = Zugabe von VM zu den CaCO₃-Partikeln nach Präzipitation des CaCO₃; bei allen übrigen Partikeltypen war das VM bereits bei der Präzipitation (CaCO₃-bP) des CaCO₃ enthalten. Bei den folgenden Partikeln erfolgte zusätzlich eine Zugabe von den Molekülen HSA, Dextran oder Fibrin zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Rahmen der VM-CaCO₃-Synthese: HSA 1 = Zugabe HSA nach Präzipitation, HSA 2 = Zugabe HSA bei Präzipitation, D 1 = Zugabe Dextran nach Präzipitation, D 2 = Zugabe Dextran bei Präzipitation, F = Fibrin Zugabe bei Präzipitation, Vernetzung durch Thrombin im Anschluss an Synthese, PV = Herstellung wie F-Partikel, mit Zugabe der Enzyme Plasminogen und Alteplase in den Überstand).

Die im Säulendiagramm aufgetragenen Diffusionskoeffizienten liegen alle im Bereich von $2,5 \times 10^{-5}$ cm²/s und $5,9 \times 10^{-7}$ cm²/s. Ein kleiner Diffusionskoeffizient bedeutet, dass die Partikelhülle die VM-Diffusion stärker behindert als bei einem größeren Wert des Diffusionskoeffizienten. Dieser Wert ist konzentrationsunabhängig. Alle Langzeit-

Ergebnisse

versuche der Partikel erfolgten bei Raumtemperatur, abgesehen von den VM-CaCO₃-F-Partikeln und VM-CaCO₃-PV-Partikeln, die in den Wärmeschrank bei 37°C gelegt wurden. Im Vergleich der unbehandelten VM-CaCO₃-nP- und den VM-CaCO₃-bP-Partikeln untereinander wird der Unterschied des Diffusionskoeffizienten deutlich sichtbar.

Wie bereits bei den Langzeitversuchen, ist auch der Diffusionskoeffizient für die VM-CaCO₃-bP-Partikel im Rahmen einer verzögerten VM-Freisetzung besser, da er kleiner ist.

Die Koeffizienten der Partikel HSA 1 ($5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) und HSA 2 ($5,75 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) unterscheiden sich kaum, liegen jedoch deutlich unterhalb der VM-CaCO₃-Partikel ohne Polymere. Bei den Dextranpartikeln ist auffällig, dass die Diffusionskoeffizienten der kleineren Dextrane niedriger liegen und dass eine Nachinkubation mit Dextran und VM, wie bei den Dextran 2-2-Partikeln, den Diffusionskoeffizienten erhöht. Die Fibrinpartikel besitzen bei Raumtemperatur einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten ($1,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) als die Fibrinpartikel bei 37°C ($2,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Die Diffusion des VM aus den Fibrinpartikeln wird durch Zugabe von lysierenden Enzymen (PV-Partikel) weiter beschleunigt ($D = 6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) und nach Zugabe von Enzymen steigt dieser weiter an.

Im Vergleich zu dem Diffusionskoeffizienten von VM bei Raumtemperatur (RT) ($3,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), wird ersichtlich, dass alle Partikelsorten, außer den VM-CaCO₃-nP-, VM-CaCO₃-Dextran 2- und den VM-CaCO₃-PV-Partikeln, einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten besitzen. Das bedeutet, dass diese Partikel die freie Bewegung der VM-Moleküle hemmen und die Einstellung eines Diffusionsgleichgewichts verzögern.

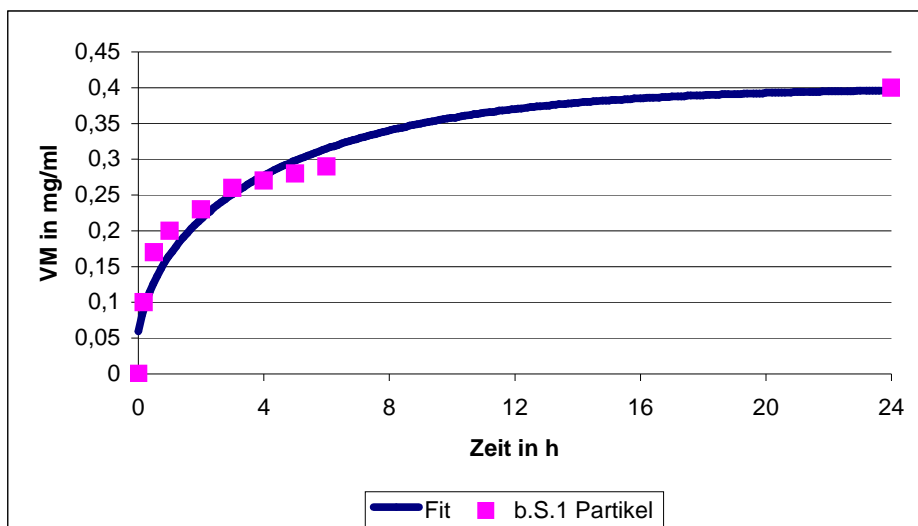


Abb. 24: Freisetzung von VM in mg/ml aus VM-CaCO₃-bP 1-Partikeln (Zugabe von VM bei Präzipitation, Probe 1) in 24h, mit Fit aus EXDIF-Programm, der an die experimentell gemessenen Werte angepasst wird.

Ergebnisse

In Abbildung 24 wird beispielhaft dargestellt, wie das EXDIF-Computerprogramm anhand des experimentell gemessenen Konzentrationsanstiegs einen Fit anpasst, welcher den theoretischen Diffusionskoeffizienten definiert.

3.8 Knochenversuche

3.8.1 Knochenvorversuch mit VM-Lösung

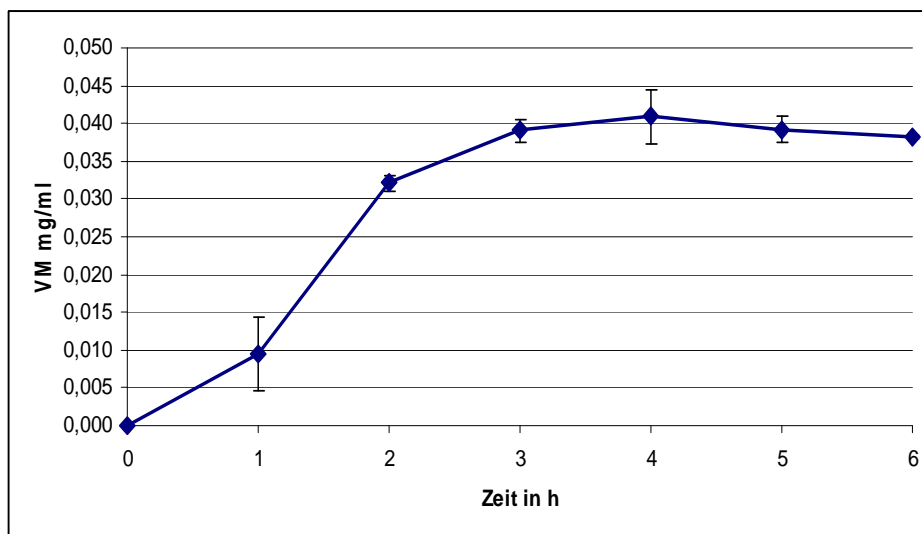


Abb. 25: VM-Konzentrationen in mg/ml im Überstand der Knochen ohne Partikel, Verdünnungsfaktor rausgerechnet, MW und SA (n=3). Nach 4h hat sich ein Gleichgewicht in der Lösung eingestellt.

Der Knochenvorversuch, der mit 100 μ L einer 8 mg/ml VM-Lösung durchgeführt wurde und dessen VM-Konzentrationen im Überstand in Abbildung 25 sichtbar sind, zeigt, dass die reine, nicht eingekapselte VM-Lösung ohne Partikel nach 3 h ihre maximale Konzentration von 0,037 mg/ml erreicht. Das heißt, dass nach 3 h das VM sich durch den Knochen hindurch gleichmäßig in der PBS-Amphotericinlösung verteilt hat.

3.8.2 Knochenversuch mit VM-CaCO₃-HSA 2-Partikeln

Die Knochenversuche wurden entsprechend 2.6 durchgeführt und über eine Dauer von 144h im Langzeitversuch auf ihre VM-Konzentrationen hin untersucht.

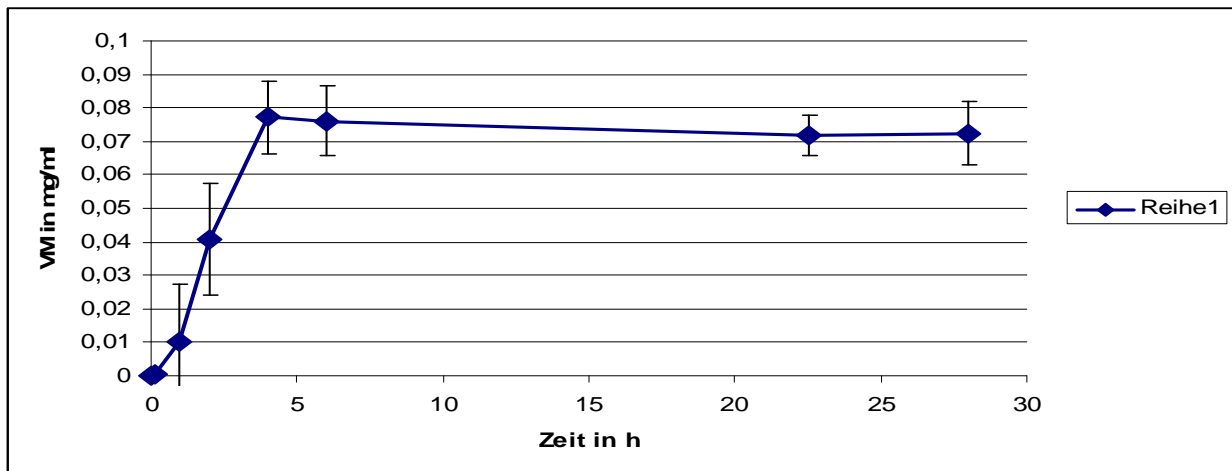
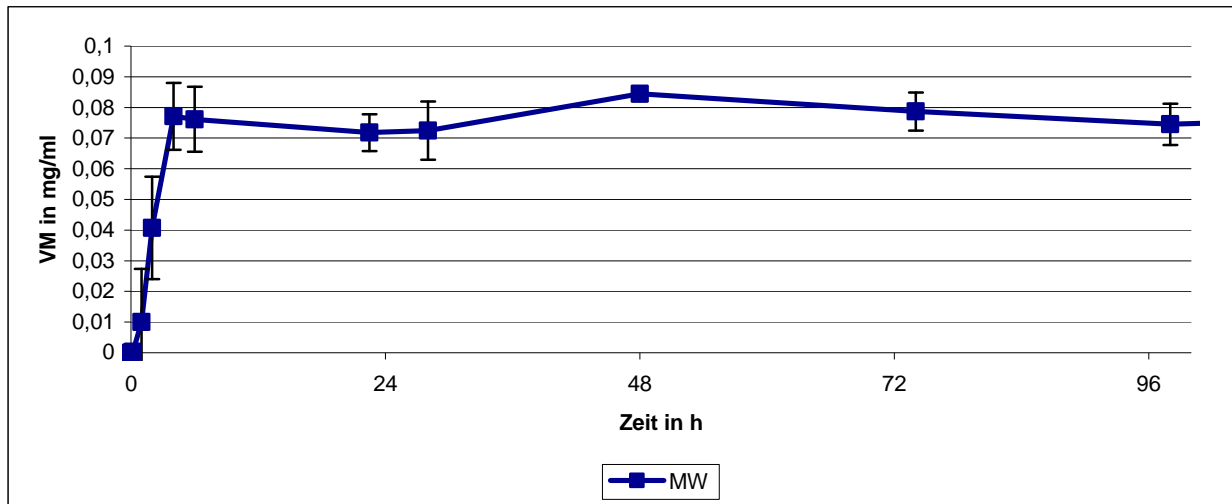


Abb. 26: MW und SA (n=3) der VM-Konzentration in mg/ml im Überstand der Knochenversuche mit VM-CaCO₃-HSA 2-Partikeln (Zugabe von HSA und VM bei der Präzipitation), Verdünnungsfaktor herausgerechnet, a) bis 96h und b) bis 28h. Erkennbar ist der steile Konzentrationsanstieg binnen der ersten 5h und die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der VM-Konzentration in den Partikeln und im Überstand. Im weiteren Verlauf schwanken die Werte bis 96h, verändern sich aber nicht mehr wesentlich.

In Abbildung 26 wird ersichtlich, dass der größte Konzentrationsanstieg in der die Knochen umgebenden PBS-Lösung bereits nach 4h stattgefunden hat, dass aber insgesamt bis zu 48h VM aus den Partikeln austritt. Zum Zeitpunkt 48h ist die Maxi-

Ergebnisse

malkonzentration von 0,084 mg/ml erreicht. Anschließend sinkt die VM-Konzentration kontinuierlich ab.

4 Diskussion

Die Osteomyelitis ist eine schwerwiegende und zu Chronifizierung neigende Erkrankung. Es handelt sich dabei um eine Entzündung des Knochens, die alle Strukturen betreffen kann und in deren Folge es zur Nekrose des Knochens und zur Sepsis kommen kann [1, 3].

Im Vordergrund der Therapie stehen eine chirurgische Sanierung und eine antibiotische Therapie, da es sich in der Regel um eine bakteriell getriggerte Inflammation handelt [4, 5]. Die Antibiotika können systemisch oder lokal verabreicht werden. Eine Kombination dieser zwei Darreichungsformen hat sich als vorteilhaft erwiesen, da es zu weniger Rezidiven im Langzeitverlauf der Erkrankung kam. Ziel einer Antibiose ist, eine Keimeradikation möglichst schnell und mit wenigen Nebenwirkungen durchzuführen. Die systemischen Nebenwirkungen vieler Antibiotika, wie Nieren- und Leberbelastung, können bei einer lokalen Antibiose vernachlässigt werden. Lokal können weitaus höhere Konzentrationen an Antibiotika appliziert werden, die bei einer systemischen Applikation, wegen der Hämatome und Ödeme im traumatisierten Knochen, nicht zu erreichen wären [53].

Für die lokale Applikation von Antibiotika sind zwei verschiedene Trägersubstanzklassen bekannt, die klassischen und die resorbierbaren Materialien. Letztere werden physiologisch über die Zeit hinweg abgebaut und bieten daher viele Vorteile. Ein operativer Eingriff zur Entfernung des Materials nach Beendigung der Therapie ist dadurch nicht mehr notwendig, so dass für den Patienten eine weitere OP mit zugehörigem perioperativen Risiko und Kosten entfällt [21]. Zusätzlich wird bei einigen resorbierbaren Materialien, die wie Kalziumkarbonat eine hervorragende Biokompatibilität besitzen [35], das Hervorrufen von Fremdkörperreaktionen und das Risiko der Resistenzentwicklung durch Persistenz der Keime auf häufig genutzte Antibiotika minimiert. Durch eine vollständige Eradikation aller sich im Gewebe befindenden Keime kann verhindert werden, dass die Bakterien eine sekundäre Resistenz entwickeln.

Es handelt sich daher bei den biologisch abbaubaren Trägersubstanzen, die Antibiotika enthalten, um eine sehr interessante Therapiealternative.

In der vorliegenden Arbeit werden oberflächenmodifizierte CaCO_3 -Mikropartikel als Drugcarrier für Vancomycin untersucht. Ziel ist, eine Trägersubstanz herzustellen,

welche physiologisch abgebaut werden kann, eine ausreichende Beladung mit Antibiotika zulässt und zu einem kontrollierten Release derselben führt.

Die exemplarischen Ergebnisse der verschiedenen Partikelsorten in Bezug auf Beladungseffizienz, Freisetzungskinetik und Diffusionskoeffizienten werden im Folgenden verglichen und diskutiert.

4.1 VM-CaCO₃-Partikel

Nano- und Mikropartikel können in ihren Eigenschaften, wie Löslichkeit, Freisetzungskinetik, Abbaugeschwindigkeit und Gesamtoberfläche, beeinflusst und gezielt hergestellt werden. Jedoch birgt diese Herstellung auch neue Herausforderungen in sich, da viele Variablen noch unbekannt sind. Hinzu kommt die Tatsache, dass sich die Eigenschaften eines Materials verändern, wenn es in Nanometergröße vorliegt. Es handelt sich dabei um komplexe dreidimensionale Strukturen, deren Größe, Form und Ladungen die Charakteristika maßgeblich beeinflussen. Caruthers et al. 2007 betonen, dass es sich in der Nanomedizin überwiegend um Strukturen handelt, von denen der Großteil noch nicht definiert worden ist [54]. Eine Veränderung des pH-Wertes und der Mischverhältnisse der eingesetzten Chemikalien beeinflusst die Partikelmorphologie erheblich [55].

Die Partikelsynthese erfolgte wie bei Petrov et al. 2005 [37] beschrieben, allerdings wurden Rührgeschwindigkeit und Rührdauer variiert und deren Auswirkungen auf die Partikelmorphologie untersucht. Wie erwartet, konnte festgestellt werden, dass aus der am langsamsten und der am kürzesten gerührten Probe (10s bei 4 Umdrehungen pro Sekunde) die größten Partikel (4,5 µm) entstanden. Dies beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die präzipitierenden Nanokristalle bei langsameren Umdrehungen, mehr Zeit haben, zu größeren Komplexen zu aggregieren. Die kleinsten Kristalle entstanden bei Rührtempo 3 (10 Umdrehungen pro Sekunde) für 20 s. Da die Herstellung von Mikropartikeln angestrebt wurde, hätte jede dieser Partikelgrößen verwendet werden können. Jedoch wurden die 4,5 µm Partikel verwendet, da Liu et al. 1999 dargestellt haben, dass größere Partikel aufgrund ihrer insgesamt geringeren Oberfläche zu einer langsameren Freisetzung führen [21]. Eine zeitverzögerte, kontinuierliche Freisetzung wurde als Ziel dieser Arbeit angestrebt. Allerdings muss diskutiert werden, ob nicht optimalerweise kleinere Partikel eine größere Menge an VM

hätten absorbieren können, da sie insgesamt je ml Volumen eine größere Oberfläche besitzen würden.

Sukhorukov et al. 2004 nennen die Konzentration der Salzlösungen, den pH-Wert, die Temperatur, die Dauer und die Geschwindigkeit des Rührvorgangs bei der Herstellung der Partikel als wichtige Faktoren, die die Partikelmorphologie wesentlich beeinflussen [35]. In diesem Zusammenhang entspricht die in dieser Arbeit evaluierte Größenveränderung der Partikel, je nach Rührdauer und Geschwindigkeit, der Abbildung 3. Um eine konstante Herstellung von Mikropartikeln einer Größe von durchschnittlich $4,5 \mu\text{m}$ zu gewährleisten, wurden diese unmittelbar vor jedem Versuchsbeginn zu gleichen Konditionen hergestellt.

Die unbehandelten VM- CaCO_3 -Mikropartikel wurden mit zwei unterschiedlichen Beladungsmechanismen, mit VM-Inkubation nach und bei der Präzipitation (s. 2.3), hergestellt und anschließend mehrere Langzeit- und Auflöserversuche durchgeführt. In Kapitel 3.3 Abb.4 wird ersichtlich, dass die Partikel mit VM-Inkubation bei der Präzipitation die doppelte Menge an Antibiotikum einschließen können, als die erst nach der Präzipitation beladenen Partikel. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei der Präzipitation der porösen CaCO_3 -Partikel in Verbindung mit VM, dieses zentral im Kern eingeschlossen werden kann. Wohingegen erst im Nachhinein zugefügtes VM weniger tief in die Partikel hinein diffundiert. Dadurch ist dieses VM bei den Waschvorgängen weniger geschützt als Moleküle, die zentraler eingekapselt wurden. Dies bestätigen die Ergebnisse von Petrov et al. 2005, die bei einer VM- CaCO_3 -Partikelsynthese in Anwesenheit von Proteinen 5fach größere Mengen erreichten, als Partikel, die erst nach der Synthese Proteine absorbierten. Erklärt wird dies anhand der kleinen Porendurchmesser, die eine nachträgliche Diffusion einschränken können. Sie beschreiben sphärische CaCO_3 -Partikel mit gleichmäßiger Größenverteilung von ca. $5 \mu\text{m}$ und einem ausgeprägt porösen Innenleben, charakterisiert durch miteinander verbundene Freiräume und Kapillaren innerhalb der Kapsel [37].

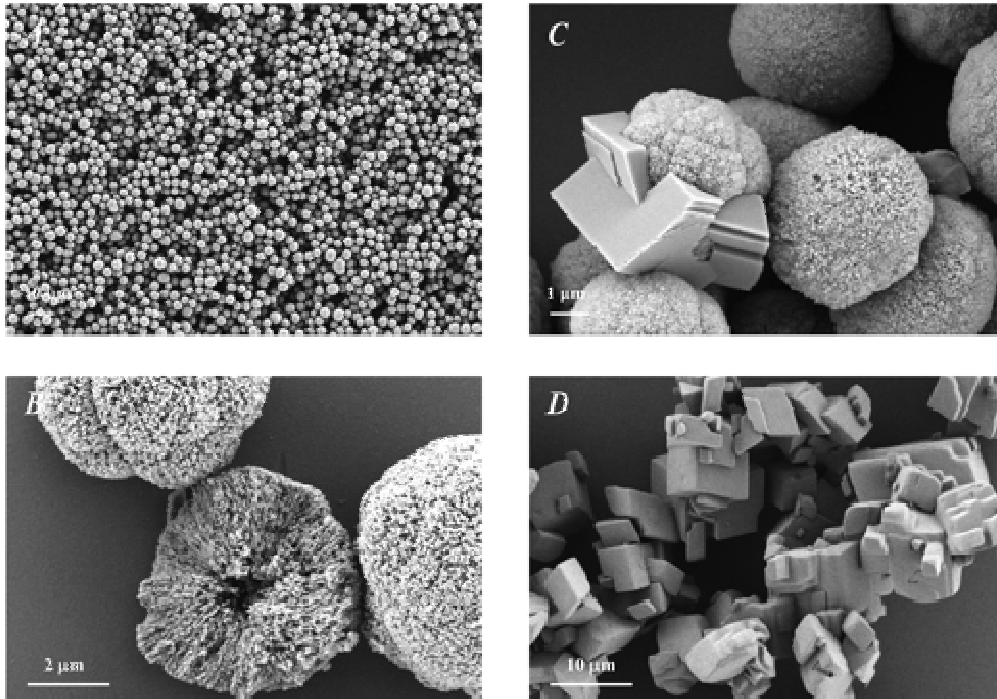


Abb. 27: SEM Bilder der CaCO₃-BSA Partikel
A) Übersicht B) zerbrochener Partikel C) Rekristallisation der Partikel D) Kalziumkarbonat Mikrokristalle (Aldrich), [45].

Es wird erläutert, dass, wie in Abbildung 28 schematisch dargestellt, bei der Mikro-partikelherstellung zu Beginn zahlreiche einzelne Nanopartikel und anschließend durch deren Aggregation die Mikro-partikel entstehen. Die während der Kristallisation anwesenden Moleküle können daher bereits an die Oberfläche der Nanopartikel absorbieren. Diese besitzen zusammengefasst eine weit höhere Oberfläche, als die fertig aggregierten Mikro-partikel.

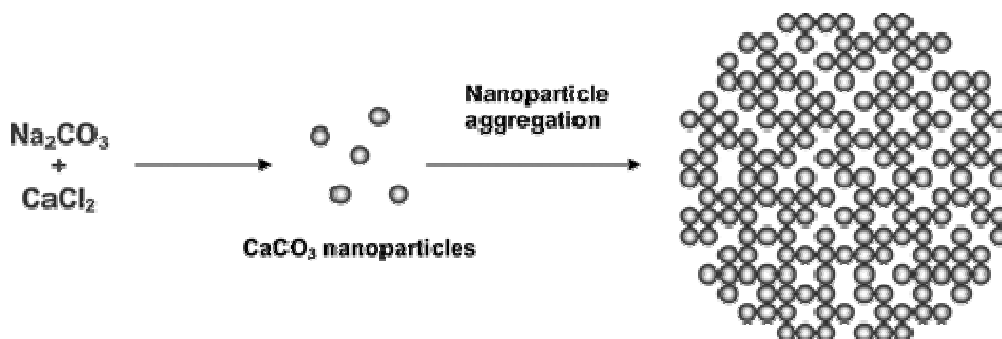


Abb. 28: Schematische Darstellung der CaCO₃-Mikro-partikelformation, [45].

Insgesamt besitzen die Partikel von einer Größe von 4,8 µm im Durchschnitt eine Oberfläche von 13 +/- 7 m²/g und eine Porengröße von 20-70 nm [46]. Dies führt da-

zu, dass die porösen Partikel eine 11fach höhere Oberfläche als gleich große, kompakte Partikel besitzen [35]. In etwa 59% des Partikelvolumens sind mit CaCO_3 gefüllt und 41% liegen als interne Poren und Freiräume vor [46].

Volodkin et al. 2004 untersuchten die Oberflächenladung der CaCO_3 -Partikel und stellten in Wasser eine negative Ladung der Partikel bei pH-Werten größer 9 fest. Da CaCO_3 -Mikropartikel jedoch ihren isoelektrischen Punkt bei $\text{pH} = 8,5$ besitzen und die CaCO_3 -Lösung nach Inkubation mit VM-Hydrochlorid einen $\text{pH} = 8$ aufzeigt, lagen die VM- CaCO_3 -Partikel positiv geladen vor. Das VM besitzt mehrere funktionelle Gruppen, darunter eine Carboxylgruppe, 2 Amino- und 3 Phenolgruppen und liegt bei einem $\text{pH} = 8$ negativ geladen vor. Sukhorukov et al. 2004 beobachteten eine positive Auswirkung von entgegen gesetzten Ladungen auf die Menge an aufgenommenen Molekülen. Jedoch berichten sie auch von einer hohen Proteinaufnahme in CaCO_3 -Partikel trotz gleicher Ladungen. Es wird vermutet, dass dies möglich ist, weil neben elektrostatischen Wechselwirkungen auch sterische Wechselwirkungen, ein Wechsel des Hydratationszustandes und die Organisation der makromolekularen Struktur als treibende Kräfte wirken [35]. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit VM gearbeitet wurde, kann zu diesem Vergleich keine Stellung genommen werden.

CaCO_3 -Partikel gelten als physiologische Komponente biologischer Systeme [35]. Es ist davon auszugehen, dass die Mineralien aus dem Mikropartikelzerfall sich stabilisierend in die Knochenmatrix integrieren. Nanopartikel aus Kalziumkarbonat wurden bereits in Knochenzement gerührt, um dessen Stabilität zu erhöhen und die Zytotoxizität zu reduzieren [56]. Weitere Vorteile neben der Biokompatibilität des Kalziumkarbonats sind, dass es sich um ein kostengünstiges Material handelt, die Partikel eine kurze Herstellungsdauer besitzen und dass keine Hitze bei der Herstellung der Kristalle notwendig ist, so dass auch thermolabile Antibiotika wie VM verwendet werden können [45].

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass CaCO_3 -Partikel VM aufnehmen und zeitverzögert wieder abgeben. Jedoch geschah dies im Rahmen der unbehandelten VM- CaCO_3 -Partikel ohne Biopolymere bereits binnen 6h, weshalb eine Optimierung der Partikel mit Biopolymeren erfolgt. Für eine antibiotische Therapie der Osteomyelitis wird eine initial hohe Freisetzung, ein sogenannter „burst“ angestrebt, welcher postoperativ zu einer schnellen Keimabtötung führt und anschließend eine konstante Freisetzung für 2-4 Wochen oberhalb der minimalen Hemmkonzentration garantiert. Diese liegt für VM bei 1,18 mg/L [21]. Zusätzlich muss die Freisetzung

über einen begrenzten Zeitraum hinweg erfolgen, um eine Resistenzentwicklung zu verhindern.

4.2 Oberflächenmodifikationen

4.2.1 Albumin

Albumin ist ein wasserlösliches Protein bestehend aus 585 Aminosäuren. Wegen seiner ampholytischen Eigenschaften (d.h. es kann Kationen und Anionen binden) ist es in der Lage, pH-Werte zu puffern. Da es hydrophile und lipophile Substanzen binden kann, besitzt es im Blut die Rolle des Transportmoleküls.

Die in Anwesenheit von BSA kristallisierten Partikel besitzen eine größere Oberfläche ($63 \pm 12 \text{ m}^2/\text{g}$) und einen kleineren Porendurchmesser von 4-15 nm, denn sie bestehen aus kleineren Nanopartikeln. Die Anwesenheit von Proteinen erhöht die Keimbildungsrate [57]. Das Kalziumkarbonat selbst verändert ebenfalls die Sekundärstruktur des Albumins, so dass es eine optimale Konformation für eine Biomineralisierung erhält [58]. Diese Angaben in der Literatur konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Es wird angenommen, dass die Effekte von BSA und HSA direkt vergleichbar sind, da ihre Sequenz zu 76% identisch ist [59].

Ziel der zwei HSA-Versuchsreihen war der Vergleich der Freisetzungskinetik und Beladungseffizienz zwischen Partikeln mit Zugabe des HSA bereits vor der Partikelpräzipitation und Partikeln, bei denen die HSA-Zugabe erst nach der abgeschlossenen Partikelherstellung erfolgte. Es konnte festgestellt werden, dass die unterschiedliche Anfertigung der HSA-Umhüllung die Charakteristika der Partikel wesentlich verändert. Die VM-Mikropartikel, welche im Anschluss an die Präzipitation mit HSA inkubiert wurden (CaCO₃-HSA 1-Partikel), enthielten geringere Mengen an VM als die identisch behandelten Kontrollpartikel ohne HSA. Dies ist an der niedrigen Beladungseffizienz von 10,7% deutlich zu erkennen. Eine mögliche Erklärung lautet, dass die HSA-Lösung einen osmotischen Effekt auf das in den Partikeln enthaltene VM ausübt. Daher sind diese CaCO₃-HSA 1-Partikel für eine Herstellung von VM-Partikeln, trotz des niedrigen Diffusionskoeffizienten von $5,9 \times 10^{-07}$, ungeeignet.

Als nächster Versuchsaufbau wurde die simultane Inkubation von HSA während der Präzipitation gewählt, indem dieses bereits in die Na₂CO₃-Lösung gegeben wurde. Es stellte sich heraus, dass diese VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel die 10fache Menge an VM, im Vergleich zu den Kontrollpartikeln ohne HSA, einschließen. Im Langzeitver-

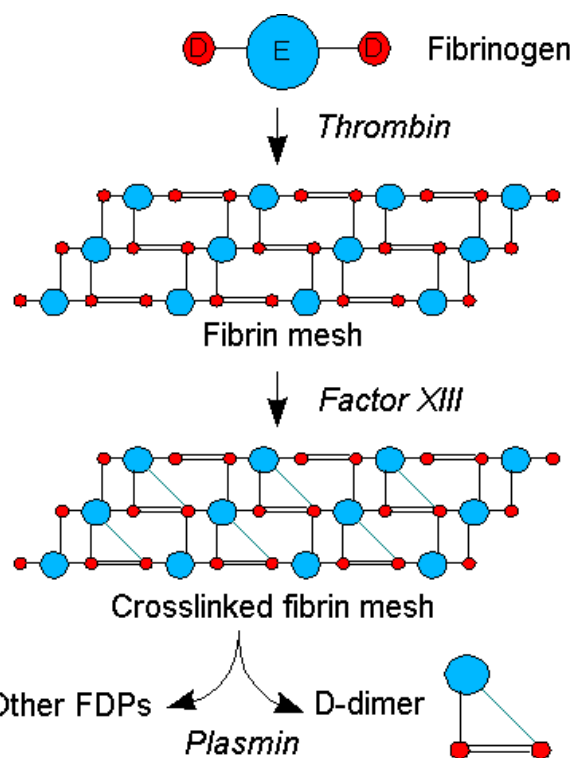
sich über 96h konnte eine ansteigende Freisetzung innerhalb der ersten 24h beobachtet werden.

Die VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel weisen mit 68% die zweithöchste Beladungseffizienz und einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten ($5,75 \times 10^{-7}$) als die VM-CaCO₃-Partikel ohne Polymere auf. In Anbetracht dieser hohen Konzentrationen in den Kristallen, verlieren diese mit 17% relativ wenig VM bei den Waschschrritten 1-3. Es ist anzunehmen, dass bei dieser Partikelart aufgrund der erhöhten Porosität mehr VM aufgenommen wird und bei dem kleineren Porendurchmesser stärker verzögert wieder heraus diffundiert.

Diese Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass BSA und weitere Polymere, die während der Partikelpräzipitation zugegeben werden, den Kristallisierungsprozess erheblich beeinflussen. Albumin besitzt eine besonders stark positive Auswirkung auf die Nukleation, da es sich um ein strukturell instabiles Protein handelt und somit eine ausgeprägte Absorption im Sinne der Entwicklung einer positiven Entropie fördert [59].

4.2.2 Fibrin

Fibrinogen, ein Glykoprotein, liegt im Blut als Dimer gelöst vor. Im Falle einer Koagulation wird das Dimer durch Thrombin in zwei Monomere gespalten: Fibrinopeptid A und B [60].



Diese Monomere können sich durch nonkovalente Wechselwirkungen zu Strängen verbinden und anschließend unter Mitwirkung des Gerinnungsfaktors XIII A ein stabiles Gerüst bilden (siehe Abb. 29) [61]. Dieses Fibringerüst besteht aus heterogenen Maschen unterschiedlicher Größe [62].

Abb. 29: Schematische Darstellung der Entstehung eines Fibringerüsts durch Thrombin und Faktor XIII aus Fibrinogendimeren

Diskussion

Dieser physiologische Prozess wurde in dieser Arbeit für eine Umhüllung der MP als Diffusionsbarriere genutzt.

Das Fibrinogen lag in physiologischer Konzentration im Plasma, welches für die Herstellung der VM-CaCO₃-Fibrinpartikel genutzt wurde, vor. Im Anschluss an die Präzipitation wurde eine Thrombinlösung auf die Kristalle gegeben und eine Vernetzung des Fibrins erreicht.

Die Beladung eines Fibrinthrombus mit Ciprofloxazin wurde von Tsourvakas et al. 1995 untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass das Fibrin *in vivo* keine systemischen Nebenwirkungen auslöst und sich *in vitro* nach 60 Tagen auflöst [63]. Geer et al. 2002 konnten nachweisen, dass Fibrin den Wundheilungsprozess und die Angiogenese beschleunigt, indem es eine Matrix zur Zelladhäsion und Migration bereitstellt [64, 65]. Durch diese Eigenschaften wird Fibrin zu einem sehr interessanten Polymer bei der Herstellung der MPs. Vorteilhaft ist zusätzlich, dass Kalzium die Fibrinbildung fördert [60].

Die CaCO₃-Fibrinpartikel mit Vancomycin liegen mit einem Diffusionskoeffizienten von $1,9 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei Raumtemperatur unterhalb des Diffusionskoeffizienten von VM ohne Partikel in Wasser. Jedoch mit einer Größenordnung deutlich über den VM-CaCO₃-HSA- und den VM-CaCO₃-Dextran-Partikeln. Bei 37°C erhöht sich der Diffusionskoeffizient auf $2,2 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{s}$, da die Brownsche Molekülbewegung bei 12°C Unterschied deutlich schneller abläuft. Die VM-CaCO₃-nP-Partikel liegen auf gleicher Ebene wie die VM-CaCO₃-Fibrinpartikel hinsichtlich des Diffusionskoeffizienten. Das bedeutet dass die Fibrinumhüllung für die Schnelligkeit der Diffusion keine vorteilhafte Verzögerung bringt. Jedoch liegt die Beladungseffizienz der VM-CaCO₃-Fibrinpartikel mit 93% im Vergleich zu den anderen Partikelarten sehr hoch. Das bedeutet, dass der Verlust an VM bei den CaCO₃-Fibrinpartikeln am geringsten ist, da die eingesetzte Konzentration zu 93% auch in den Partikeln erreicht wird.

Mittels Zugabe von Aprotinin kann die Halbwertszeit und Stabilität des Fibringels verlängert werden, da es den Abbau des Fibringerüsts verzögert [66]. Ohne dessen Zugabe findet ein Abbau des Fibrins in der Regel binnen zwei Wochen statt [62].

Es könnte daher in Erwägung gezogen werden, bei der Applikation von Fibrinpartikeln in den Knochen, der Lösung Aprotinin hinzuzufügen. Durch die verlängerte Stabilität des Fibrins könnte die Freisetzung des VM verzögert werden.

4.2.3 Fibrin und Enzyme

Für eine Annäherung der *in vitro* Ergebnisse an die tatsächlichen *in vivo* Bedingungen wurden die VM-CaCO₃-Fibrinpartikel bei 37°C in eine Lösung gegeben, die eine physiologische Konzentration an Plasmin und Alteplase (rt-PA, rekombinanter gewebspezifischer Plasminogenaktivator) enthielt.

Im menschlichen Körper werden Fibrinthromben von Plasmin aufgelöst. Dieses Enzym zirkuliert im Blut als inaktives Proenzym Plasminogen. Gelangt es in die Nähe eines Fbringerüsts, wird es über eine Lysinbindungsstelle gebunden und in seine aktive Plasminform gespalten. Die aktivierte Protease führt zur Spaltung des fest gebundenen Fbringerüsts [67]. Alteplase ist eine Serinprotease, die von den Endothelzellen sezerniert wird und zusätzlich die Aktivierung des Plasmins bewirkt und somit die Gerinnung hemmt [61]. Die VM-CaCO₃-PV-Partikel liegen mit ihrer Beladungseffizienz von 90% erwartungsgemäß ähnlich hoch wie die VM-CaCO₃-Fibrin-Partikel. Die Wirksamkeit des proteolytischen Plasmins wird anhand des etwas erhöhten Diffusionskoeffizienten von $6,2 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{s}$ deutlich.

Für die Effektivität dieser MP im Sinne einer Verzögerung der Freisetzung von VM gilt das gleiche, wie bereits oben für die VM-CaCO₃-Fibrinpartikel genannt wurde.

4.2.4 Dextran

Dextrane sind neutral geladene, stark verzweigte Polysaccharide, deren Grundstruktur das Glukosemolekül bildet und die daher biokompatibel und resorbierbar sind [68].

Um die Auswirkungen von einer Oberflächenmodifikation mit Dextran genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Möglichkeiten der Dextranapplikation gewählt. Die VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikel wurden nach der Herstellung in eine 20% Dextranlösung von 464 kD für 1h gegeben und anschließend wurde das Dextran durch Divinylsulfon vernetzt. Es wurde anhand der Beladungseffizienz von 9% deutlich, dass nach diesen Versuchsschritten die Konzentration an enthaltenem VM sehr gering war. Es ist anzunehmen, dass während der Inkubation mit Dextran und der anschließenden Dextranvernetzung bereits ein Großteil des VM aus den Partikeln herausdiffundiert. Die Beladung der Partikel ist abhängig vom Molekulargewicht der einzelnen Substanzen. Dies zeigt, dass kleine Moleküle, wie z.B. Dextran 4 kD die Poren penetrieren können und sich im Inneren der Partikel gleichmäßig verteilen. Im Gegen-

Diskussion

satz dazu kann das 2000 kD Dextran überwiegend nur außen an die Partikel adsorbieren [45]. Diese Erläuterungen von Volodkin et al. 2004 erklären, weshalb in dieser Arbeit die Beladung mit einem kleineren Dextran zu einer besseren Beladung mit VM führte als der vergleichbare Versuch mit einem größeren Dextran. Die kleineren Dextranmoleküle dringen tiefer in die Poren ein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die kleinen Dextranmoleküle eine dichtere Hülle als die größeren Moleküle bilden, da Letztere sich ausschließlich von außen an die Partikel anlagern.

Die Dextranpartikel wurden zusätzlich nach der Herstellung und Beladung mit VM mit Divinylsulfon vernetzt. Die Vernetzung stellt einen sehr aufwendigen Schritt in der Herstellung dar, da während der Inkubation mit Divinylsulfon bereits ein Teil an VM aus den Partikeln heraus diffundiert und verloren geht. Zusätzlich soll die Vernetzung bei einem pH = 11 stattfinden. Dabei handelt es sich um einen pH-Bereich, in dem VM instabil wird [28]. Auch wird eine Beladung in diesem pH-Bereich ineffektiver, da die CaCO₃-Partikel wie das VM negativ geladen vorliegen und eine Abstoßungsreaktion wahrscheinlich ist.

Der identische Versuch mit einem kleineren Dextran der Größe 70 kD enthielt im Überstand nach 44h einen um 33% höheren Betrag an VM im Vergleich zum Überstand der Partikel mit dem 464 kD Dextran. Auch der Diffusionskoeffizient ist bei dem 70 kD Dextran um 35% kleiner als bei dem 464 kD Dextran. Daraus wird ersichtlich, dass die Barriere, die eine Diffusion des VMs aus den Partikeln behindert, bei dem 70 kD Dextran dichter ist. Insgesamt besitzen die CaCO₃-Dextran 1-Partikel mit $4 \times 10^{-07} \text{ cm}^2/\text{s}$ einen sehr niedrigen Diffusionskoeffizienten, verlieren jedoch während der Waschschrte 1-3 mit 40% am meisten VM von allen Partikelsorten, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Trotzdem wurde die Auswirkung von Dextran, das bei der Synthese der Partikel bereits hinzugefügt wurde, auf die VM-Menge untersucht. Der Diffusionskoeffizient dieser VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel ist mit $2,6 \times 10^{-07}$ der niedrigste, der in dieser Arbeit erreicht wurde. Auch der Verlust während der Waschschrte liegt mit 11% ähnlich niedrig, wie bei den VM-CaCO₃-HSA 1-Partikeln. Es wurde jedoch festgestellt, dass bei diesen VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikeln die Beladungseffizienz wider Erwarnten mit 10% nahezu identisch ist mit den VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikeln, das heißt sehr niedrig liegt.

Der Verlust an VM wird in Abbildung 14 besonders deutlich, denn in diesem Dextran 2-Partikel Versuch wurde VM bei einem Teil der Partikel zusätzlich während der Ver-

netzung in den Überstand gegeben, um die Verluste zu minimieren. Dieser Vorgang führt zwar zu Partikeln mit einem höheren VM-Gehalt, verursacht jedoch durch den erhöhten Bedarf an VM deutlich höhere Kosten der Herstellung und erhöht den Diffusionskoeffizienten um die Größenordnung einer Zehnerpotenz. Daher ist eine Nachinkubation als Modifikation nicht ideal.

Insgesamt stellen die Dextranpartikel keine anzustrebende Oberflächenmodifikation zur Freisetzung von großen Mengen an VM aus den MP über einen langen Zeitraum dar. Wie in Abbildung 10 ersichtlich wird, liegt die Beladungseffizienz extrem niedrig und das Herstellungsverfahren ist durch die Vernetzung aufwendig und langwierig. Es ist anzunehmen, dass das Dextranmolekül zwar die Poren penetriert, dort jedoch nicht zu einer positiven Verstärkung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen CaCO_3 und VM führen kann, da es neutral geladen und wasserlöslich vorliegt.

4.3 Knochenversuch

Bei dem Knochenversuch handelt es sich um einen Pilotversuch, bei dem eine zusätzliche Komponente, nämlich der Knochen selbst, bei der Freisetzung des VM aus den Mikropartikeln untersucht wurde. Durch die Applikation der Partikel auf einen Knochenquader wurden die Wechselwirkungen zwischen Knochen und Mikropartikeln untersucht. Da exemplarisch mit sehr geringen Mengen gearbeitet wurde, bestand ein hohes Konzentrationsgefälle, welches eine sehr schnelle Gleichgewichtseinstellung der Konzentrationen zur Folge hatte. Im Vergleich zu dem Knochenvorversuch, bei dem das VM ohne Partikel auf die Spongiosa gegeben wurde, verlängerte sich die Freisetzung von 3,5h auf 5h bei der Verwendung der Mikropartikel, was eine Verzögerung der Freisetzung um 30% bedeutet. Danach hatte sich das VM im Überstand gleichmäßig verteilt. Es muss jedoch angemerkt werden, dass *in vivo* aufgrund des Abtransportes von VM durch die Blutbahn weiterhin VM freigesetzt würde. Infolgedessen würde die VM Freisetzung bis zur vollständigen Entleerung der Partikel ablaufen.

Mit dem Knochenmodell konnte verdeutlicht werden, dass die Spongiosa eine Freisetzung des VM aus den Partikeln nicht behindert.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte beobachtet werden, dass die VM- CaCO_3 -Partikel in wässriger Lösung nach 24 h zu rhomboiden Formationen weiter

aggregieren (siehe Abbildung 25D). Die amorphe Struktur von CaCO_3 -Mikropartikeln entspricht einem instabilen Zustand des Materials und kristallisiert in Aqua dest. bereits nach wenigen Minuten weiter zu Calcit [69]. Dies entspricht den Beobachtungen von Volodkin et al. 2004 [46]. Sie verhinderten die Calcitkristallentstehung, indem sie die Partikel mit Wasser und Aceton wuschen und anschließend trockneten. In der hier dargestellten Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Oberflächenmodifikation mit Fibrin ebenfalls zu einer Stabilität der Partikel führte und es erst nach 5 Tagen in flüssigem Medium zu einer Rekristallisation kam.

4.4 Verlust bei Waschsritten

Der in dieser Arbeit errechnete Verlust an VM während der Waschschriffe entspricht den Angaben aus der Literatur von Volodkin et al. 2004 [45], dort wird von 6% Verlust während der Herstellung und der Waschvorgänge berichtet. Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei überwiegend um die Moleküle handelt, die an die äußeren Partikelschichten absorbiert waren. In Abbildung 6 wird ersichtlich, dass der Großteil des VM beim ersten Waschschriff verloren geht. Im Verlauf der nächsten zwei Waschschriffe liegt dieser bei W2 bei ca. 0,7% und geht bei W3 gegen 0%. Die verschiedenen Partikelsorten verlieren unterschiedlich viel VM während der Waschvorgänge. Am wenigsten verlieren die VM- CaCO_3 -bP-Partikel (bei Präzipitation) mit 9,62%, die VM- CaCO_3 -HSA 1-Partikel mit durchschnittlich 10,5% und die VM- CaCO_3 -Dextran 2-Partikel mit 11,35%. Am meisten verlieren die VM- CaCO_3 -Dextran 1-Partikel mit 40,45%.

Die Annahme, dass die VM-Konzentration im Ü1 der in den Partikeln enthaltenen VM Konzentration entspricht, ist stark vereinfacht und trifft auf die verschiedenen Partikelsorten in unterschiedlicher Weise zu. Im Fall der Albumin-Partikel könnte im Kern eine höhere Konzentration vorliegen, aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen und der kleineren Poren, die den Diffusionsprozess des VM verlangsamen.

Im Rahmen dieser Arbeit stellten die Waschschriffe eine wichtige Voraussetzung für die Versuche dar. Denn nur anhand der Dokumentation, dass in der die Partikel umgebenden Lösung kaum VM vorhanden war, konnte bewiesen werden, dass die zeitabhängig bestimmte VM-Konzentration tatsächlich aus den MP heraus diffundierte.

Der VM-Verlust, der bei den Waschschriffen in dieser Arbeit aufgetreten ist und einen Kostenfaktor darstellt, ist für die Pharmaindustrie nicht relevant. Denn bei der indus-

triellen Herstellung der VM-CaCO₃-Mikropartikel sind die Waschschriffe nicht notwendig.

4.5 Beladungseffizienz

Auf der Grundlage der experimentell gemessenen Konzentrationen an VM unmittelbar nach Herstellung und anschließender Auflösung der Partikel, wurde die Menge an VM, die in den Mikropartikeln enthalten war, bestimmt und als Beladungseffizienz BE definiert:

$$\text{BE} = \text{VM-Konzentration in den MP} / \text{eingesetzte VM-Konzentration} \times 100\%$$

Je höher die Beladungseffizienz ist, desto affiner ist VM gegenüber den Mikropartikeln, d.h. desto mehr VM wird in den MP immobilisiert. Die Synthese von Partikeln mit einer hohen Beladungseffizienz wurde angestrebt, um den Verlust an VM und die damit verbundenen Kosten gering zu halten.

Die Beladungseffizienzen der verschiedenen Partikelsorten variierten im Bereich von 9% - 93%. Dieser Unterschied in der Größenordnung einer Zehnerpotenz verdeutlicht wie unterschiedlich die MP, abhängig von den verwendeten Polymeren und Herstellungsverfahren, das VM aufnehmen.

Die höchsten Werte von 93% und 90% erreichen die VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-PV Partikel. Den dritthöchsten Prozentsatz von 68% nehmen die VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel auf. Darauf folgen bereits die VM-CaCO₃-bP-Partikel mit 41%. Anhand dessen wird ersichtlich, dass die restlichen Partikelsorten, VM-CaCO₃-Dextran 1 und 2 sowie VM-CaCO₃ HSA 1-Partikel die Beladungseffizienz betreffend, keinen Vorteil gegenüber den reinen VM-CaCO₃-nP-Partikeln (21%) ohne Polymere erbringen. Die Ursache dafür liegt in der unterschiedlichen Partikelmorphologie mit verschiedenen Porengrößen, die die Immobilisierung des VM in den Partikeln maßgeblich beeinflussen.

4.6 Diffusionskoeffizient

Die Freisetzung von Medikamenten aus biologisch abbaubaren Trägersubstanzen, erfolgt über Diffusion und Matrixerosion. Das bedeutet, dass der Konzentrationsgradient zwischen Partikel und Umgebung und der Abbau bzw. Zerfall der Partikel maß-

gebend für die Freisetzung des enthaltenen Medikamentes sind. Diffusion ist ein Prozess, welcher in der Regel zur homogenen Verteilung von Molekülen im Raum führt. Im flüssigen Medium können sich die Moleküle nicht wie in Gasen frei bewegen, sondern ihre Bewegungen werden durch Kollisionen mit anderen Molekülen behindert und dadurch verlangsamt [57].

Bei der Freisetzung von Vancomycin aus den MP finden diese Kollisionen des VM vor allem mit den CaCO_3 -Nanokristallen innerhalb der Mikropartikel und den ggfs. verwendeten Biopolymeren statt.

Unter physiologischen Bedingungen und *in vivo* sind weitere regulierende Faktoren, wie Abbau des Medikaments, Gewebsabsorption und Partikelabbau, Porenbildung, osmotischer Druck, Gewebe-pH-Wert und Beweglichkeit der betroffenen Extremität, zu berücksichtigen. Dies zeigt, dass besonders im Zusammenhang mit abbaubaren Materialien, die Freisetzung stark von der physiologischen Umgebung abhängig ist [70, 71].

Für den Vergleich der Freisetzung von Vancomycin aus den unterschiedlichen Mikropartikeln wurde aus den experimentell bestimmten Daten der Diffusionskoeffizient berechnet. Er gibt an wie schnell ein Molekül in einem Volumen diffundieren kann. In dieser Arbeit handelt es sich um Vancomycin, das auf Grund des Konzentrationsgradienten zwischen den beladenen Mikropartikeln und der wässrigen Suspensionslösung durch die Partikelwände hindurch diffundiert.

Mit Hilfe des EXDIF-Programms wird auf Grundlage der experimentell bestimmten Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit, die Freisetzungskinetik von Vancomycin modelliert, wobei der Fitparameter (siehe Abbildung 24) den Diffusionskoeffizienten D unter den gegebenen Bedingungen darstellt.

Je kleiner der Diffusionskoeffizient, desto langsamer diffundiert VM aus den Partikeln heraus. Daher wurde in dieser Arbeit die Herstellung von Carriern mit niedrigen Diffusionskoeffizienten angestrebt.

Der hydrodynamische Radius eines Moleküls ist abhängig von dessen Molekulargewicht. In der Literatur wird der hydrodynamische Radius von VM mit 1,1 nm beschrieben [51]. Der hydrodynamische Durchmesser des Vancomycin-Moleküls in wässriger Lösung beträgt demnach 2,2 nm. Da die Poren in den CaCO_3 -Partikeln einen durchschnittlichen Durchmesser von 20-70 nm aufweisen [46], kann davon ausgegangen werden, dass das VM problemlos durch die Poren diffundieren kann. Aus dem hydrodynamischen Radius lässt sich mit der im Methodenteil genannten

Diskussion

Formel (Kapitel 2.5) der Diffusionskoeffizient des VM in wässriger Umgebung errechnen.

Dieser Diffusionskoeffizient entspricht der Bewegung von VM in Wasser bei Raumtemperatur und beträgt $3,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Bei 37°C beträgt er $4,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Das heißt, dass die VM-Moleküle binnen 1 s eine Strecke von der Wurzel aus $4,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ in cm zurücklegen, nämlich $0,002 \text{ cm} = 0,02 \text{ mm} = 20 \text{ nm}$ in einer Sekunde. Da die in dieser Arbeit ermittelten Werte des Diffusionskoeffizienten im Durchschnitt bei $4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ lagen, bedeutet dies, dass das VM aus den Partikeln heraus nur 2 nm/s diffundiert und der Prozess um ein 10faches langsamer abläuft. Die Partikel und deren Oberflächenmodifikation haben den Prozess der Diffusion verzögert.

Bei der Betrachtung der Diffusionskoeffizienten muss jedoch berücksichtigt werden, dass diesen zusätzlich eine Konvektion überlagert ist, da die Partikel in der Lösung bewegt wurden. Dies erklärt warum die Freisetzung von VM aus den Partikeln im Allgemeinen nur 10mal langsamer abläuft als unter regulären Diffusionsbedingungen. Im nicht gerührten Zustand sind bei weitem kleinere Werte zu erwarten.

Der Vergleich der verschiedenen Partikelsubtypen anhand des Diffusionskoeffizienten ist möglich, da die Versuchsbedingungen für alle Partikeltypen identisch waren.

Im Detail betrachtet erlangen die VM- CaCO_3 -Dextran 2-Partikel mit $2,6 \times 10^{-07} \text{ cm}^2/\text{s}$ und die VM- CaCO_3 -Dextran 1-Partikel mit $4,0 \times 10^{-07} \text{ cm}^2/\text{s}$ die niedrigsten Diffusionskoeffizienten. Dicht daran liegen die VM- CaCO_3 -HSA 1-Partikel und VM- CaCO_3 -HSA 2-Partikel mit $5,9 \times 10^{-07}$ und $5,8 \times 10^{-07}$.

Die anderen Partikeltypen liegen eine Zehnerpotenz darüber. Die VM- CaCO_3 -nP-Partikel haben mit $6,5 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{s}$ zusammen mit den VM- CaCO_3 -PV-Partikeln ($6,2 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{s}$) den höchsten Diffusionskoeffizienten. Bei letzteren führt die Lyse der Fibrinhülle durch die Enzyme Plasmin und Alteplase und die Umgebungstemperatur von 37°C (im Gegensatz zu RT) zu einer schnelleren Diffusion.

Die Tatsache, dass sich die VM- CaCO_3 -nP-Partikel und die VM- CaCO_3 -bP-Partikel im Diffusionskoeffizienten um das 6fache unterscheiden ist auffällig. Dabei handelt es sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen um einen sehr deutlichen Unterschied. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das VM, welches bei der Präzipitation anwesend ist, zu einem tieferen Einschluss in die Poren führt, so dass es im Anschluss zu einer langsameren Freisetzung kommt. Zusätzlich kann vermutet werden, dass sich auch die Struktur der MP selbst ändert, was ebenfalls zu einer Verlangsamung der VM-Freisetzung führen kann.

Tabelle 4: Übersicht der Diffusionskoeffizienten und Beladungseffizienzen der verschiedenen VM-CaCO₃-Partikelsubtypen (nP und bP beziehen sich auf die Anwesenheit von VM im Präzipitationsprozess)

Partikelsorte VM-CaCO ₃	Diffusionskoeffizient in cm ² /s	Beladungseffizienz in %
Nach Präzipitation (nP)	6,51E-06	21,1
Bei Präzipitation (bP)	1,13E-06	41,2
HSA 1	5,91E-07	10,7
HSA 2	5,75E-07	68,0
Dextran 1	4,02E-07	9,1
Dextran 2	2,61E-07	10,2
Fibrin	2,17E-06	93,3
PV	6,23E-06	90,0

4.7 Fazit der Beladung

Die verschiedenen Partikelarten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Beladungseffizienz, Verlust an VM während der Waschschriffe, Diffusionskoeffizient und Freisetzung im Langzeitversuch. Zusammenfassend wird in der Betrachtung der Qualitäten der einzelnen Partikelsorten folgendes deutlich:

Für eine effektive Beladung und einen niedrigen Diffusionskoeffizienten (Verzögerung der Freisetzung von VM) sind die VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel am besten geeignet. Die VM-CaCO₃-Fibrinpartikel nehmen zwar mehr VM auf, jedoch sind sie im Vergleich zu den VM-CaCO₃-HSA 2-Partikeln, durchlässiger.

Die VM-CaCO₃ Partikel ohne Polymere, das heißt die VM-CaCO₃-nP- und bP-Partikel, nehmen deutlich weniger VM auf, als die mit Polymeren behandelten Partikel. Ihre Diffusionskoeffizienten liegen zwar unter denen von freiem VM in Wasser, jedoch auch deutlich über denen von den VM-CaCO₃-HSA- und VM-CaCO₃-Dextranpartikeln. Daraus ergibt sich, dass die Behandlung der MP mit Polymeren von Vorteil ist.

Die Herstellung von VM-CaCO₃-Dextran 1-Partikeln kann im Vergleich dazu nicht empfohlen werden, da es bei einem ähnlichem Diffusionskoeffizienten, durch den hohen Verlust bei den Waschschriffen, zu einer geringeren Beladung kommt.

Für eine besonders lange Verzögerung der Freisetzung eignen sich die VM-CaCO₃-Dextran 2-Partikel am besten, jedoch liegt bei ihnen die Beladungseffizienz ausge-

sprochen niedrig, so dass diese Herstellung mit etwas höheren Kosten verbunden sein könnte.

Insgesamt können die unterschiedlichen Qualitäten kombiniert genutzt werden. Eine Mischung aus VM-CaCO₃-HSA 2-Partikeln, die VM langsam freisetzen und VM-CaCO₃-Fibrinpartikeln, die eine große Menge an VM immobilisieren, jedoch schnell freisetzen, führt zu einer initial hohen Konzentration an VM, die über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden kann.

Im Vergleich zu anderen abbaubaren Carriern kann man davon ausgehen, dass das Kalziumkarbonat optimal den Knochen stabilisiert. Aufgrund seiner ausgezeichneten Biokompatibilität werden die VM-CaCO₃-Partikel vollständig resorbiert, so dass es zu keiner Persistenz von Material und damit verbunden von Keimen kommt. Dadurch besitzen die Kalziumkarbonatpartikel gegenüber der mit Antibiotika beladenen Keramik einen entscheidenden Vorteil [28]. Die unkomplizierte, kostengünstige und reproduzierbare Herstellung ist ein weiterer Vorteil und zeigt, dass VM-CaCO₃-Mikropartikel ideal für eine lokale antibiotische Therapie geeignet sind [70].

4.8 Vorschläge zur Optimierung der Mikropartikel

Der angestrebte initiale Burst findet bei der Freisetzung des VM aus den VM-CaCO₃-Partikeln aufgrund des hohen Diffusionsgradienten zu Beginn statt. Eine Freisetzung von VM aus den Mikropartikeln konnte über 24h, bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der Konzentration in den MP und der sie umgebenden Lösung, beobachtet werden.

Die Freisetzung des Antibiotikums würde *in vivo* vermutlich länger, als hier *in vitro* dargestellt, ablaufen, da unter physiologischen Umständen die Medikamente abtransportiert werden und sich kein Gleichgewicht einstellen kann. Das heißt, dass Moleküle verlängert austreten bis die MP vollständig entleert und aufgelöst sind und nicht wie in den hier dargestellten Ergebnissen die Einstellung eines Gleichgewichts der Konzentrationen zwischen dem Innenraum der Partikel und der umgebenden Lösung erfolgt.

Eine weitere Optimierung und eine *in vivo* Untersuchung werden angestrebt. Die Modifizierung der Partikel könnte, abgesehen von Antibiotikakombinationen, durch eine weitere Oberflächenmodifikation wie multiple Schichten und höhere Antibiotikamengen erfolgen [21]. Die Verwendung von 1M CaCl₂- und 1M Na₂CO₃-Lösungen, an-

stelle von 0,3 M Lösungen, könnte durch eine höhere Partikeldichte bei bestehender VM-Konzentration den Beladungseffizienten deutlich erhöhen.

Auch könnte eine Lyophilisierung der Partikel direkt nach der Herstellung eine Stabilität des VM bewirken. Die gefriergetrockneten Partikel könnten in einem Gel, z.B. Fibringel appliziert werden, so dass ein Auflösen der Partikel in Gewebe und Blut verzögert ablaufen würde. Zusätzlich könnte dabei die Halbwertszeit des VM in trockenem Zustand über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden.

Die Kalziumkarbonatpartikel sollten in einer Kombination aus kleinen und großen Partikeln, zum Beispiel VM-CaCO₃-HSA 2-, VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-bP-Partikel, unterschiedlicher Zusammensetzung, abhängig vom Diffusionskoeffizienten, vorliegen. Größere Partikel für eine langsamere Freisetzung und kleinere Partikel für eine schnellere Freisetzung. Dadurch würde ein initialer Burst mit hohen Antibiotikakonzentrationen die Bakterien möglichst schnell eliminieren, aber auch eine langfristige Freisetzung gewährleistet sein. Eine Kombination unterschiedlicher Antibiotika wie zum Beispiel VM mit Daptomycin, Linezolid und Cefuroxim wäre ebenfalls möglich, wodurch das Wirkungsspektrum einschließlich für gramnegative Keime deutlich erweitert werden könnte.

Die Optimierung der MP bleibt weiteren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen vorbehalten.

4.9 Vancomycin (VM)

VM ist im Rahmen der Therapie von Knochen- und Gelenkserkrankungen mit MRSA-Besiedlung ein etabliertes Antibiotikum [6, 72, 73]. Da die Inzidenz an MRSA-

Infektionen steigt und die damit verbundenen Kosten des Gesundheitswesens erheblich sind, wurde in dieser Arbeit mit VM gearbeitet [73].

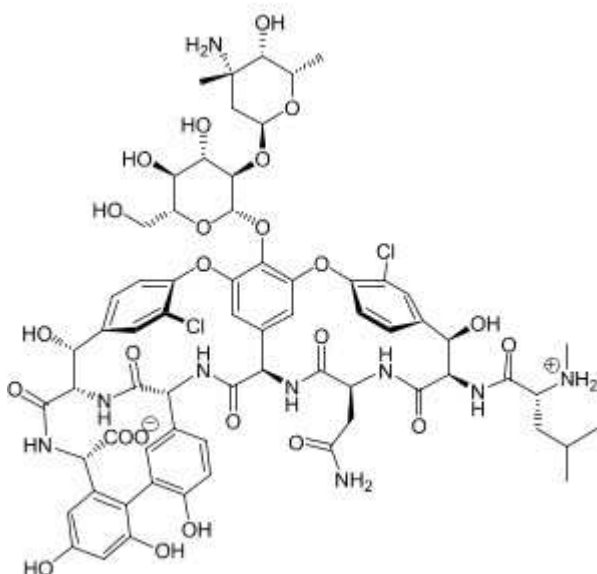


Abb. 30: Strukturmodell des Vancomycins [74].

Diskussion

Die Vor- und Nachteile dieses Antibiotikums werden an dieser Stelle genauer erläutert: Vorteilhaft am VM ist sein breites, grampositives Wirkspektrum, die ausgeprägte Wasserlöslichkeit und sein niedriges allergenes Potential [17].

VM gehört zu den Glykopeptidantibiotika (siehe Abb. 30) und führt durch Bindung einer NH_2 -Gruppe an Murein zu einer Hemmung der Zellwandsynthese der Bakterien. Vancomycinresistente Enterokokken hingegen besitzen eine D-Alanin-Ligase, die die NH_2 -Gruppe des Vancomycins in eine Hydroxylgruppe umwandelt, so dass eine Bindung an Murein nicht stattfinden kann und die Bakterien resistent gegen VM sind.

Bei systemischer VM-Applikation wird eine Konzentration von 15-35% des VM im Knochen erreicht [22]. Im Vergleich zu einer lokalen Applikation, bei welcher nahezu 100% des VMs im Knochen freigesetzt werden, ist dieser Prozentsatz relativ gering und erklärt die häufigen Nebenwirkungen bei systemischer Applikation, denn VM ist nephro- und neurotoxisch. Aufgrund der hohen Dosen, die über einen langen Zeitraum verabreicht werden müssen, um die minimale Hemmkonzentration im Knochen zu erreichen, treten Nieren- und Hörschäden häufig auf [28]. Daher ist es von enormem Vorteil, dass diese Nebenwirkungen bei einer lokalen Applikation vernachlässigt werden können. Zusätzlich besitzt VM im Gegensatz zu Cefazolin, Aminoglykosiden, Rifampicin und Quinolonen weniger negative Auswirkungen auf die Knochenregeneration [17].

VM-Lösungen besitzen sehr niedrige pH-Werte von 2,5 - 4,5 was als Nebenwirkung zu lokalen Unverträglichkeiten wie Nekrosen bei intramuskulärer Injektion oder Schleimhautirritationen führt [75]. Es ist daher von großem Vorteil, dass die VM- CaCO_3 -Partikel einen pH-Wert von 8 aufweisen und somit keine lokalen, intraossären Irritationen zu erwarten sind.

Es ist bekannt, dass Proteine am effektivsten absorbieren, wenn der pH-Wert in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes liegt, da sie in diesem Zustand keine Nettoladung besitzen. Es wird angenommen, dass bei niedrigeren oder höheren pH-Werten die gegenseitige Abstoßung der Proteine eine Absorption stören [45]. Dies trifft für diese Arbeit nicht zu, da hier die gegenseitigen Anziehungskräfte der positiv geladenen Partikel und des negativ geladenen Glykopeptids VM bei einem pH-Wert von 8 überwiegen. Die Absorption von z.B. Proteinen an die Partikel findet vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche, in den Poren und über Protein-Protein Wechselwirkungen statt [35]. Da CaCO_3 -Partikel, abhängig von der Molekülgröße aufgrund der Diffusionsbarrieren, unterschiedliche Permeabilität für Makro-

Diskussion

moleküle, aufweisen [45], ist VM mit seinem Molekulargewicht von 1,4 kD klein genug, um in die Poren hinein zu permeieren und auch wieder heraus zu diffundieren. Von Nachteil ist die Tatsache, dass VM in gelöstem Zustand nur begrenzt haltbar ist. Es zerfällt in verschiedene Teilprodukte, die dem VM noch sehr ähnlich sind, sich jedoch in einzelnen funktionellen Gruppen (Isoaspartat anstelle von Asparagin) unterscheiden und keinen antibiotischen Effekt aufweisen. Das CDP-1 (crystalline degradation product) wird beim Zerfall des VM in der HPLC als zusätzlicher „peak“ bei 280 nm sichtbar. Die Größe des „peaks“ steigt über die Zeit an und hat nach 10 Tagen die gleiche Größe wie der „VM-peak“. Dies bedeutet, dass VM gelöst in PBS bei 37°C bereits nach 10 Tagen nur noch zu 50% vorliegt und die restlichen 50% zerfallen sind. Es wurde festgestellt, dass dies in Peritonealdialysat besonders auffällig verläuft, da dort bereits nach 10 d 80% des VM zerfallen sind. Vermutlich liegt der Grund im alkalischeren pH des Peritonealdialysats. Im Serum hingegen entsprechen die Werte dem in PBS gelösten VM [28]. Allerdings beträgt der pH der mit VM beladenen Partikel 7-8 und kann dadurch die Instabilität des VM eventuell zusätzlich verstärken. Im Gegensatz dazu gibt CellPharm in der Produktbeschreibung von Vancocell 1000 mg bei einer Temperatur <25°C eine Stabilität über 96 h an. Dies entspricht dem Großteil der Beobachtungen dieser Arbeit. Im Rahmen der VM-CaCO₃-HSA 1- und VM-CaCO₃-Dextran 1-Versuche wurden bis zu 72 h nach Versuchsbeginn konstante VM-Konzentrationen gemessen. Jedoch wurde bei den VM-CaCO₃-HSA 2-, VM-CaCO₃-Dextran 2-, VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-PV-Versuchen eine Abnahme der VM-Konzentration in unterschiedlichen Anteilen beobachtet. Insbesondere bei den beiden letzteren Partikelsorten war der VM-Verlust besonders ausgeprägt. Dieser lag bei den VM-CaCO₃-Fibrinpartikeln bei 9% nach 72h/ 24% nach 144h und bei den VM-CaCO₃-PV-Partikeln bei 26% nach 72h/ 34% nach 144h. Eine mögliche Erklärung liegt in der erhöhten Temperatur von 37°C, bei der diese Versuche durchgeführt wurden. In gelöstem Zustand sollte VM nur für einen Zeitraum von nicht mehr als 4 Tagen vorgesehen bzw. dann erneut angesetzt werden.

Im pH-Bereich zwischen 3 und 5 gelten VM-Lösungen 2 Wochen lang als stabil [75]. Jedoch kann in Kombination mit den CaCO₃-Partikeln dieser pH-Wert nicht genutzt werden, da es sich in diesem Bereich nicht um physiologische pH-Werte handelt und es zu Gewebsirritationen kommen würde.

4.10 Alternative Antibiotika

Die Qualitäten eines Antibiotikums zur Osteomyelitistherapie sollten Stabilität, ein breites Wirkspektrum, bakterizide Wirkung und ein Molekulargewicht von bis 10 kDa beinhalten [5, 21].

Diese Qualitäten, abgesehen von der Stabilität, besitzt VM. Daher werden im Anschluss interessante alternative antibiotische Therapien vorgestellt.

Daptomycin zum Beispiel stellt ein neuartiges Antibiotikum dar, welches vermehrt bei Knochen- und Weichteilinfekten eingesetzt wird. Die problematischen Infektionen mit resistenten Keimen wie VRE (VM resistente Enterokokki), VRSA (VM resistente Staph.aureus), MRSA und β -hämolyisierende Streptokokken limitieren den Einsatz von VM und können stattdessen wirksam mit Daptomycin behandelt werden. Es handelt sich dabei um ein lipophiles Antibiotikum, welches auf mehreren Ebenen die Zellmembranfunktionen der Bakterien zerstört [14]. Der lipophile Schwanz dringt in die Zellmembran ein und führt durch Kaliumausstrom zu Membrandepolarisation. Es kommt zur Arretierung der Protein-, DNA- und RNA-Synthese und der Toxinproduktion, ohne zu einer Zellyse zu führen. Aufgrund dieser vielfältigen Angriffspunkte in der Bakterienzellwand ist eine schnelle Resistenzentwicklung als unwahrscheinlich anzusehen, auch wenn bereits wenige Daptomycinresistente VISA-Stämme bekannt sind. Als Ursache der Resistenzentwicklung wird eine Verdickung der Zellmembran vermutet [72].

Des weiteren ist von Vorteil, dass Daptomycin geringe Nebenwirkungen aufweist und selten zu medikamentösen Interaktionen führt, da es nicht über hepatische Enzyme wie das Cytochrom P450, metabolisiert wird, sondern ausschließlich über die Nieren ausgeschieden wird [72]. Eine *in vitro* Untersuchung von Lai et al. 2004 stellte eine Kompatibilität mit Medikamenten wie Gentamycin, Ceftriaxone, Fluconazol, Levofloxazin, Aztreonam u.v.m. fest [76]. Diese geringe Rate an Wechselwirkungen mit verschiedensten Medikamenten ist von besonderem Wert, da der Anteil an multimorbiden OM-Patienten bereits dominierend ist und dem demographischen Wandel zufolge steigen wird. Es liegen derzeit noch nicht viele klinische Erfahrungen vor und eine Therapie mit Daptomycin ist sehr teuer, jedoch wurde die Wirksamkeit in Knochen- und Gelenksinfektionen bereits nachgewiesen [72, 77].

Daptomycin besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität (92%), die im Zusammenhang mit Albuminpartikeln von Interesse sein könnte.

Diskussion

Es kann erwartet werden, dass die Diffusionskinetik aufgrund des lipophilen Charakters deutlich verzögert wird und somit eine langfristige Freisetzung erreicht werden kann. Synergetische Effekte in Kombination mit Aminoglykosiden wie Gentamycin, mit β -Laktamen und Rifampicin konnten beobachtet werden [72]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Daptomycin und Rifampicin in einer *in vivo* Studie erfolgreich zur OM-Therapie eingesetzt wurde [78]. Bislang sind keine Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika bekannt. Daher stellt sich eine Entwicklung unterschiedlicher Partikelgrößen, die verschiedene Antibiotika enthalten, als viel versprechend dar [76].

AMP (antimikrobielles Peptid) wirkt antibakteriell und fungizid, allerdings ist der Wirkmechanismus bisher noch unbekannt. Als vorteilhaft zu nennen sind seine Fähigkeiten, auch Mikrofilme zu penetrieren und die Knochenmineralisierung zu stimulieren [79]. Besonders letzteres ist im Zusammenhang mit Osteomyelitis von besonderem Interesse. Jedoch besteht ein Nachteil in der positiven Ladung des Peptids: aufgrund der gleichgerichteten Ladung könnte es zu Abstoßungsreaktionen und Schwierigkeiten bei der Beladung der Partikel kommen.

Eine Alternative könnte Linezolid darstellen, welches die Proteinsynthese hemmt, indem es an die 70S Initiationseinheit der Ribosomen bindet. Es handelt sich um ein Breitspektrumantibiotikum im grampositiven Bereich und wird bei VRE (allerdings nur bakteriostatisch), komplizierten SSSI (skin and skin structure infection), Endokarditiden und nosokomialen Pneumonien eingesetzt. In klinischen Studien konnte eine Wirksamkeit von 85% der Fälle nach 12 Wochen Therapie nachgewiesen werden. Allerdings wiesen 51,5% der Patienten Nebenwirkungen wie Anämie und teilweise irreversible periphere Neuropathien auf [72]. Weitere Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden und Myelosuppression [77].

Linezolidresistente MRSA und *Enterococcus faecium* Stämme sind bekannt aber äußerst selten [72, 80].

4.11 Behandlungskonzept mit Kalziumkarbonatpartikeln

Patienten mit der Diagnose einer exogenen Osteomyelitis sollten wie folgend behandelt werden:

1. Erregerisolierung mit Erstellung eines Antibiogramms
2. chirurgisches Debridement mit Sequestrektomie und Dekortikation
3. aseptische Wundspülung
4. Totraummanagement und lokale Antibiose mit VM-CaCO₃-Mikropartikeln
5. Wundverschluss mit ggfs. freier Lappentransplantation
6. Systemische Antibiose
7. engmaschige Kontrollen

Als erste therapeutische Maßnahme sollte, bei einer operativen Sanierung, ein chirurgisches Debridement mit Sequestrektomie und ggfs. Dekortikation erfolgen [81]. Dabei wird nekrotisches und infiziertes Gewebe abgetragen. Es ist zwingend erforderlich, bei diesem Schritt mehrere Gewebeproben zur mikrobiologischen Diagnostik zu entnehmen, damit im Anschluss mittels eines Antibiogramms eine gezielte Antibiose erfolgen kann. Das betroffene Areal muss mehrfach mit aseptischen Lösungen gespült werden, um die Keimzahl so stark wie möglich zu reduzieren.

Die aseptische Wundspülung sollte mit einem antiseptischen Detergenz (z.B. Lavamid) erfolgen. Der Vorteil liegt darin, dass das Detergenz die Bakterienzahl reduziert und für die Antibiose sensibilisiert [82]. Durch diesen Prozess wird die Wirksamkeit von Antibiotika gesteigert und die Entwicklung von Resistenzen verringert. Von weiterem Vorteil ist, dass Detergenzien Mukus, nekrotisches Gewebe und Pus auflösen, so dass die Antibiotika die Zielstrukturen besser erreichen können [82].

Im Anschluss an die Sanierung des infizierten Gebietes erfolgt das Totraummanagement. Dieses beinhaltet eine Füllung des entstandenen Knochenlumens mit antibiotisch beladenen Mikropartikeln zur Stabilisierung und Keimeradikation.

Verschiedene kleine und große Partikel, zum Beispiel VM-CaCO₃-HSA 2, VM-CaCO₃-Fibrin- und VM-CaCO₃-bP-Partikel, beladen mit Kombinationen verschiedenen Antibiotika, die dem Antibiogramm entsprechen, sollten appliziert werden. Eine initiale und langfristige Freisetzung von Antibiotikum mit breitem Wirkspektrum kann somit gewährleistet werden.

Durch den Einbau des Kalziumkarbonats in die Knochenmatrix wird diese gestärkt und ein Wachstumsanreiz gesetzt, ohne dass eine Knochenneubildung behindert würde [53]. Nach Einlage der Mikropartikel wird ein Verschluss der Wunde durchge-

Diskussion

führt. Dabei sollte ein Shunt in das Knochenlumen gelegt werden, über den in regelmäßigen Abständen eine Wundspülung und die Applikation von Mikropartikeln erfolgen könnten. Nach Beendigung der letzten Spülung und Applikation würde der Shunt gezogen werden. Alternativ zur Shunteinlage könnte eine intraossäre Injektion erfolgen. Dabei wäre von Vorteil, dass der Shunt, welcher möglicherweise eine Eintrittspforte für nosokomiale Keime darstellt, nicht notwendig wäre. Jedoch bleiben bei diesem schmerzhaften Injektionsverfahren Praktikabilität und die Compliance des Patienten fraglich.

Zusätzlich zur lokalen Therapie muss eine systemische Einnahme von Antibiotika oral oder intravenös für mindestens 6 Wochen erfolgen [5].

Im Anschluss an die Therapie müssen regelmäßig bildgebende Kontrollen erfolgen, damit eine Reaktivierung der Osteomyelitis frühzeitig erkannt werden kann. Die höchste Spezifität und Sensitivität besitzt in diesem Zusammenhang die MRT [13].

5 Zusammenfassung

Das Auftreten von Entzündungen im Knochen, einschließlich des Knochenmarks, wird als Osteomyelitis (OM) bezeichnet. Diese zu einer Chronifizierung neigende Erkrankung rezidiert häufig nach symptomfreien Intervallen. Daher ist eine gründliche Therapie, die eine Kombination aus chirurgischer und antibiotischer Therapie zur Keimsanierung beinhaltet, von großer Bedeutung.

Der häufigste Erreger der OM ist *Staphylokokkus aureus*. Aufgrund seiner hohen Wirksamkeit im grampositiven Bereich ist Vancomycin (VM) aus heutiger Sicht bei einer MRSA assoziierten Knocheninfektion das bevorzugte Therapeutikum und sein Einsatz bei steigenden MRSA-Zahlen in Deutschland von zunehmender Wichtigkeit. Für die antibiotische Therapie gehört eine gezielte Antibiose über 6 Wochen bis zu 6 Monaten zum Goldstandard.

Aktuelle Studien zeigen, dass eine zusätzliche intraossäre Applikation von Antibiotika zu längeren symptomfreien Intervallen führt. Dies wird bislang mit PMMA-Gentamycinkugeln (Polymethylmethacrylat) durchgeführt. Diese nicht resorbierbaren Ketten werden in den Knochen gelegt und geben dort das Antibiotikum Gentamycin ab. Da zur Beendigung dieser lokalen antibiotischen Therapie eine operative Entfernung der Kugeln notwendig ist, stellen resorbierbare Trägerstoffe für die antibiotische Therapie eine sehr interessante Alternative dar. Bisher untersuchten einige Studien bereits biologisch abbaubare Trägersubstanzen zur langfristigen und kontinuierlichen Freisetzung von Antibiotika im Knochen, darunter unter anderem Kalziumphosphatzement, Liposomen und Polymere aus Polylactiden. Der neue Therapieansatz in dieser Arbeit konzentrierte sich auf Kalziumkarbonat, weil es mit seiner ausgesprochen hohen Biokompatibilität, Resorbierbarkeit und seinen stabilisierenden Auswirkungen auf das Knochenwachstum eine optimale Trägersubstanz für den intraossären Einsatz bei einer OM-Behandlung darstellt. Es war Aufgabe dieser Arbeit, eine Beladung der Kalziumkarbonat-Mikropartikel (MP) mit Vancomycin und dessen Freisetzungskinetik zu untersuchen. In exemplarischen, dreifach wiederholten Versuchen wurden Kalziumkarbonat-Mikropartikel, die nach dem Schema von Volodkin et al. 2004 durch Präzipitation von CaCl_2 und Na_2CO_3 gewonnen worden waren, *in vitro* untersucht. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden während der Herstellung verschiedene Biopolymere hinzugefügt und diese teilweise anschließend vernetzt. Mittels des CLSM (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) und FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-

Zusammenfassung

markierter Moleküle konnte die Partikelmorphologie untersucht werden und ihre Fähigkeit dargestellt werden, Substanzen einzukapseln und wieder freizusetzen. Quantitative Analysen der Vancomycin-Konzentrationen erfolgten durch Photometrie und HPLC, da Vancomycin ein Absorptionsmaximum bei 282 nm besitzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kalziumkarbonat-Mikropartikel Vancomycin aufnehmen und im zeitlichen Verlauf dieses wieder freisetzen. Da sich die Partikelmorphologie durch Zugabe der Biopolymere HSA, Dextran und Fibrin erheblich veränderte, unterscheiden sich die verschiedenen Partikelsorten deutlich hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Beladungseffizienz, Verlust an Vancomycin während der Waschschriffe und Freisetzungskinetik.

Erreicht wurde ein Release von Vancomycin aus den Mikropartikeln über 24h bis sich ein Gleichgewicht der Konzentration innerhalb der MP und der sie umgebenden Lösung eingestellt hatte. Gezeigt wurde, dass eine Beladung mit Vancomycin während der Herstellung der MP, simultan zur Präzipitation, besonders effektiv ist. Im Rahmen der lokalen Antibiose bei Osteomyelitis stellen die VM-CaCO₃-HSA 2-Partikel die interessantesten modifizierten Mikropartikel dar, da sie das beste Verhältnis von hoher Beladungseffizienz und verzögerter Freisetzungskinetik aufweisen. Sie stellen eine sehr interessante Ergänzung der konventionellen antibiotischen Therapie der OM dar, da sie am Wirkungsort eine hohe Konzentration an Antibiotikum freisetzen, ohne die beträchtlichen Nebenwirkungen einer systemischen Antibiose wie u.a. Nephrotoxizität und Neurotoxizität aufzuweisen.

Zusätzlich besitzen die biologisch abbaubaren Trägersubstanzen, im Gegensatz zu den bislang eingesetzten Gentamycin-PMMA-Kugeln den Vorteil, dass keine Operation zur Entfernung des Materials notwendig wird, so dass das perioperative Risiko und die damit verbundenen Kosten entfallen. Das regenerative Knochenwachstum kann, entsprechend der physiologischen Resorption der Mikropartikel, ungehindert ablaufen.

Vorstellbar ist für die Zukunft eine intraossäre Applikation von unterschiedlichen CaCO₃-Partikeltypen, beladen mit Kombinationen verschiedener Antibiotika aus z.B. Vancomycin, Daptomycin und Linezolid für das grampositive Spektrum und Cefuroxim für die gramnegativen Keime. Durch das breite Wirkspektrum könnte eine Resistenzentwicklung verhindert werden und somit die OM kurativ behandelt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Petrone, C., et al., *Compaction strategies for modifying the drug delivery capabilities of gelled calcium polyphosphate matrices*. Acta Biomater, 2008. **4**(2): p. 403-13.
2. Amy Ladd, H.J. 2009, www.osteomyelitis.stanford.edu.
3. M. Schintler, E.-C.P., *Behandlungskonzept der Osteomyelitis*. 2005. p. 217-229.
4. Rutledge, B., et al., *Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer*. Clin Orthop Relat Res, 2003(411): p. 280-7.
5. Calhoun, J.H. and M.M. Manring, *Adult osteomyelitis*. Infect Dis Clin North Am, 2005. **19**(4): p. 765-86.
6. Cevher, E., et al., *Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with prepared microspheres*. Int J Pharm, 2006. **317**(2): p. 127-35.
7. Suttrop, N., in *Infektionskrankheiten*, Thieme Verlag. p. 436.
8. Sheftel, T.G., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis*. Clin Orthop Relat Res, 1985(198): p. 231-9.
9. Cierny, G., 3rd, J.T. Mader, and J.J. Penninck, *A clinical staging system for adult osteomyelitis*. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): p. 7-24.
10. Ursel Heudorf, R.T., *Multiresistente Keime-MRSA, MRE, VRE etc*. Hessisches Ärzteblatt, 2008. **69**(11/2008): p. 707-709.
11. Zimmerli, W. and U. Fluckiger, *[Classification and microbiology of osteomyelitis]*. Orthopade, 2004. **33**(3): p. 267-72.
12. Cierny, G., 3rd, *Chronic osteomyelitis: results of treatment*. Instr Course Lect, 1990. **39**: p. 495-508.
13. Howard, C.B., et al., *Fine-needle bone biopsy to diagnose osteomyelitis*. J Bone Joint Surg Br, 1994. **76**(2): p. 311-4.
14. Turk, E.E., M. Tsokos, and G. Delling, *Autopsy-based assessment of extent and type of osteomyelitis in advanced-grade sacral decubitus ulcers: a histopathologic study*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(12): p. 1599-602.
15. Karchevsky, M., et al., *MRI findings of septic arthritis and associated osteomyelitis in adults*. AJR Am J Roentgenol, 2004. **182**(1): p. 119-22.

Literaturverzeichnis

16. Gold, R.H., R.A. Hawkins, and R.D. Katz, *Bacterial osteomyelitis: findings on plain radiography, CT, MR, and scintigraphy*. AJR Am J Roentgenol, 1991. **157**(2): p. 365-70.
17. Kinik, H. and M. Karaduman, *Ciorny-Mader Type III chronic osteomyelitis: the results of patients treated with debridement, irrigation, vancomycin beads and systemic antibiotics*. Int Orthop, 2008. **32**(4): p. 551-8.
18. Mousset, B., et al., *Biodegradable implants for potential use in bone infection. An in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate*. Int Orthop, 1995. **19**(3): p. 157-61.
19. Janata, O., *Knocheninfektionen-Übersicht. Symposium: Grampositive Infektionen - eine Herausforderung für Mikrobiologie und Klinik*. 2000.
20. Mendel, V., et al., *Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats*. Arch Orthop Trauma Surg, 2005. **125**(6): p. 363-8.
21. Liu, S.J., et al., *In vitro elution of vancomycin from biodegradable beads*. J Biomed Mater Res, 1999. **48**(5): p. 613-20.
22. Giavaresi, G., et al., *Preliminary investigations on a new gentamicin and vancomycin-coated PMMA nail for the treatment of bone and intramedullary infections: An experimental study in the rabbit*. J Orthop Res, 2008. **26**(6): p. 785-92.
23. Schuz, W., H.G. Haas, and K. Klemm, *[Closure of soft tissue defects in bone infections using free and pedicled muscle flaps]*. Unfallchirurgie, 1987. **13**(3): p. 163-73.
24. Perry, C.R., K. Davenport, and M.K. Vossen, *Local delivery of antibiotics via an implantable pump in the treatment of osteomyelitis*. Clin Orthop Relat Res, 1988(226): p. 222-30.
25. Neut, D., et al., *Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(6): p. 885-91.
26. Horowitz, S.M., et al., *Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury*. J Orthop Res, 1991. **9**(3): p. 406-13.
27. Hoff, S.F., R.H. Fitzgerald, Jr., and P.J. Kelly, *The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement*. J Bone Joint Surg Am, 1981. **63**(5): p. 798-804.
28. White, L.O., et al., *The in-vitro degradation at 37 degrees C of vancomycin in serum, CAPD fluid and phosphate-buffered saline*. J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(5): p. 739-45.

Literaturverzeichnis

29. U. Flückiger, W.Z., *Verlaufsformen und Mikrobiologie der bakteriellen Osteomyelitis*. Der Orthopäde, 2004. **33**: p. 267-272.
30. Kawanabe, K., et al., *Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(3): p. 527-30.
31. Korkusuz, F., et al., *Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites*. J Bone Joint Surg Br, 1993. **75**(1): p. 111-4.
32. Sasaki, T., et al., *In vitro elution of vancomycin from calcium phosphate cement*. J Arthroplasty, 2005. **20**(8): p. 1055-9.
33. Hendricks, K.J., et al., *Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model*. Clin Orthop Relat Res, 2001(392): p. 418-26.
34. Miyai, T., et al., *Antibiotic-loaded poly-epsilon-caprolactone and porous beta-tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis*. Biomaterials, 2008. **29**(3): p. 350-8.
35. Gleb B.Sukhorukov, D.V.V., Anja M. Günther, Alexander I. Petrov, Dinesh B. Shenoy and Helmuth Möhwald, *Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**: p. 2073-2081.
36. Wei, W., et al., *Preparation of hierarchical hollow CaCO₃ particles and the application as anticancer drug carrier*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(47): p. 15808-10.
37. Petrov, A.I., D.V. Volodkin, and G.B. Sukhorukov, *Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(3): p. 918-25.
38. Pruss, A., et al., *Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants--a reliable sterilization method*. Ann Transplant, 2003. **8**(2): p. 34-42.
39. Hitachi, *Spektrophotometer K2800 Users Guide*.
40. Packard, H., *Mein persönliches Handbuch. HPLC in der Laborpraxis*. 2001.
41. Favetta, P., et al., *New sensitive assay of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **751**(2): p. 377-82.
42. Jehl, F., et al., *Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **27**(4): p. 503-7.
43. Farin, D., et al., *A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX)*. J Pharm Biomed Anal, 1998. **18**(3): p. 367-72.

Literaturverzeichnis

44. Zeiss, F.C., *Operating Manual: Introduction to Laser Scanning Microscopy. Chapter 3*: p. 1-10.
45. Volodkin, D.V., N.I. Larionova, and G.B. Sukhorukov, *Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating*. *Biomacromolecules*, 2004. **5**(5): p. 1962-72.
46. Volodkin, D.V., et al., *Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation*. *Langmuir*, 2004. **20**(8): p. 3398-406.
47. Lihme, A., Otto, Fog, *Wasserlösliche Reagenzien und Konjugate auf Polymerbasis, die vom Divinylsulfon abgeleitete Reste enthalten.*, in *Immunodex K/S, Glostrup, DK*. 1992, Samson-Himmelstjerna: DK.
48. Thomas, L., *Labor und Diagnose*, in *Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, TH-Books, Editor. 2005, TH-Books-Verlagsgesellschaft: Frankfurt/Main. p. 801-804.
49. Philibert, J., *One and a Half Century of Diffusion: Fick, Einstein, before and beyond*. *diffusion.fundamentals*, 2005. **2 (2005)**(1.1-1.10).
50. Schmidt, L., Thews, *Kapitel 32 Lungenatmung*, in *Physiologie des Menschen*. 2005, Springer Medizin Verlag: Heidelberg. p. 759.
51. Loll, P.J., et al., *Vancomycin forms ligand-mediated supramolecular complexes*. *J Mol Biol*, 2009. **385**(1): p. 200-11.
52. Gesundheit, B.f., *Berechnungsprogramm zum Bestimmen von Diffusionskonstanten mit Daten aus Experimenten*, Schweizerische Eidgenossenschaft.
53. Schmidmaier, G., et al., *Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review*. *Injury*, 2006. **37 Suppl 2**: p. S105-12.
54. Caruthers, S.D., S.A. Wickline, and G.M. Lanza, *Nanotechnological applications in medicine*. *Curr Opin Biotechnol*, 2007. **18**(1): p. 26-30.
55. Kulak, A.N., et al., *Continuous structural evolution of calcium carbonate particles: a unifying model of copolymer-mediated crystallization*. *J Am Chem Soc*, 2007. **129**(12): p. 3729-36.
56. Hill, J., J. Orr, and N. Dunne, *In vitro study investigating the mechanical properties of acrylic bone cement containing calcium carbonate nanoparticles*. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. **19**(11): p. 3327-33.
57. Jost, W., *Fundamental Aspects of Diffusion Processes*. *Angewandte Chemie International Edition*, 1964. **3**(11): p. 713-768.
58. Xie, A., Y. Shen, and J. Mao, *[Influence of calcium carbonate on the microstructure of bovine serum albumin]*. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 2001. **21**(3): p. 347-9.

Literaturverzeichnis

59. Gelamo, E.L., et al., *Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1594**(1): p. 84-99.
60. Everse, S.J., et al., *Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands*. Biochemistry, 1998. **37**(24): p. 8637-42.
61. Norris, L.A., *Blood coagulation*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2003. **17**(3): p. 369-83.
62. Le Nihouannen, D., et al., *Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(2): p. 225-35.
63. Tsourvakas, S., et al., *Pharmacokinetic study of fibrin clot-ciprofloxacin complex: an in vitro and in vivo experimental investigation*. Arch Orthop Trauma Surg, 1995. **114**(5): p. 295-7.
64. Geer, D.J., D.D. Swartz, and S.T. Andreadis, *Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration*. Tissue Eng, 2002. **8**(5): p. 787-98.
65. Dvorak, H.F., et al., *Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing*. Lab Invest, 1987. **57**(6): p. 673-86.
66. Albala, D.M., *Fibrin sealants in clinical practice*. Cardiovasc Surg, 2003. **11 Suppl 1**: p. 5-11.
67. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, *New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(1): p. 4-13
68. pharmacosmos, *Dextran Properties*. 2009, www.dextran.net.
69. Shen, Q., et al., *Properties of amorphous calcium carbonate and the template action of vaterite spheres*. J Phys Chem B, 2006. **110**(7): p. 2994-3000.
70. Arifin, D.Y., L.Y. Lee, and C.H. Wang, *Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(12-13): p. 1274-325.
71. Bertazzoni Minelli, E., et al., *Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty*. J Antimicrob Chemother, 2004. **53**(2): p. 329-34.
72. Rice, D.A. and L. Mendez-Vigo, *Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature*. Arch Orthop Trauma Surg, 2008.
73. Beibei, L., et al., *Linezolid versus vancomycin for the treatment of Gram-positive bacterial infections: meta-analysis of randomised controlled trials*. Int J Antimicrob Agents, 2009.

Literaturverzeichnis

74. Deplanque, R., *FIZ Fachinformationszentrum Chemie Berlin Chemgapedia*. 2009, www.chamgapedia.de.
75. Apothekerverbände, A.-B.D., *Neues Rezeptur-Formularium Vancomycin*. Go-
vi-Verlag Pharmazie, 2007.
76. Lai, J.J. and S.K. Brodeur, *Physical and chemical compatibility of daptomycin
with nine medications*. *Ann Pharmacother*, 2004. **38**(10): p. 1612-6.
77. Linden, P.K., *Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE)*.
Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(6): p. 632-45.
78. Steenbergen, J.N., J.F. Mohr, and G.M. Thorne, *Effects of daptomycin in
combination with other antimicrobial agents: a review of in vitro and animal
model studies*. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **64**(6): p. 1130-8.
79. Stallmann, H.P., et al., *In vivo release of the antimicrobial peptide hLF1-11
from calcium phosphate cement*. *J Orthop Res*, 2008. **26**(4): p. 531-8.
80. Rayner, C.R., et al., *Linezolid in the treatment of osteomyelitis: results of com-
passionate use experience*. *Infection*, 2004. **32**(1): p. 8-14.
81. Esposito, S., et al., *Italian Guidelines for the Diagnosis and Infectious Disease
Management of Osteomyelitis and Prosthetic Joint Infections in Adults*. *Infec-
tion*, 2009.
82. Compere, E.L., W.I. Metzger, and R.N. Mitra, *The treatment of pyogenic bone
and joint infections by closed irrigation (circulation) with a non-toxic detergent
and one or more antibiotics*. *J Bone Joint Surg Am*, 1967. **49**(4): p. 614-24.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Stephanie Hoessrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Herstellung und Charakterisierung von Kalziumkarbonat-Mikropartikeln als Drugcarrier für eine lokale antibiotische Therapie der Osteomyelitis mit Vancomycin – eine *in vitro* Studie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Hans Bäumlner, möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die große Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Radostina Georgieva, die mir bei Fragen zu Laborpraxis und Theorie stets tatkräftig zur Seite stand.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern, Herrn Wolfgang Hoessrich und Frau Dr. med. Anne-Françoise Hoessrich. Sie haben mein Studium ermöglicht und auf vielfältigste Weise Anteil an dieser Arbeit.

