

Abschlussbericht

Entwicklung eines Freisetzungssystems für antimikrobielle Substanzen auf der Basis eines autologen Plasmaclots

FR199: Antimikrobielle Plasmaclots

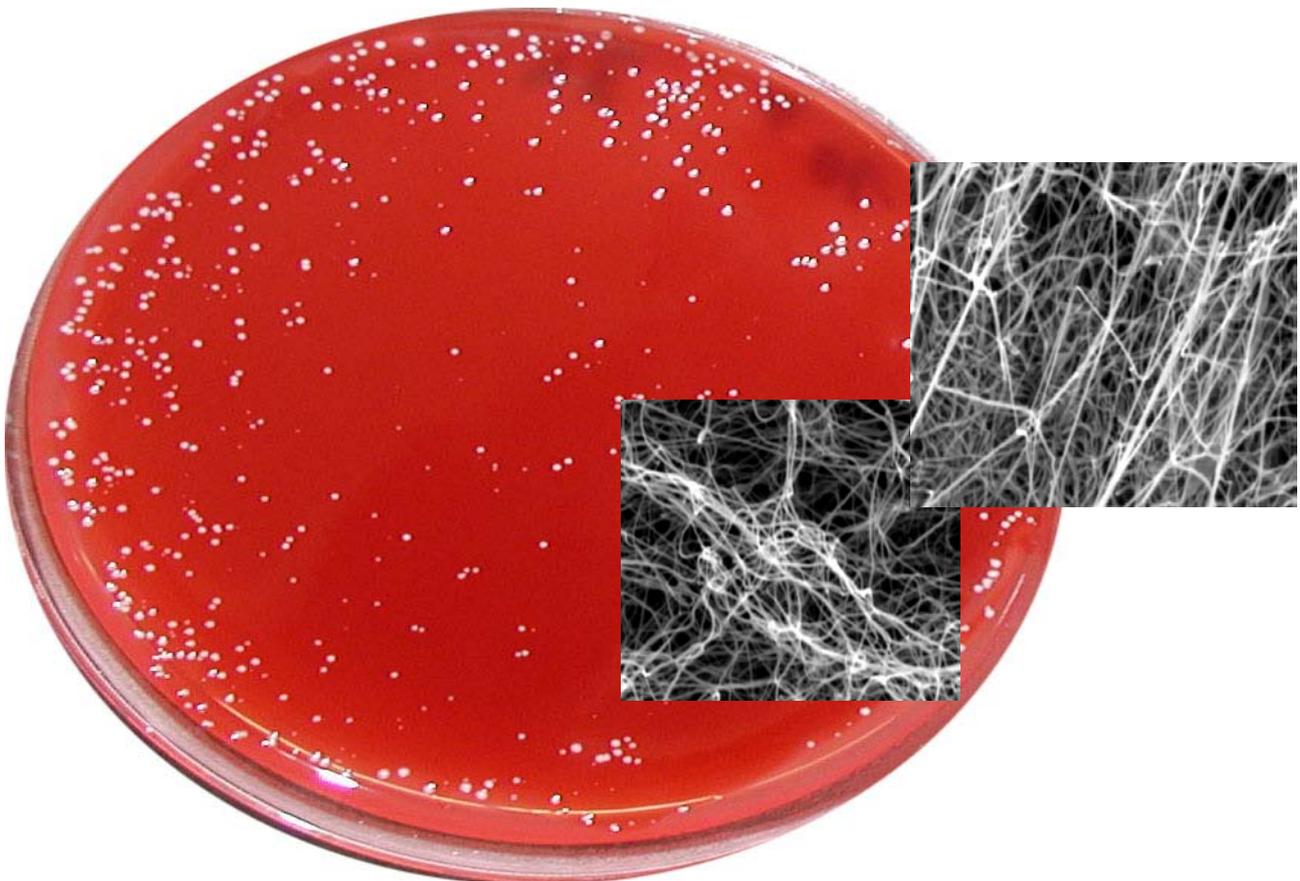
Antragsteller:

Dr. med. Jan Geßmann
Prof. Dr. med. Thomas A. Schildhauer

Chirurgische Klinik und Poliklinik
BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

Tel.: 0234/302-3425
Fax: 0234/302-4734

jan.gessmann@bergmannsheil.de
chirurgie@bergmannsheil.de



1. Titel und Laufzeit des Vorhabens

„Entwicklung eines Freisetzungssystems für antimikrobielle Substanzen auf der Basis eines autologen Plasmaclots.“

Beginn des Forschungsvorhabens: 01.04.12

Abschluss des Forschungsvorhabens: 30.03.14

2. Problemstellung

Die Infektion des Knochens (Osteomyelitis) ist eine gefürchtete Komplikation in der Unfallchirurgie und Orthopädie. Die Infektionsrate bei primär aseptischen Eingriffen am muskuloskeletalen System liegt bei 0,5-6%. Bei Unfallverletzten mit offenen Brüchen und damit einhergehender Kontamination, Gefäßverletzungen und Weichteilschäden steigt die Infektionsrate auf 2,5-12 % und höher [Dougherty et al. 1982]. Die aktuellen Eckpfeiler der Behandlung umfassen das radikale, chirurgische Debridement mit Resektion des infizierten Knochens und Weichteilgewebes, adäquater Weichteildeckung und einer begleitenden, systemischen Langzeitantibiose. Trotz vieler Fortschritte der chirurgischen und antibiotischen Therapie bleibt die Behandlung der Osteomyelitis aufwendig und kostenintensiv bei weiterhin unbefriedigenden Heilungs- und Rezidivraten. Auch bei radikalem Debridement und Resektion des gesamten nekrotischen Gewebes muss das Knochenbett als potentiell infiziert gelten. Systemisch applizierte Antibiotika erreichen in den infizierten, schlecht durchbluteten Regionen nur niedrige Konzentrationen. Höhere Konzentrationen lassen sich ohne die systemischen Nebenwirkungen der parenteralen oder oralen Gabe durch lokale Applikation der Antibiotika erreichen. Um das Antibiotikum an die Infektregion zu bringen, bedarf es Trägermedien, die im Idealfall eine ausreichend hohe, lokale Konzentration des Antibiotikums (>MHK) über einen ausreichenden Zeitraum abgeben. Allerdings darf das freigesetzte Antibiotikum nicht für Gewebe – oder Zellen wie Osteoblasten - zytotoxische Konzentrationen erreichen, da somit die knöcherne Heilung gehemmt wird [Holtom et al. 2000, Huddleston et al. 2000, Isefuku et al. 2003, Miclau et al. 1998, Perry et al. 2003]. Des Weiteren muss eine gute Handhabung und Formbarkeit des Trägermediums vorhanden sein, um dem Chirurgen eine gute Anmodellierung in die Defektzone bzw. auch in den Knochenmarkraum zu ermöglichen.

Unter den verschiedenen Transportmedien gilt mit Antibiotika beladener Knochenzement (PMMA = Polymethylmethacrylat) derzeit als Goldstandard für die antibiotische Lokalbehandlung einer Osteomyelitis [Nelson 2004]. Meist wird der Knochenzement in Form von kommerziell erhältlichen Ketten oder in intraoperativ geformten Platzhaltern lokal eingebracht. Auch bei diesem Standard- Therapieverfahren ist die Sanierungsrate noch unbefriedigend. Rezidivraten bis zu 50 % sind beschrieben [Cho et al. 1997]. In seltenen

Fällen kann es sogar zu einem gegenteiligen Effekt wie einer PMMA-Ketten-assoziierten Infektion kommen [Neut et al. 2001]. Die Ursache hierfür liegt in dem sich ausbildenden Biofilm an der Oberfläche des Knochenzementes, der - wie bei einer Osteosynthese bedingten Infektion - eine bakterielle Persistenz fördern kann. Dann müssen die Ketten bzw. der Platzhalter in einem erneuten operativen Eingriff wieder entfernt werden.

Auch wenn durch das Behandlungskonzept eine Infekteradikation erreicht werden kann, bleibt in den meisten Fällen das Problem der knöchernen Heilung. Das radikale Debridement hinterlässt zwangsläufig deperiostierten, avitalen Knochen oder - je nach initialem Lokalbefund - größere Defekte, die eine Knochentransplantation oder anderweitige Rekonstruktion durch Folgeeingriffe erfordern. Hierbei kommen beispielsweise autologe Spongiosaplastiken/Knochenspanentnahmen, allogene Knochentransplantationen oder Segmenttransporte (Distractionsosteogenese n. Ilizarov) zur Anwendung. All diese Verfahren – insbesondere der Segmenttransport - sind aufwendig und mit langen und nicht selten komplikationsreichen Heilverläufen verbunden.

3. Forschungszweck/-ziel

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von wirkstoffbeladenen autologen Plasmaclots für eine Deposition und Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen (Vancomycin, Gentamicin, Linezolid, Nanosilber, Silberionen) im Bereich von Knochendefekten. Diese Clots sollen sowohl zur Prävention als auch zur Behandlung von infizierten Knochendefekten Verwendung finden.

Systematische Untersuchungen zum Einfluss der Wirkstoffbeladung auf die Eigenschaften der Plasmaclot-Matrix und die Wirkstofffreisetzung aus den Clots sollten erfolgen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der beladenen Clots kamen sowohl analytische Messmethoden als auch mikrobiologische Methoden zum Einsatz.

4. Methodik mit schematischer Darstellung der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe

4.1 Geplante Arbeits- und Zeitabläufe

Folgende Arbeitsschritte waren zu Projektbeginn vorgesehen:

1. Optimierung der Wirkstoffinkorporierung
 - Einstellung der Vernetzungsdichte durch Variation der Calciumkonzentration
 - Bestimmung der Wirkstoff-Grenzkonzentration
 - Clot-Analyse: makroskopisch, licht- und rasterelektronenmikroskopisch
Auswertung der REM-Bilder mit digitaler Bildanalyse

2. Untersuchungen zum Einfluss der antimikrobiellen Wirkstoffe auf das Degradationsverhalten
3. Freisetzungskinetik der Wirkstoffe
 - Quantitative Messung der Antibiotikafreisetzung mittels HPLC
 - Quantitative Messung der Silberionenfreisetzung mittels AAS
4. Mikrobiologische Untersuchungsmethoden
 - Bakterien-Adhäsionstest
 - Viabilitätstest des Testkeims auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots
 - REM-Aufnahmen des Testkeims auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots
 - Agardiffusionstest
 - Makrodilution
5. Analyse und Auswertung der Untersuchungen
 - Verdatung der Ergebnisse
 - Statistische Auswertung der Ergebnisse
 - Graphische Darstellung der Ergebnisse
6. Zwischenbericht bzw. Abschlussbericht zu den Entwicklungsschritten und den Ergebnissen des Projektes.

In Tabelle 1 ist der initial geplante Zeitablauf der Arbeitsschritte dargestellt.

Tab. 1: Geplanter Zeitablauf der Arbeitsschritte.

Arbeitsschritte laut Antrag	1. Jahr												2. Jahr											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Meilenstein 1: Optimierung der Wirkstoffinkorporierung	■	■	■																					
Einstellung der Vernetzungsdichte durch Variation der Calciumkonzentration	■	■																						
Bestimmung der Grenzkonzentration für jeden Wirkstoff		■	■																					
Clot-Analyse: makroskopisch, licht- und rasterelektronen-mikroskopisch	■	■	■																					
Meilenstein 2: Einfluss der Wirkstoffe auf das Degradationsverhalten				■	■																			
Untersuchung des Abbauverhaltens der Clots mit inkorporiertem Wirkstoff in RPMI über einen Zeitraum von 14 Tagen				■	■																			
Clot-Analyse: makroskopisch, licht- und rasterelektronenmikroskopisch				■	■																			
Auswertung der REM-Bilder mit digitaler Bildverarbeitung				■	■	■																		
Meilenstein 3: Freisetzungskinetik der Antibiotika, Silberionen						■	■	■	■															
Herstellung von Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen zur Untersuchung der Freisetzungskinetik						■	■	■																
Quantitative Messung der Antibiotikafreisetzung mittels HPLC							■	■																
Quantitative Messung der Silberionenfreisetzung mittels AAS								■	■															
Meilenstein 4: Mikrobiologische Untersuchungsmethoden										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Bakterienadhäsionstest										■	■	■												
Viabilitätstest des Testkeims auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots											■	■												
REM-Aufnahmen des Testkeims auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots												■	■											
Auswertung der REM-Bilder mit digitaler Bildverarbeitung													■	■	■	■								
Agardiffusionstest														■	■	■								
Makrodilution															■	■	■							
Meilenstein 5: Analyse und Auswertung der Untersuchungen																					■	■	■	
Verdatung der Ergebnisse																					■			
Statistische Auswertung der Ergebnisse																						■		
Graphische Darstellung der Ergebnisse																							■	
Meilenstein 6: Zwischenbericht												■												

4.2 Tatsächliche Arbeits- und Zeitabläufe

Die in Abschnitt 4.1 erläuterten geplanten Arbeitsschritte konnten im Verlauf des Projektes verwirklicht werden. Es wurden dazu noch weitere erforderliche Untersuchungen ergänzt:

- Gentamicin-Messung mittels DXC-Analytik
- Keim-Adhärenztest.
- Modifizierter Agardiffusionstest
- Keimviabilität im Clot mit PVP-Ag-Nanopartikeln bzw. Silberionen
- Toxizitätstestung: Zellviabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Plasmaclot mit unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen
- Toxizitätstest: Ko-Inkubation von MSC mit Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen.

Versuchsänderungen:

Die ursprünglich geplante Methode der Makrodilution wurde aktuell durch die Mikrodilution ersetzt. Die Makrodilution wird vorwiegend mit Volumina von 3-5ml in Reagenzgläsern durchgeführt, während bei der Mikrodilution deutlich kleinere Volumina (50-200µl) in Mikrotiterplatten eingesetzt werden können. Nach Durchführung beider Testungen wurden die gleichen Ergebnisse für die minimale Hemmkonzentration (MHK) erzielt.

4.3 Verwendete Methoden

4.3.1 Optimierung der Plasmaclot-Zusammensetzung und der Wirkstoffinkorporation

Bei der Entwicklung der Plasmaclot-Matrices zur kontrollierten Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen wurden verschiedene Clot-Kombinationen getestet, die sich hinsichtlich des Plasmaanteils, der Plasmaverdünnung und der zugegebenen Calciumkonzentration zur Polymerisation unterschieden. Durch Variation des Plasmaanteils und der Calcium-Konzentration für den Polymerisierungsprozess sollte die Stabilität sowie die Vernetzungsdichte der Clots gesteuert werden. Da die Vernetzungsdichte möglicherweise die Diffusion der Wirkstoffe beeinflusst, wurde in den ersten Schritten die Auswirkung von unterschiedlichen Plasmavolumen bzw. Calcium-Konzentrationen untersucht.

In Abhängigkeit von diesen variablen Parametern wurden die resultierenden Plasmaclots systematisch analysiert und ausgewertet.

4.3.1.1 Variation des Plasmaanteils

Zur Herstellung der Plasmaclot-Matrices kamen verschiedene Clot-Kombinationen zum Einsatz, die sich hinsichtlich des zugegebenen Plasmaanteils und der Lösungen zur Plasmaverdünnung unterschieden. Der Plasmaanteil variierte dabei von 50%-100%. Die für die Plasmaverdünnungen eingesetzten Diluenten (Ringer-Acetat-Lösung, Aqua ad

injectabilia, 0,9% NaCl) sind alle bereits zur klinischen Anwendung freigegeben. Tabelle 2 zeigt die unterschiedlichen Plasmaclot-Zusammensetzungen.

Tab. 2: Plasmaclot-Kombinationen, die verwendet wurden.

Plasmaanteil	Verdünnung mit Ringer-Acetat-Lsg.	Verdünnung mit Aqua ad injectabilia	Verdünnung mit NaCl (0,9%)
50%	50%		
50%		50%	
50%			50%
75%	25%		
100%			

4.3.1.2 Variation der Vernetzungsdichte

Zur Polymerisation der wirkstoffbeladenen Clots wurden zusätzlich unterschiedliche Calciumkonzentrationen getestet (1%-10% vom Plasmaanteil).

4.3.1.3 Einfluss des Plasmaanteils auf die Clot-Abpressflüssigkeit

Nach der Clot-Polymerisation bleibt ein Anteil des Clotgemisches flüssig. Dieser verbleibende flüssige Clotanteil wurde nach der Polymerisationszeit von 90 min mittels 1ml-Pipette gemessen und dokumentiert.

4.3.1.4 Antimikrobielle Substanzen

Plasmaclots wurden mit fünf unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen beladen: Vancomycin, Gentamicin, Linezolid, Silber-Ionen und PVP-Silber-Nanopartikel.

Die Wirkstoffe wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit einem einheitlichen Volumen von 50µl/ml Clotgemisch zugegeben. Die Endkonzentrationen der drei eingesetzten Antibiotika betragen 300µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 10µg/ml und 5µg/ml. Silberacetat – als Kontrolle für Silber-Nanopartikel - wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 500µg/ml, 400µg/ml, 300µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 10µg/ml und 5µg/ml. Die PVP-Silber-Nanopartikel-Konzentrationen betragen 80µg/ml, 50µg/ml, 40µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml und 5µg/ml.

Zu jedem Wirkstoff wurde die maximale Wirkstoff-Beladung der Clots getestet.

4.3.1.5 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Clotstruktur

Um auch Auswirkungen des Plasmaanteils und der Wirkstoffbeladung auf die Plasmaclot-Architektur (Fibrinfasern) detektieren zu können, wurden die Clots mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert.

Probenaufarbeitung:

Die Plasmaclots wurden zweimal in PBS gewaschen und danach in 5%igem Glutaraldehyd (verdünnt in PBS) für 24h bei 4°C im Kühlschrank fixiert. Im folgenden Schritt wurden die Clots in Aqua dest. gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%) dehydriert. Anschließend wurden die Proben in einen Netz-Probenhalter transferiert und bis zum Einbau in den Critical-Point-Trockner (K850, EMITECH) in 100%igem Ethanol belassen. Das Prinzip dieses Trocknungssystems beruht auf dem Austausch des 100%igen Ethanols aus den Proben durch flüssiges CO₂ bei niedriger Temperatur, welches dann unter Druck erwärmt und verdampft wird. Durch den Übergang des CO₂ von der flüssigen in die gasförmige Phase wurde den Plasmaclots jegliche Feuchtigkeit entzogen.

Im folgenden Schritt wurden die getrockneten Clots mit leitfähigen Klebetabs auf gestielte Aluminium-Probenteller fixiert und abschließend mit einer Gold-Palladium-Schicht von 12,5nm Dicke besputtert. Alle rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am DSM 962 (Zeiss) durchgeführt. Von jedem Clot entstanden mehrere Aufnahmen mit 3000-facher und 5000-facher Vergrößerung.

In den resultierenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die mittlere Clot-Faserdicke aus einer Vielzahl an Messungen ermittelt. Hierfür wurde zunächst eine Maske mit fünf definierten Flächen (10µm²) an fixierten Positionen erstellt, die auf jede REM-Aufnahme gelegt wurde (Abb. 1). Die Dicke von 10 unterschiedlichen Fibrinfasern wurde in jeder Fläche (50 Fasern / REM-Aufnahme) mit Hilfe der Software ImageJ 1.37 (National Institute of Health, USA) gemessen.

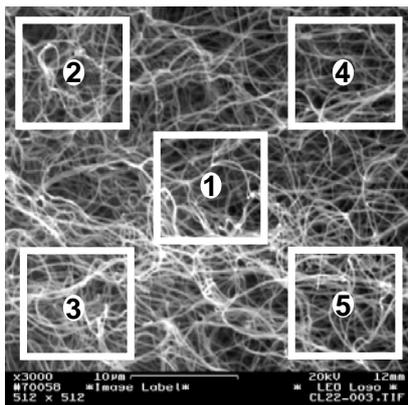


Abb. 1: Für die Messung der Clot-Faserdicken wurde eine Maske mit fünf definierten Flächen an fixierten Positionen digital auf jede REM-Aufnahme gelegt.

4.3.1.6 Einfluss der antimikrobiellen Substanzen auf das Degradationsverhalten von Plasmaclots

Da die Wirkstoffbeladung die Degradation der Plasmaclots beeinflussen könnte, wurde das Abbauverhalten der Clots mit inkorporierten antimikrobiellen Substanzen in RPMI im

Vergleich zu Kontrollclots ohne Wirkstoff über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht und danach visuell und lichtmikroskopisch beurteilt.

4.3.2 Wirkstoff-Freisetzung aus den Plasmaclots

4.3.2.1 Antibiotika-Freisetzungskinetik mittels statischer Elution

Plasmaclots mit/ohne Antibiotika wurden mit einem Volumen von 300µl in Wells einer 96-Well Platte hergestellt. Nach einer Koagulationszeit von 90 min wurden die Clots in 200µl Aqua inieciabilia transferiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d wurden die Clots entfernt und erneut in frischem Elutionsmedium inkubiert. Die Antibiotikakonzentrationen wurden mittels HPLC-Analytik für den jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bestimmt. Zusätzlich wurden die Antibiotikakonzentrationen der Abpressflüssigkeit analysiert.

4.3.2.2 Quantitative Messung der Antibiotika-Freisetzung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die HPLC ist ein Chromatographie-Verfahren, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird.

Die HPLC-Analytik ermöglichte die quantitative Messung der Freisetzung von den eingesetzten Antibiotika aus dem Plasmaclot in Aqua inieciabilia.

Die Analytik erfolgte an einer HPLC-Anlage von WATERS mit folgender Ausstattung:

- Separation Module: Waters 2690 Alliance
- Säule: WATERS x-Select (3µm, reversed-phase)
- WATERS Dual λ Absorbance Detector
- WATERS Fluoreszenz-Detektor 2475
- WATERS-Software: Empower 5.

Für Linezolid- und Vancomycin-Eluate wurde der UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 254 nm (Linezolid) bzw. 210 nm (Vancomycin) und für Gentamicin-Eluate der Fluoreszenz-Detektor mit einer Wellenlänge von 328 nm eingesetzt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form eines Chromatogrammes, das die Menge des eluierten Antibiotikums aus dem Plasmaclot in Abhängigkeit von der Zeit darstellte. Die Berechnung der resultierenden Chromatogramme erfolgte über die Peak-Fläche. Zusätzlich wurde zu jeder Messung eine Eichkurve mit der jeweiligen Antibiotikum-Standardlösung mitanalysiert. Die Eichkurven wurden als lineare Regression kalkuliert.

Eine ausführliche Beschreibung der HPLC-Parameter befindet sich in Anhang III.

4.3.2.3 Quantitative Messung der Gentamicin-Freisetzung mittels DXC-Analytik

Eine quantitative Messung der Gentamicin-Freisetzung aus den Plasmaclots mit dem klinisch-chemischen Analysensystem DXC (Beckman Coulter) wurde im Routinelabor des Bergmannsheils durchgeführt.

4.3.2.4 Silberionen- Freisetzungskinetik mittels statischer Elution

Plasmaclots mit/ohne Silberacetat bzw. Silber-Nanopartikel wurden mit einem Volumen von 300µl in Wells einer 96-Well Platte hergestellt. Nach einer Koagulationszeit von 90 min wurden die Clots in 200µl Aqua ad injectabilia transferiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h bzw. 1d, 2d, 3d, 4d, 7d, 8d, 9d wurden die Clots entfernt und erneut in frischem Elutionsmedium inkubiert.

4.3.2.5 Quantitative Messung der Silberkonzentration mittels AAS (Atomabsorptionsspektroskopie) im Eluat

Nach Freisetzung von Silberionen aus den unterschiedlichen Plasmaclots in Aqua ad injectabilia wurde der Silbergehalt mittels AAS-Analytik quantitativ gemessen. Der Silbergehalt wurde dabei nur für Ag-Acetat- bzw. Ag-NP-haltige Plasmaclots mit der höchsten Silber-Ausgangskonzentration von 66,8µg/ml bestimmt. Die Messungen wurden am IPA Bochum in der Abteilung Toxikologie durchgeführt.

4.3.3 Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der wirkstoffbeladenen Clots kamen mikrobiologische Untersuchungsmethoden mit Staphylococcus aureus Kulturen (ATCC 25923) zum Einsatz.

4.3.3.1 Bakterien-Adhäsionstest

Plasmaclots wurden mit unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen mit einem Ausgangsvolumen von 300µl in Wells einer 96-Loch-Platte hergestellt und nach einer Polymerisationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank vorsichtig mit einem Skalpell vom Wellrand abgelöst. Anschließend wurden die Clots in eine Bakteriensuspension von 5×10^6 Keimen gegeben und für 1h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS, wurden die Clots in Wells einer 48-Well-Platte mit 1ml RPMI / 10% FCS transferiert und für weitere 18h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Clots bzw. 100µl Clot-Überstand auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und für 18h inkubiert (Abb. 2). Zur Qualitätssicherung wurden bei jedem Testdurchgang eine Positivkontrolle zur Überprüfung der eingesetzten Bakterienkonzentration sowie eine Negativkontrolle, die eine eventuelle Verunreinigung des Ausgangsmediums (RPMI/FCS) anzeigen sollte, mitgeführt.

Abschließend wurden die Blutagarplatten photographiert und ausgewertet.

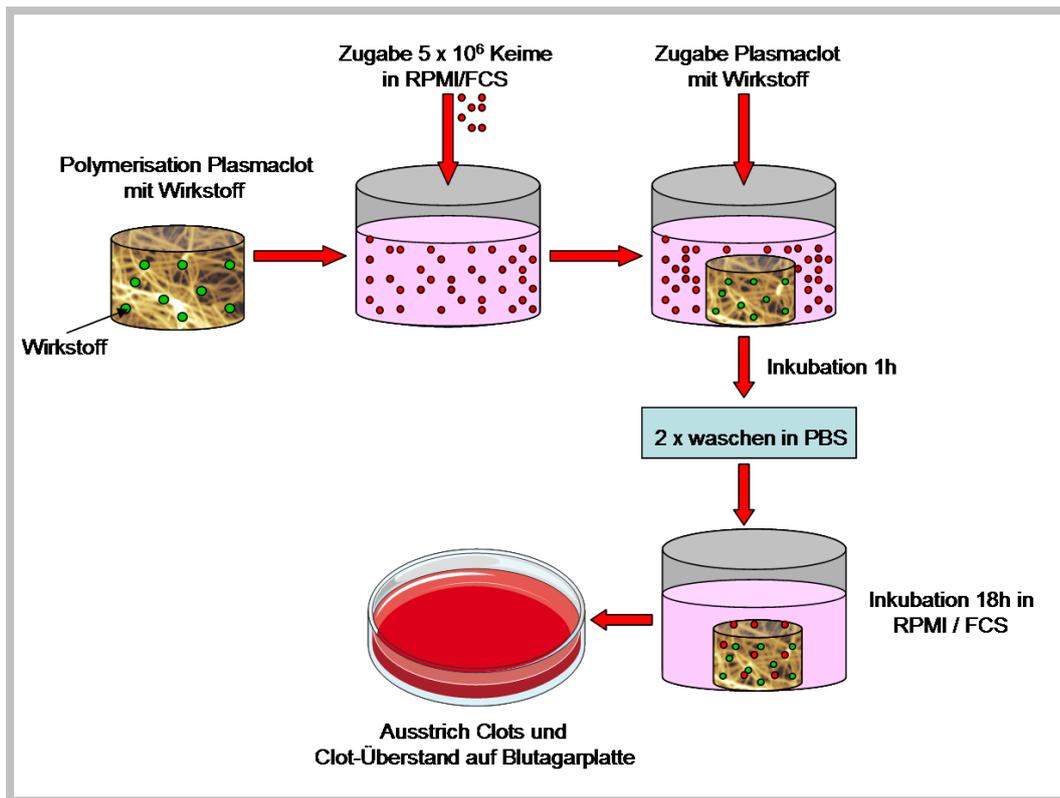


Abb. 2: Schematische Darstellung des Bakterien-Adhäsionstests.

4.3.3.2 Wachstumsverhalten und Viabilität der Testkeime auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots

Die Viabilität der Testkeime auf den wirkstoffbeladenen Clots wurde mit einer Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe SYTO 9 und Propidiumjodid (BacLight Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, Oregon, USA) überprüft. Beide Farbstoffe unterscheiden sich in der Membrangängigkeit. Mit Syto 9 lassen sich sowohl vitale als auch geschädigte Bakterien markieren. Propidiumjodid (PI) kann nur in Bakterien mit einer geschädigten Membran eindringen und konkurriert dort mit SYTO 9 um die Bindungsplätze an der Nucleinsäure. Bakterien mit einer intakten Zellmembran fluoreszieren grün, während Bakterien mit einer geschädigten Membran rot fluoreszieren.

Plasmaclots wurden mit einem Ausgangsvolumen von 1ml in Wells einer 24-Loch-Platte hergestellt. Nach einer Koagulationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank wurden die Clots mit einer Keimsuspension von 1×10^3 KBE / ml RPMI/10% FCS überschichtet und anschließend bei 37°C im Brutschrank für 18h inkubiert.

Für die Live/Dead-Färbung wurden die beiden Färbelösungen immer frisch angesetzt, indem 1,5µl Syto 9 und 1,5µl PI zu 997µl PBS gegeben wurden.

Die Plasmaclots wurden 2x mit sterilem PBS gewaschen, anschließend mit der vorbereiteten Färbelösung überschichtet und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln

inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung abpipettiert und nach zwei weiteren Waschschrinen mit PBS erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse.

Zusätzlich wurden 100µl der Clot-Überstände auf Blutagarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 18h wurden diese Blutagarplatten photographiert und ausgewertet (Abb. 3).

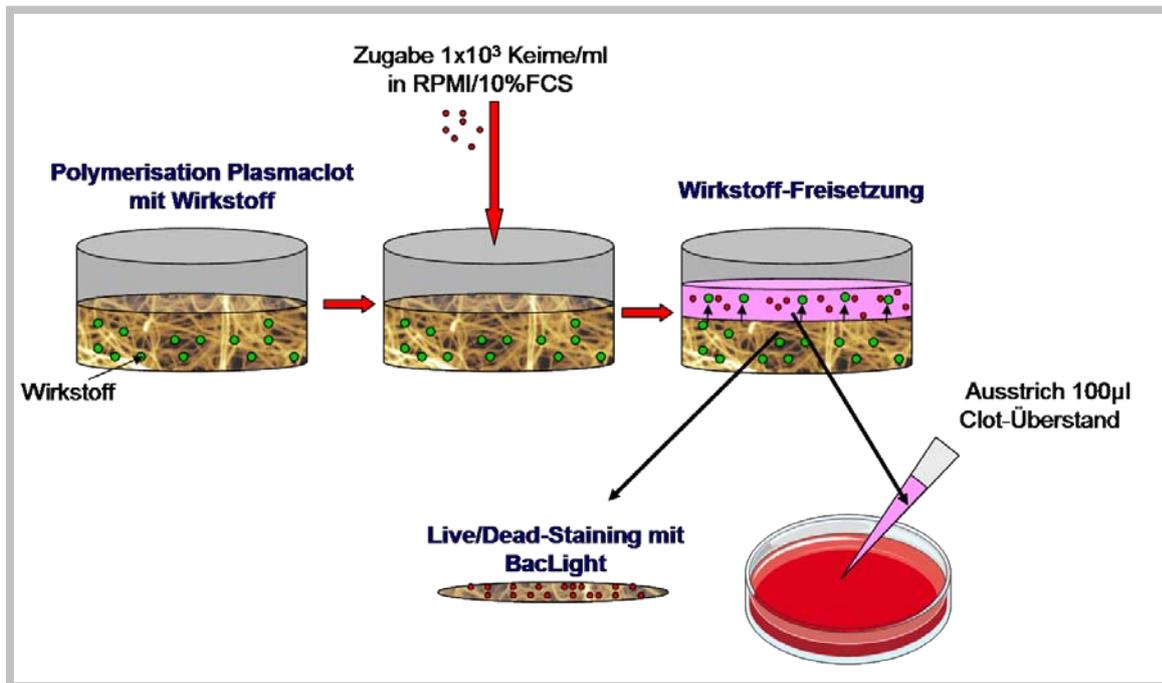


Abb. 3: Schematische Darstellung des Viabilitätstests.

4.3.3.3 Wachstumsverhalten und Viabilität der Testkeime in Plasmaclots mit PVP-Ag-Nanopartikeln und Silberacetat

Plasmaclots wurden mit unterschiedlichen PVP-Ag-NP- bzw. Ag-Ac-Konzentrationen und 1×10^3 Keime / ml Clotgemisch in einem Ausgangsvolumen von 1ml in Wells einer 24-Loch-Platte hergestellt. Nach einer Koagulationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank wurden die Clots vorsichtig mit einem Skalpell vom Wellrand abgelöst und zweimal in RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Clots in 1ml RPMI/10% FCS bei 37°C im Brutschrank für 18h inkubiert (Abb. 4).

Nach der Inkubationszeit wurden die Clots mit BacLight gefärbt und nach zwei Waschschrinen mit PBS erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse.

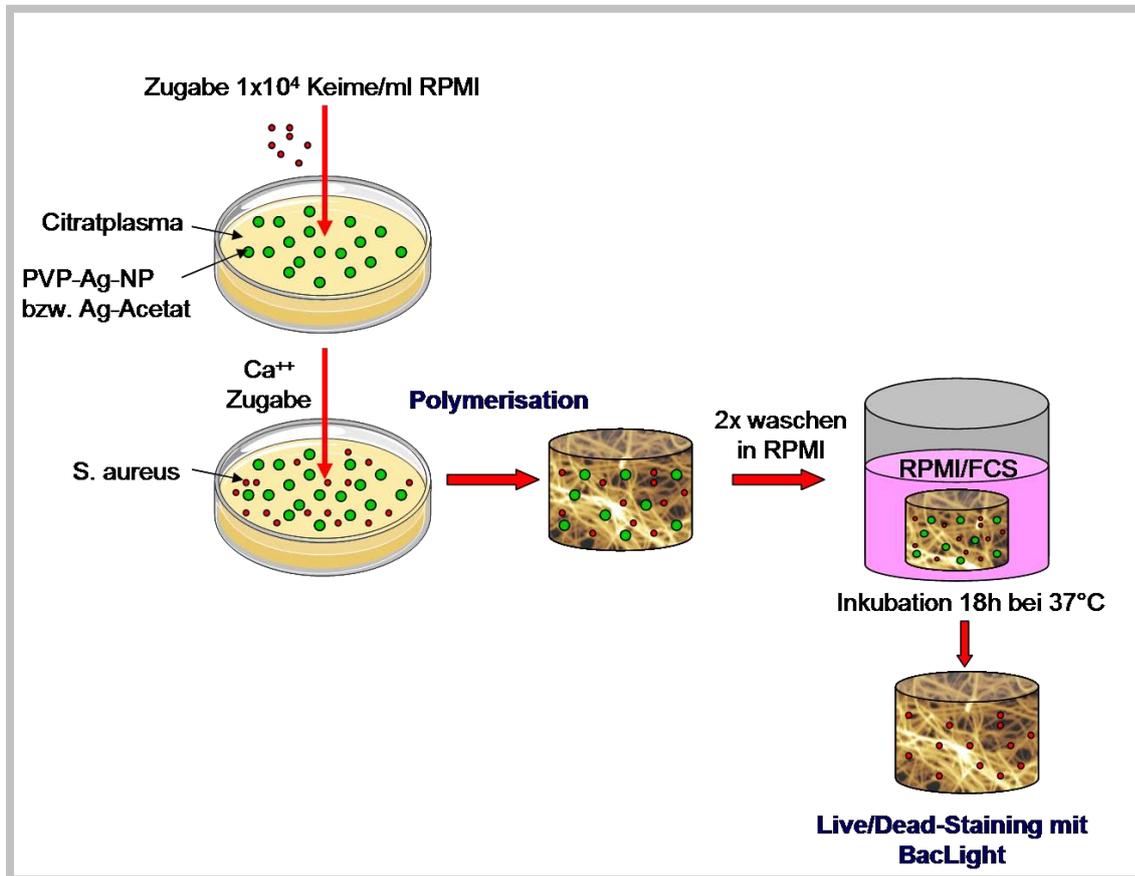


Abb. 4: Schematische Darstellung: Keimviabilität in Plasmaclots mit PVP-Ag-NP bzw. Silberacetat.

4.3.3.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Testkeime auf den Wirkstoff-beladenen Plasmaclots

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Testkeime auf den Wirkstoff-beladenen Plasmaclots wurden Clots mit einem Ausgangsvolumen von 1ml in Wells einer 24-Loch-Platte hergestellt. Nach einer Koagulationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank wurden die Clots mit einer Keimsuspension von 1×10^3 KBE / ml RPMI/FCS überschichtet und anschließend bei 37°C im Brutschrank für 18h inkubiert.

Die Clot-Aufarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte analog zu Kapitel 4.3.1.5.

4.3.3.5 *In-vitro* Empfindlichkeitstestung

Die *in-vitro* Empfindlichkeitstestung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen liefert Informationen, die zur Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit dieser Substanzen essentiell sind. Dabei können verschiedene Methoden herangezogen werden, wie z.B. der Agardiffusionstest, die Makro- bzw. Mikrodilution, das Agardilutionsverfahren und der Epsilon-Test (E-Test) (Jorgensen et al. 1999).

Die Empfindlichkeitstestung erfolgte in dieser Studie mit einem modifizierten Mikrodilutionsverfahren und einem modifizierten Agardiffusionstest.

4.3.3.5.1 Mikrodilution

Plasmaclots, die den jeweiligen antimikrobiellen Wirkstoff in abgestuften Konzentrationen enthielten, wurden in einer definierten Bakteriensuspension von 5×10^5 KBE/ml inkubiert (Abb. 5). Die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr feststellbar war, galt als „Minimale Hemmstoffkonzentration“ (MHK) der eingesetzten Substanz. Diese modifizierte Mikrodilution-Methode erlaubt somit quantitative Aussagen zum Grad der Empfindlichkeit von wirkstoffbeladenen Plasmaclots gegen den eingesetzten Testkeim (*S. aureus*) und ermöglichen einen Vergleich mit der Empfindlichkeitstestung der jeweiligen antimikrobiellen Einzelsubstanz ohne Plasmaclot.

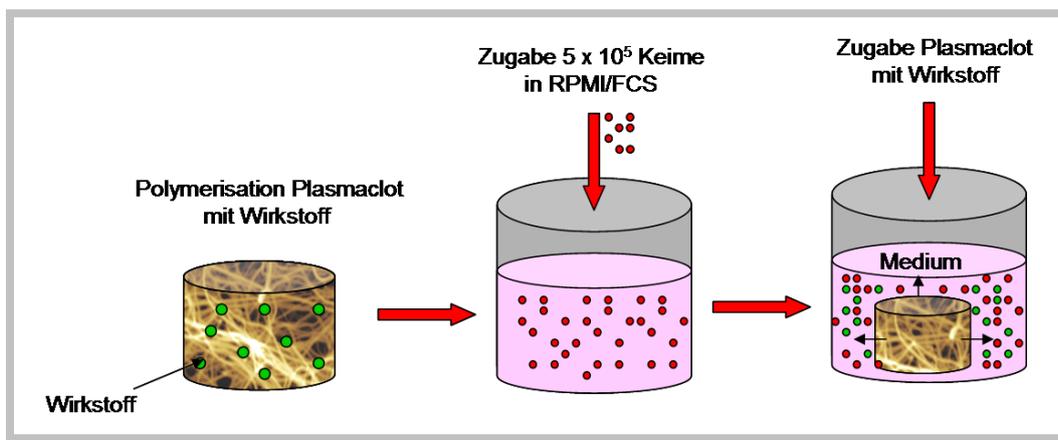


Abb. 5: Schematische Darstellung der Mikrodilution. Plasmaclots wurden mit/ohne antimikrobielle Substanzen hergestellt. Nach der Polymerisation wurden die Clots in einer Keimsuspension von 5×10^5 KBE/ml für 18h inkubiert.

Durchführung Mikrodilution

Plasmaclots mit/ohne antimikrobiellen Wirkstoffen wurden in einer 96-Well-Platte mit einem Ausgangsvolumen von 300µl Clotgemisch hergestellt und nach einer Polymerisationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank im Mikrodilutionstest eingesetzt.

Für die Mikrodilution wurden Bakterienisolate (*S. aureus*) immer frisch auf Blutagarplatten angezüchtet. Von einer Übernachtskultur wurden Einzelkolonien (ca. 2-3) in 3ml 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert bis ein McFarland-Standard von 0,5 eingestellt war (entspricht einer Keimzahl von ca. 1×10^8 KBE/ml). Diese Bakteriensuspension wurde anschließend 1:200 in frisch vorbereitetem Medium (RPMI/10% FCS) verdünnt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Die Inokulumkonzentration betrug danach 5×10^5 KBE/ml. Für die Mikrodilutionsversuche wurden davon 200µl in Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt und in Anwesenheit von Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen – im Dreifachansatz – inkubiert (Abb. 6). Zusätzlich diente ein Plasmaclot ohne Wirkstoff als Kontrolle. Zur Qualitätssicherung wurden bei jedem Testdurchgang eine Positivkontrolle zur Überprüfung der eingesetzten Bakterienkonzentration sowie eine Negativkontrolle, die eine eventuelle Verunreinigung des Ausgangsmediums (RPMI/10% FCS) anzeigen sollte,

mitgeführt. Als Qualitätskontrolle wurden die Einzelsubstanzen in den gleichen Konzentrationen wie im Plasmaclot verwendet.

Die 96-Well-Platten wurden nach einer 18-stündigen Inkubation bei 37°C zunächst visuell begutachtet. Die MHK-Werte waren gut sichtbar, weil die Bakteriensuspension in RPMI mit Phenolrot angesetzt wurde. Da die Keime bei ihrem Wachstum nicht-flüchtige Säuren als Stoffwechselprodukte in das Medium abgeben und dadurch eine zunehmende pH-Wert-Senkung verursachen, kann man den Phenolrot-Farbumschlag von rot nach gelb als Indikator für das Bakterienwachstum verwenden. Die MHK, welche die niedrigste Konzentration der antimikrobiellen Substanz in den Dreifachansätzen darstellte, bei der visuell kein bakterielles Wachstum mehr sichtbar war, wurde dokumentiert und ausgewertet.

Um die minimale bakterizide Konzentration (MBK) zu bestimmen, wurden aus allen Ansätzen 100µl entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Die Wirkstoffkonzentration, bei der der Nährboden kein Bakterienwachstum aufwies, wurde als minimale bakterizide Konzentration abgelesen.

MHK- bzw. MBK-Werte der wirkstoffbeladenen Plasmaclots wurden abschließend mit den Werten der Einzelsubstanz verglichen.

Zusätzlich wurden alle Plasmaclots zweimal in PBS gewaschen und mit Hilfe einer Pinzette auf Blutagarplatten ausgestrichen, um die Bakterienadhärenz auf der Clot-Oberfläche zu untersuchen.

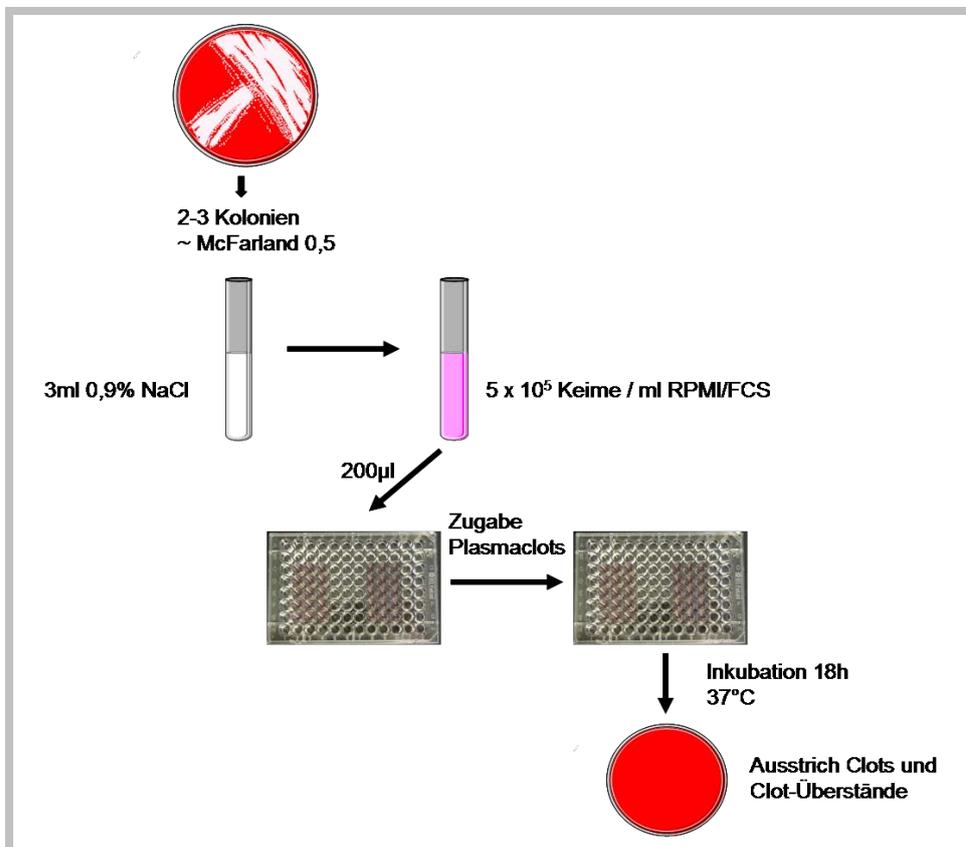


Abb: 6: Schematische Darstellung der Mikrodilution. Durchführung der Testung.

4.3.3.5.2 Agardiffusion

Plasmaclots mit/ohne antimikrobiellen Wirkstoffen wurden in einer 96-Well-Platte mit einem Ausgangsvolumen von 300µl Clotgemisch hergestellt und nach einer Polymerisationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank im Agardiffusionstest eingesetzt.

Für die Agardiffusion wurden Bakterienisolate (*S. aureus*) immer frisch auf Blutagarplatten angezüchtet. Von einer Übernachtskultur wurden mit einer Impföse 2 Einzelkolonien in 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung gegeben und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Von dieser Suspension wurden 100µl in 10ml sterile NaCl-Lösung transferiert und gemischt. Anschließend wurden 3ml dieser Keimsuspension auf einer Müller-Hinton-Agarplatte pipettiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension über die ganze Platte zu erreichen, wurde die Petrischale leicht rotiert. Die restliche Flüssigkeit wurde mittels Pipette wieder abgesaugt und die beimpfte Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Restflüssigkeit durch Schrägstellung der Platte gesammelt und abgesaugt. Auf die vorbereiteten Platten wurden, ca. 2 cm vom Plattenrand entfernt, in einem Abstand von etwa 3 cm mit einer Pinzette (ohne den Agar zu berühren) Plasmaclots bzw. Filterpapierblättchen (Durchmesser: 6 mm) aufgelegt und leicht angedrückt. Die Filterpapierblättchen wurden mit 10µl Clot-Abpressflüssigkeit, Wirkstoffeluat oder unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen zur Erstellung einer Eichkurve beschichtet. Danach wurden die Platten bei 37°C für 18h inkubiert und abschließend ausgewertet (Abb. 7).

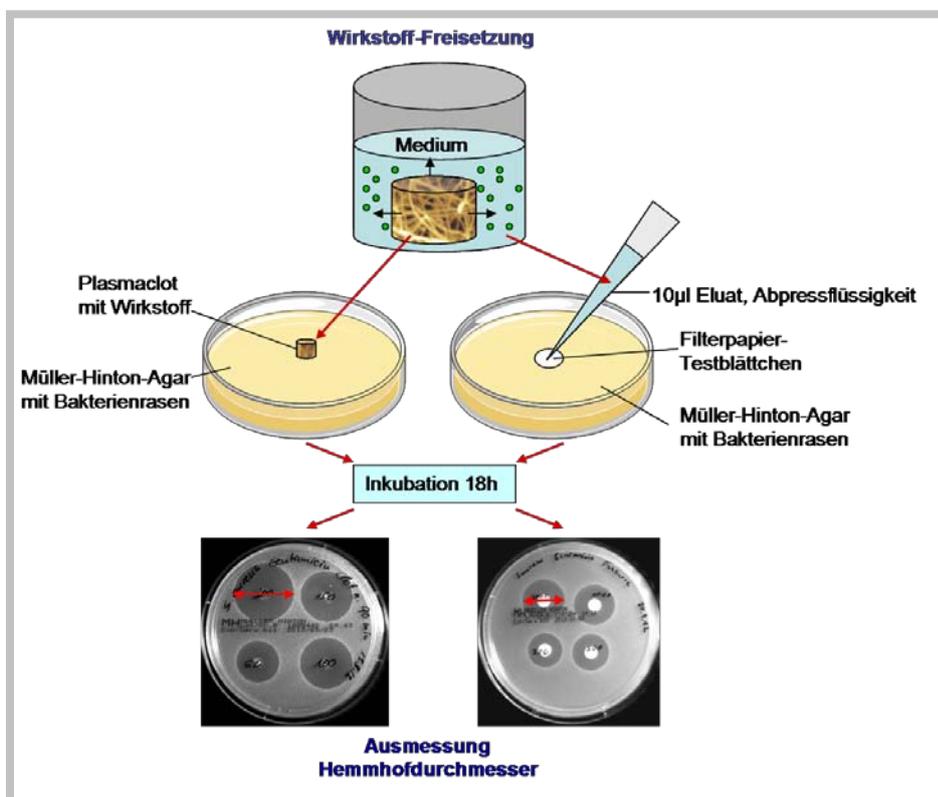


Abb: 7: Schematische Darstellung des Agardiffusionstest.

Auswertung des Agardiffusionstests

Die antimikrobielle Substanz diffundiert in den Agar, wodurch um das Filterpapier bzw. um den Plasmaclot herum ein Wirkstoffgradient entsteht. Dieser Wirkstoffgradient ist in unmittelbarer Nähe des Filterblättchens bzw. des Clots am höchsten und nimmt Richtung Peripherie ab. Je nach der Empfindlichkeit des zu testenden Keimes wird das Wachstum in einem unterschiedlich großen Radius um das Testblättchen unterdrückt. Die Zone um das Blättchen, in der kein Bakterienwachstum sichtbar ist, wird als Hemmhof bezeichnet. Der Durchmesser des Hemmhofs, angegeben in mm, wird für die Beurteilung herangezogen.

Alle Platten wurden photographiert, die Hemmhöfe ausgemessen und in einer Excel-Tabelle dokumentiert. Zur Aufstellung der Eichkurve (Wirkstoffausgangskonzentrationen) wurde der Hemmhofdurchmesser gegen den dekadischen Logarithmus der Wirkstoffkonzentrationen aufgetragen (Software: Excel). Auf der Basis dieser Eichkurve konnte die Wirkstoffkonzentration der Clot-Abpressflüssigkeit und des Wirkstoffeluats ermittelt werden. Für Plasmaclots konnten die Eichkurven nicht verwendet werden.

4.3.4 Überprüfung der Toxizität der eingesetzten Wirkstoffe in der Zellkultur

Um direkte Toxizitätseffekte der eingesetzten Wirkstoffe auszuschließen, wurden mesenchymale Stammzellen (MSC), eingebettet in Plasmaclots in Kombination mit den eingesetzten antimikrobiellen Substanzen, für 7 Tage inkubiert. In einem weiteren Versuch wurden adhärenente MSC mit Plasmaclots ebenfalls für 7 Tage ko-inkubiert.

4.3.4.1 Zellviabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Plasmaclot mit unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen

Zum Nachweis der Zellviabilität und zur Beurteilung der Toxizität der eingesetzten Wirkstoffe auf MSC im Plasmaclot wurde nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen ein Fluoreszenz-basierter Assay durchgeführt, um durch eine Zwei-Farben-Markierung mit Calcein-AM und Propidiumjodid vitale und avitale Zellen gleichzeitig sichtbar zu machen.

Das Prinzip dieser Färbung besteht darin, dass das nicht fluoreszierende Calcein-AM aufgrund des Amoxymethylanteils in der Lage ist, Zellwände zu durchdringen und im Zytoplasma durch die Aktivität einer zytoplasmatischen Esterase zu fluoreszierendem Calcein umgewandelt wird. Diese Esterase ist nur in lebenden Zellen vorhanden. Fluoreszierendes Calcein reichert sich im Zytoplasma vitaler Zellen an und ist an einer gleichmäßigen grünen Fluoreszenz erkennbar (Excitation: 494 nm; Emission: 517 nm).

Propidiumjodid kann nur in avitale Zellen eindringen, wohingegen es von lebenden Zellen mit intakter Membran nicht aufgenommen werden kann. In der Zelle diffundiert der Farbstoff in den Zellkern und fluoresziert nach Bindung an Nukleinsäuren (Interkalierung) rot (Excitation: 530 nm; Emission: 620 nm).

Durchführung:

Plasmaclots wurden mit unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen und 1×10^4 MSC/ml mit einem Ausgangsvolumen von $1000 \mu\text{l}$ in Wells einer 24-Loch-Platte hergestellt und nach einer Polymerisationszeit von 90 min bei 37°C im Brutschrank vorsichtig mit RPMI/10% FCS überschichtet (Abb. 8). Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank wurden die Plasmaclots zweimal mit RPMI gewaschen und anschließend mit Calcein-AM ($16,3 \mu\text{l/ml}$) für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschen mit RPMI erfolgte die Inkubation mit Propidiumjodid ($50 \mu\text{g/ml}$) für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Im folgenden Schritt wurden ein abschließendes Waschen mit RPMI und die fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop BX61 (Olympus, Hamburg) wurden Fluoreszenzbilder von einem gewählten Bildausschnitt mit beiden Farbstoffen in einer 5-fachen Vergrößerung hergestellt. Danach wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert.

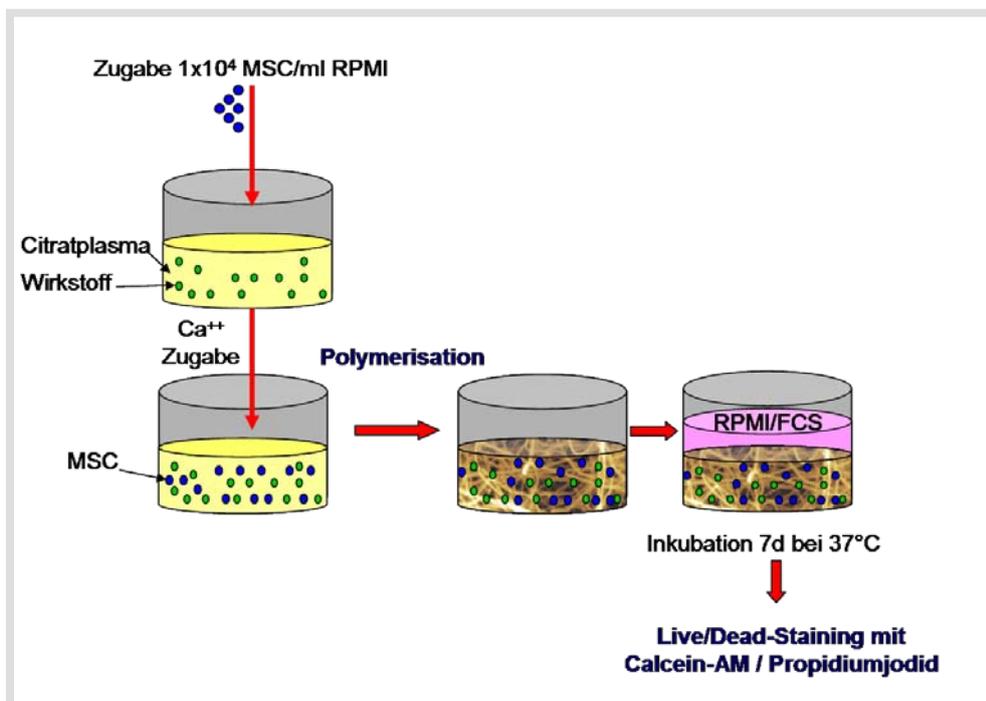


Abb: 8: Schematische Darstellung des Viabilitätstests.

4.3.4.2 Ko-Inkubation von MSC mit Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen

MSC (1×10^4 /ml RPMI/10%FCS) wurden in Wells einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium (RPMI/10%FCS) erneuert und Plasmaclots mit/ohne integrierten Wirkstoffen auf die adhären MSC gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden die adhären MSC mit der Färbung nach Pappenheim gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 9).

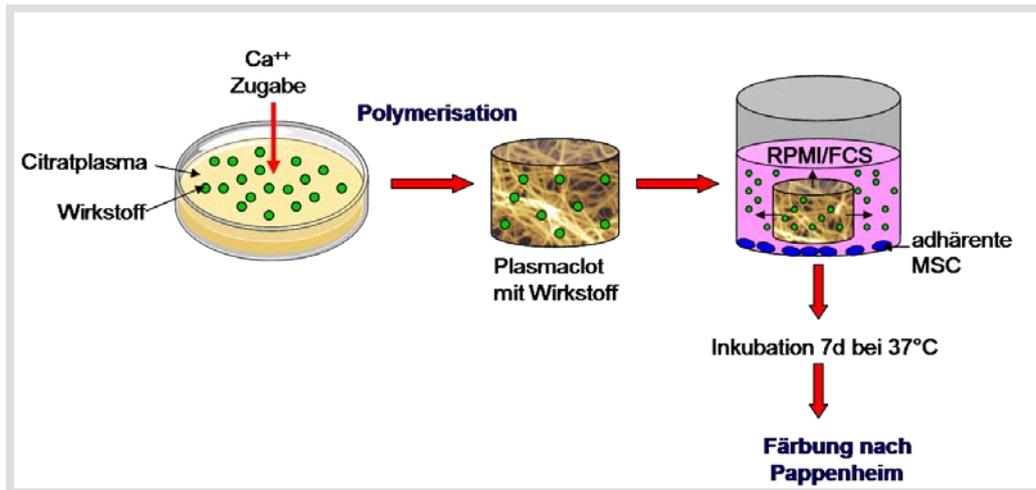


Abb: 9: Ko-Inkubation von adhärenenten MSC mit Plasmaclots für 7 Tage.

4.3.5 Datenauswertung

Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 dokumentiert. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm STATISTICA. Alle Parameter wurden innerhalb der Gruppen sowie im Gruppenvergleich deskriptiv und statistisch ausgewertet.

Die gemessenen Werte der Faserdicke und der Clot-Abpressflüssigkeit wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrische Testverfahren zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse angewendet. Zum Mehrgruppenvergleich wurde als Vortest der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Bei Signifikanz wurde anschließend zum Vergleich von jeweils zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test gewählt.

Zur statistischen Auswertung des Agardiffusionstests wurden ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test und anschließend bei Signifikanz der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen Hemmhofdurchmesser und Wirkstoffkonzentration mit der Korrelation nach Spearman Rank berechnet.

Es wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau für alle statistischen Tests festgelegt.

5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5.1 Optimierung der Plasmaclot-Zusammensetzung und der Wirkstoffinkorporation

5.1.1 Variation der Vernetzungsdichte

Eine Calciumzugabe von 5% (vom Plasmavolumen) bei einem Plasmaanteil von 50% und 75% bzw. 2,5% bei einem Plasmanteil von 100% resultierte in einer optimalen Vernetzungsdichte und Clotstabilität.

5.1.2 Einfluss des Plasmaanteils auf die Clot-Abpressflüssigkeit

Nach der Clot-Polymerisation blieb ein Anteil des Clotgemisches flüssig. Die Größenordnung dieses nicht koagulierenden Anteils schwankte bei Clots, hergestellt mit 50% Plasma, 50% Diluent (Ringer-Acetat-lösung, Aqua ad injectabilia, NaCl) und Antibiotika zwischen 73% und 54%. Das Volumen der Abpressflüssigkeit der Kontrollclots ohne Antibiotika lag bei allen Clot-Zusammensetzungen um 58%. Vergleicht man die Abpressflüssigkeiten der Clots in Bezug auf die verwendeten unterschiedlichen Plasmadiluenten (Tab. 3-5), zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede (Linezolid: $p=0,1071$; Gentamicin: $p=0,1532$; Vancomycin: $p=0,2110$).

Tab. 3: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Abpressflüssigkeit [μ l] nach einer Koagulationszeit von 90min. Die Plasmaclots wurden aus 50% Plasma und 50% Ringer-Acetat-Lösung mit einem Ausgangsvolumen von 500 μ l Clotgemisch hergestellt.

Konzentration	Linezolid [μ l]	Vancomycin [μ l]	Gentamicin [μ l]	Kontrolle [μ l]
				295 \pm 21
5 μ g/ml	330 \pm 28	255 \pm 42	367 \pm 7	
10 μ g/ml	315 \pm 7	280 \pm 49	323 \pm 28	
25 μ g/ml	310 \pm 14	315 \pm 70	310 \pm 49	
50 μ g/ml	275 \pm 21	335 \pm 45	337 \pm 49	
100 μ g/ml	310 \pm 28	285 \pm 75	283 \pm 49	

Tab. 4: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Abpressflüssigkeit [μ l] nach einer Koagulationszeit von 90min. Die Plasmaclots wurden aus 50% Plasma und 50% Aqua ad injectabilia mit einem Ausgangsvolumen von 500 μ l Clotgemisch hergestellt.

Konzentration	Linezolid [μ l]	Vancomycin [μ l]	Gentamicin [μ l]	Kontrolle [μ l]
				292 \pm 22
5 μ g/ml	330 \pm 20	255 \pm 5	360 \pm 40	
10 μ g/ml	315 \pm 5	280 \pm 20	295 \pm 5	
25 μ g/ml	260 \pm 40	315 \pm 35	270 \pm 10	
50 μ g/ml	275 \pm 15	335 \pm 35	315 \pm 25	
100 μ g/ml	310 \pm 20	285 \pm 35	240 \pm 15	

Tab. 5: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Abpressflüssigkeit [μ l] nach einer Koagulationszeit von 90min. Die Plasmaclots wurden aus 50% Plasma und 50% NaCl (0,9%) mit einem Ausgangsvolumen von 500 μ l Clotgemisch hergestellt.

Konzentration	Linezolid [μ l]	Vancomycin [μ l]	Gentamicin [μ l]	Kontrolle [μ l]
				298 \pm 18
5 μ g/ml	335 \pm 7	270 \pm 14	370 \pm 14	
10 μ g/ml	315 \pm 7	295 \pm 7	310 \pm 14	
25 μ g/ml	270 \pm 14	315 \pm 7	295 \pm 7	
50 μ g/ml	268 \pm 18	330 \pm 14	318 \pm 11	
100 μ g/ml	300 \pm 14	305 \pm 7	270 \pm 14	

Die Auswertung der gemessenen Volumina der Abpressflüssigkeit alleine gab keinen Anhaltspunkt, eines der getesteten Diluenten zu bevorzugen. Insgesamt betrachtet zeigte sich jedoch bei Verdünnung des Plasmas in einem Verhältnis von 1:1 eine geringere Koagulationsfähigkeit. Diese äußerte sich in einem prozentual hohen Anteil am Gesamtvolumen an nicht fest werdender Abpressflüssigkeit. Vor allem vor dem Hintergrund der Verwendung des Plasmaclots als Drug-Release-System stellt diese Tatsache eine große Schwierigkeit dar, denn eine genaue Konzentrationsvorgabe der antimikrobiellen Wirkstoffe könnte so nicht eingehalten werden. Anhand des Vergleiches von Kontrollclots ohne

antimikrobiellen Wirkstoffen und Clots mit zugesetzten Wirkstoffen ließ sich jedoch ein negativer Einfluss der Substanzen auf die Koagulation ausschließen. Es ließen sich keine signifikanten Abweichungen in den gemessenen Volumina der Abpressflüssigkeit feststellen (Kruskal-Wallis-Test).

Um das Clot-Ausgangsvolumen als möglichen Einflussfaktor auf die Koagulation auszuschließen, wurden unterschiedliche Clot-Ansatzvolumen (300µl, 500µl, 1000µl) getestet und der verbleibende flüssige Clotanteil gemessen. Der Vergleich der Abpressflüssigkeit ergab vergleichbare Werte bei einer Clotkombination aus 50% Plasma und 50% Ringer-Acetat-Lösung. Bei einem Ausgangsvolumen von 1000µl betrug der nicht koagulierte Clotanteil 64%, bei 500µl: 62% und bei 300µl: 65%.

In weiteren Versuchen wurde der Plasmaanteil der Clots variiert. Um die Koagulationsfähigkeit zu erhöhen, wurden Plasmaclots mit/ohne Linezolid aus 75% Plasma und 25% Ringer-Acetat-Lösung bzw. aus 100% Plasma hergestellt und die Volumina der Abpressflüssigkeit miteinander verglichen (Tab. 6). In diesen Versuchen wurden Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 300µl Clotgemisch verwendet.

Tab. 6: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Abpressflüssigkeit [µl] nach einer Koagulationszeit von 90min. Plasmaclots ohne Wirkstoff bzw. mit unterschiedlichen Linezolid-Konzentrationen wurden aus einem Plasmaanteil von 50%, 75% und 100% mit einem Ausgangsvolumen von 300µl Clotgemisch hergestellt.

Linezolid-konzentration	50% Plasma	75% Plasma	100% Plasma
5µg/ml	212 ± 8	200 ± 0	167 ± 15
10µg/ml	217 ± 8	200 ± 0	173 ± 20
25µg/ml	218 ± 13	203 ± 10	178 ± 20
50µg/ml	220 ± 11	207 ± 5	175 ± 22
100µg/ml	227 ± 10	205 ± 5	173 ± 33
Kontrolle	230 ± 19	200 ± 6	172 ± 13

Zum Vergleich der drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, nachdem eine Normalverteilung der Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test ausgeschlossen wurde. Plasmaclots mit/ohne Linezolid zeigten in allen Gruppen untereinander signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$, $n=3$). Die detaillierte statistische Auswertung der Ergebnisse befindet sich in Anhang I, Tabelle 1.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch den koagulierten und flüssigen Anteil von Plasmaclots ohne Wirkstoff mit einem Plasmaanteil von 50%, 75% und 100%.

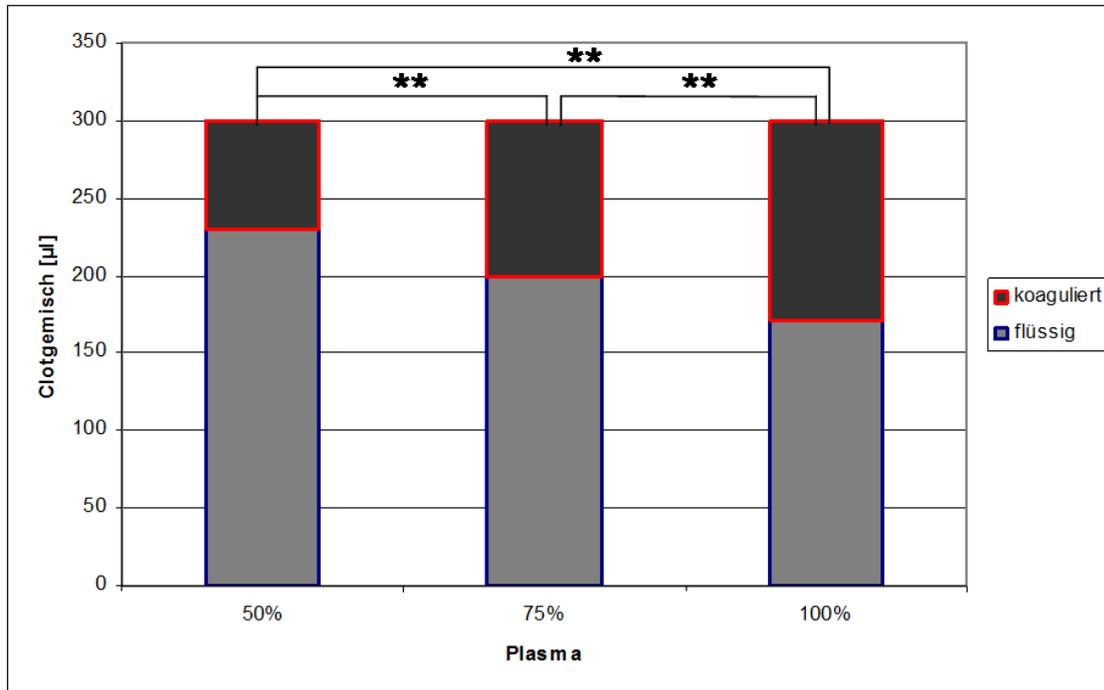


Abb: 10: Einfluss des Plasmaanteils auf die Clot-Koagulation. Koagulierter und flüssiger Anteil von Plasmaclots ohne Wirkstoff, hergestellt mit einem Plasmaanteil von 50%, 75% und 100%. Die flüssigen Clotanteile wurden zuerst mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz getestet ($p < 0,0001$). Sie zeigten in allen Gruppen untereinander signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test (50% vs. 75%: $p < 0,01$; 50% vs. 100%: $p < 0,005$; 75% vs. 100%: $p < 0,01$, $n=4$)

5.1.3 Grenzkonzentration der antimikrobiellen Substanzen

Die maximale Antibiotika-Beladung der Clots lag bei $300\mu\text{g/ml}$. Ab einer Konzentration von $350\mu\text{g/ml}$ wurden die Plasmaclots nicht mehr fest. Dagegen zeigten Plasmaclots mit Silberacetat auch noch bei $500\mu\text{g/ml}$ eine hohe Festigkeit und Stabilität. Da die PVP-Ag-Nanopartikel nicht in beliebig hohen Konzentrationen synthetisiert werden konnten, wurden nur Konzentrationen bis zu $100\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die resultierenden Clots waren stabil und fest.

5.1.4 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Clotstruktur

Um auch Auswirkungen des Plasmaanteils und der Wirkstoffbeladung auf die Plasmaclot-Architektur detektieren zu können, wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie Aufnahmen angefertigt, von denen eine Auswahl in Anhang II dargestellt ist. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Messung der Faserdicken zeigen, dass sowohl die Faserdicke als auch die Fasermorphologie der unterschiedlich hergestellten Plasmaclots variierte und daher keine einheitlichen Fasern entstanden. Die mittlere Faserdicke wurde aus einer Vielzahl an Messungen ermittelt (siehe Anhang II).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wahl der Plasmaclot-Zusammensetzung insbesondere des Plasmaanteils ein entscheidendes Kriterium für die Faserdicke darstellt. Erhöhte man die Plasmakonzentration im Clot, wurden die Fasern dünner. Die Analyse der Fibrinfaserdicke demonstriert, dass Clots mit einem Plasmaanteil von 100% vorwiegend feine und ultrafeine Fasern aufwiesen, die in einem sehr dichten Netzwerk angeordnet waren. In Abbildung 11 sind repräsentative REM-Aufnahmen von Plasmaclots ohne Wirkstoff mit unterschiedlichen Plasmaanteilen und die Analyse der Fibrinfasermessung dargestellt. Die Gruppen zeigten untereinander hochsignifikante Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,0001$). Die Werte der mittleren Faserdicken von Clots mit einem Plasmaanteil von 50% (A) waren signifikant höher als bei Clots mit einem Plasmaanteil von 75% (B) und 100% (C) (jeweils $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Auch die Faserdicken von Plasmaclots mit 75% Plasmaanteil (B) unterschieden sich signifikant von Clots mit einem Plasmaanteil von 100% ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

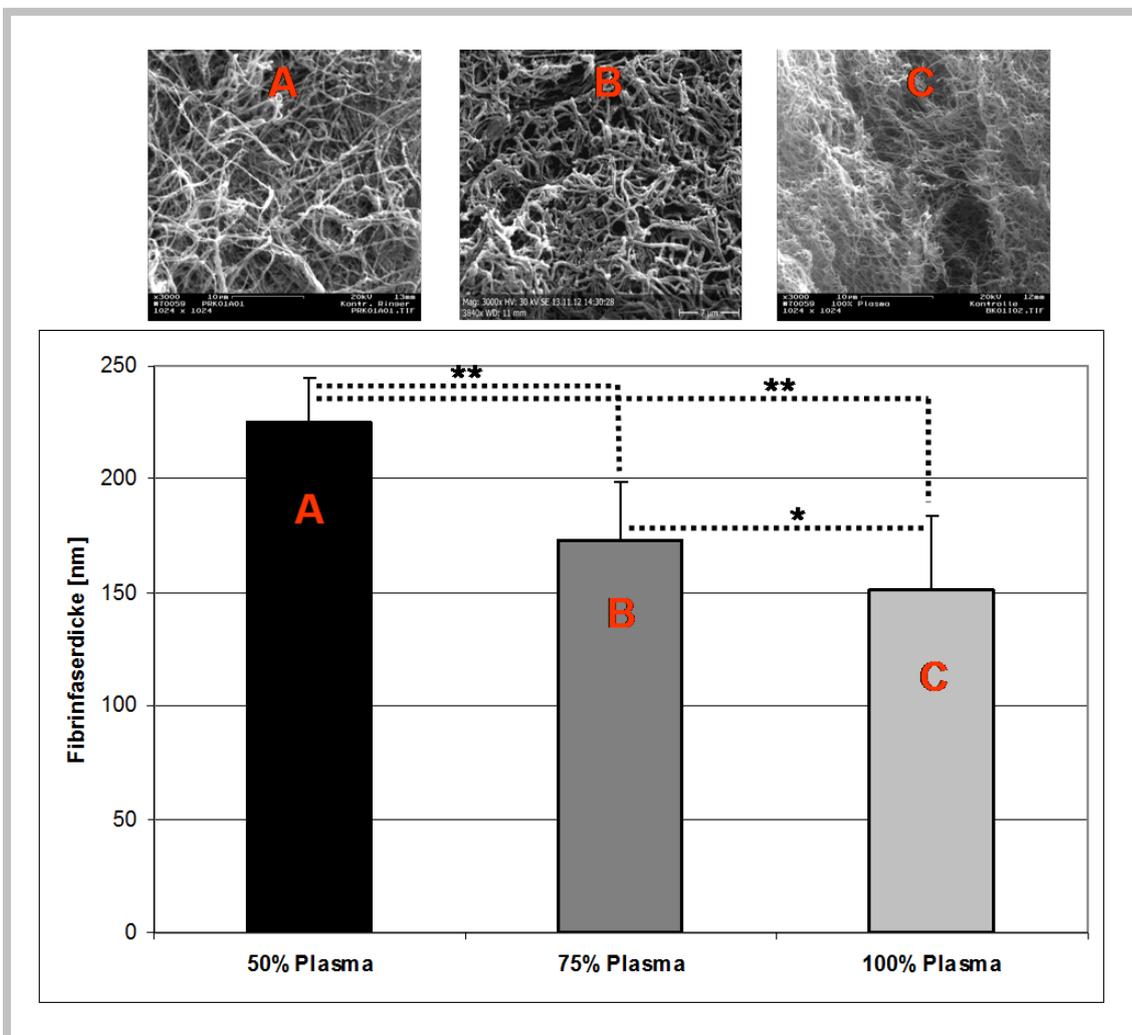


Abb. 11: Einfluss des Plasmaanteils auf die Fibrinfaser-Dicke.
Oben: Repräsentative REM-Aufnahmen von Plasmaclots ohne Wirkstoff:
A: hergestellt aus 50% Plasma und 50% Ringer-Acetat-Lösung; B: aus 75% Plasma und 25% Ringer-Acetat-Lösung; C: aus 100% Plasma.
Unten: Graphische Darstellung der mittleren Fibrinfaserdicke.

Nach Inkorporierung von unterschiedlichen Vancomycin-Konzentrationen in Plasmaclots ließen sich keine wesentlichen Abweichungen in den gemessenen Faserdicken auch im Vergleich zu den Kontrollclots feststellen. Im Kruskal-Wallis-Test zeigten die Gruppen untereinander keine Signifikanz ($p=0,3837$). Bei Plasmaclots mit Gentamicin, Ag-Acetat, PVP-Ag-Nanopartikeln und Kontrollclots ohne Wirkstoff war der Kruskal-Wallis Test signifikant (Gentamicin: $p<0,05$; Ag-Acetat: $p<0,0001$; PVP-Ag-NP: $p<0,05$). Zwischen den einzelnen Wirkstoffkonzentrationen ergab sich kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, jedoch unterschieden sich die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen signifikant von den Kontrollclots ohne Wirkstoff (siehe Anhang II). Die gemessenen Faserdicken der Plasmaclots mit diesen Wirkstoffen wiesen höhere Werte als die der Kontrollclots auf.

Bei Plasmaclots mit Linezolid und Kontrollclots ohne Linezolid war der Kruskal-Wallis Test ebenfalls signifikant ($p<0,05$). Der Unterschied zwischen Clots mit unterschiedlichen Linezolid-Konzentrationen mit den Kontrollclots war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant (Lin 5 μ g/ml vs. Kontrolle: $p=0,9213$; Lin 10 μ g/ml vs. Kontrolle: $p=0,3979$; Lin 25 μ g/ml vs. Kontrolle: $p=0,1118$; Lin 50 μ g/ml vs. Kontrolle: $p=0,2141$; Lin 100 μ g/ml vs. Kontrolle: $p=0,2558$), jedoch unterschieden sich einzelne Linezolid-Konzentrationen signifikant. Die statistische Auswertung wird detailliert im Anhang II (Tab. 15-17) dargestellt.

5.1.5 Einfluss der antimikrobiellen Substanzen auf das Degradationsverhalten von Plasmaclots

In einem Zeitraum von 14 Tagen zeigten alle eingesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu den Kontrollclots ohne Wirkstoff keinen negativen Einfluss auf das Degradationsverhalten.

5.2 Quantitative Messung der Antibiotika-Freisetzung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Freisetzungsuntersuchungen zeigten, dass sowohl Linezolid als auch Gentamicin und Vancomycin aus den Plasmaclots freigesetzt wurden. Die Freisetzungsverläufe der Antibiotika-haltigen Plasmaclots sind in den Abbildungen 12-14 dargestellt.

Bei allen eingesetzten Antibiotika zeigte sich schon nach 30 min ein sogenannter „Burst Effekt“. Ein hoher Gentamicin- bzw. Vancomycin-Anteil wurde schnell freigesetzt, danach erfolgte eine kontinuierliche Freisetzung der verbleibenden Dosis. Plasmaclots mit 300 μ g/ml und 150 μ g/ml Gentamicin zeigten eine retardierte Freisetzung des Gentamicins bis zum 6. Tag noch im therapeutischen Bereich ($>5\mu$ g/ml). Auch bei Plasmaclots mit 300 μ g/ml und 150 μ g/ml Vancomycin war ein ausreichend hoher Wirkspiegel ($>3\mu$ g) bis zum 4. Tag nachweisbar. Die Freisetzungskinetik von Linezolid war während der ersten 3h zufriedenstellend hoch, gewährleistete jedoch keine langfristige Abgabe.

Gentamicin-Clots zeigten außerdem im Vergleich zu Linezolid-Clots eine signifikant höhere Freisetzungsrate.

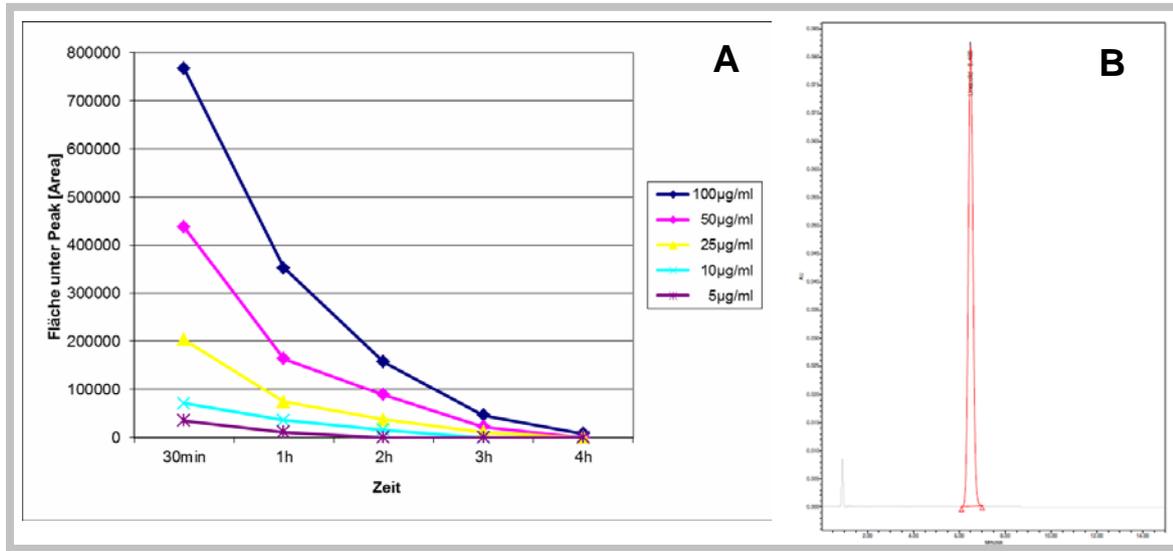


Abb. 12A: Freisetzung von Linezolid aus Plasmaclots in Abhängigkeit von der Zeit über einen Zeitraum von 30 min - 4h. Vergleich der Peakflächen von unterschiedlichen Linezolid-Eluaten. B: Typisches Linezolid-Chromatogramm.

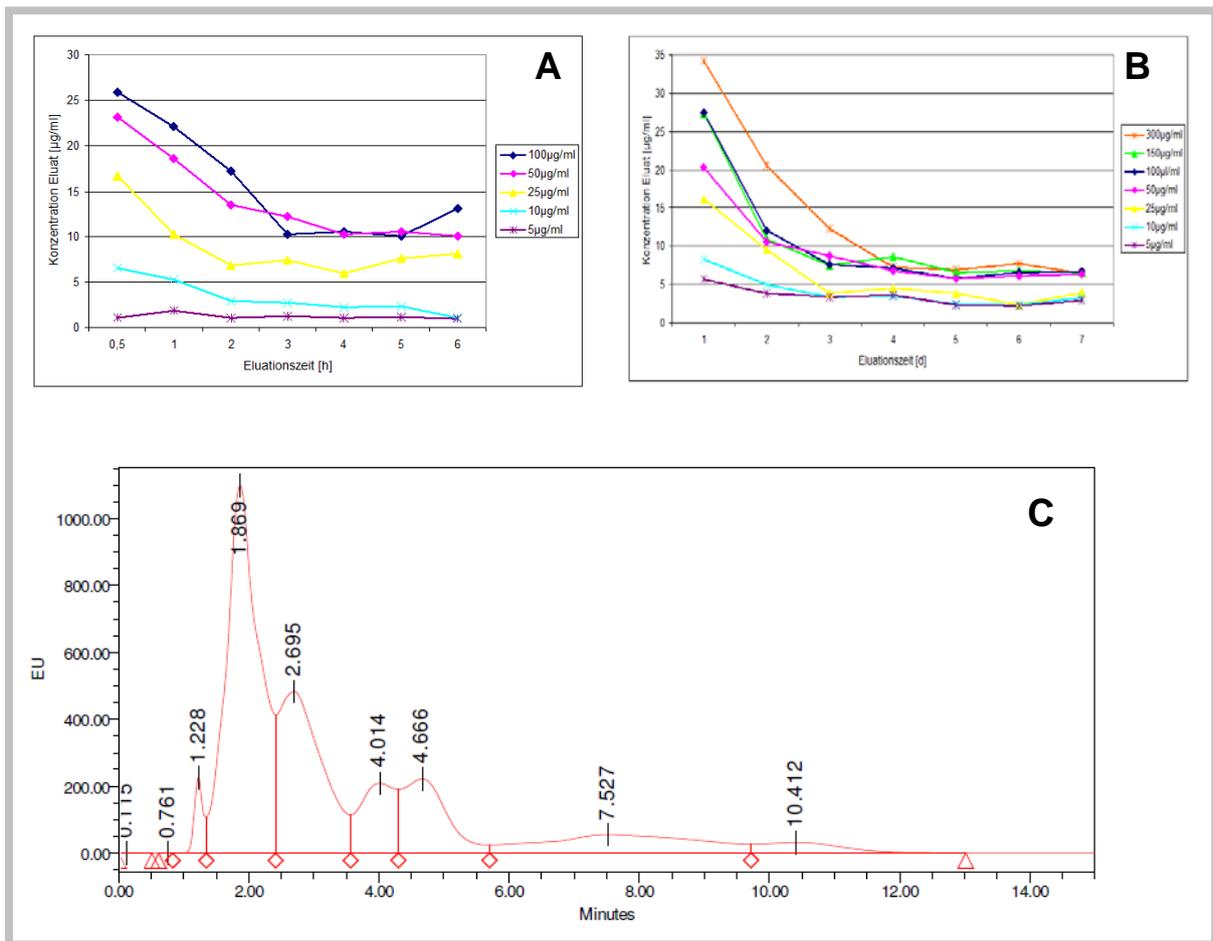


Abb. 13: Freisetzung von Gentamicin aus Plasmaclots über 6h (A) und 7 Tage (B). C: Typisches Gentamicin-Chromatogramm.

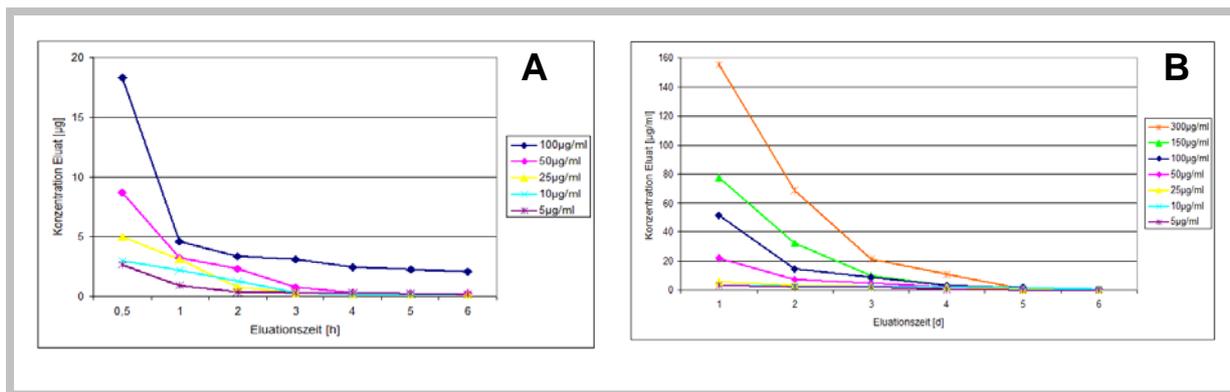


Abb. 14: Freisetzung von Vancomycin aus Plasmaclots über 6h (A) und 6 Tage (B).

Eine detaillierte Darstellung der Resultate sowie der Prozessparameter der HPLC-Analyse erfolgt in Anhang III.

5.3 Quantitative Messung der Gentamicin-Freisetzung mittels DXC-Analytik

Die quantitative Messung der Gentamicin-Freisetzung aus den Plasmaclots mit dem klinisch-chemischen Analysensystem DXC (Beckman Coulter) erwies sich als nicht geeignete Methode, da dieses Messsystem u.a. zur Bestimmung des Gentamicin-Spiegels im Serum, also nur bei geringen Gentamicin-Konzentrationen angewendet wird. Die Eluationsproben mussten mehrfach hintereinander verdünnt werden, teilweise bis zu einer Verdünnung von 1:25. Dadurch hatten die Werte im unteren Konzentrationsbereich keine Abstufungen, sondern immer gleiche Werte (Tab. 7 und Tab. 8). Die DXC-Analytik war für die Eluationsproben daher nicht so sensitiv wie die HPLC-Analytik und wurde aus diesem Grunde nur einmalig durchgeführt.

Tab. 7: DXC-Analytik der Gentamicin-Freisetzung aus Plasmaclots bei einer stündlichen Probenabnahme.

Ausgangsvolumen	100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	10µg/ml	5µg/ml
30min	100,5µg/ml	51µg/ml	27µg/ml	11,5µg/ml	5,7µg/ml
1h	9,7µg/ml	12µg/ml	8,5µg/ml	3,7µg/ml	1,9µg/ml
2h	4,2µg/ml	4,4µg/ml	2,5µg/ml	1,3µg/ml	0,7µg/ml
3h	1,2µg/ml	2,6µg/ml	1,6µg/ml	0,6µg/ml	0,3µg/ml
4h	0,2µg/ml	0,2µg/ml	0,2µg/ml	0,2µg/ml	0,2µg/ml
5h	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml
6h	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml

Abbildung 15 und 16 zeigt ein vergleichbares Freisetzungsprofil für Gentamicin wie bei der HPLC-Analytik (Abb. 13A und 13B), allerdings mit viel niedrigeren Werten bei einer Eluationszeit von 1h – 6h bzw. 1d – 7d

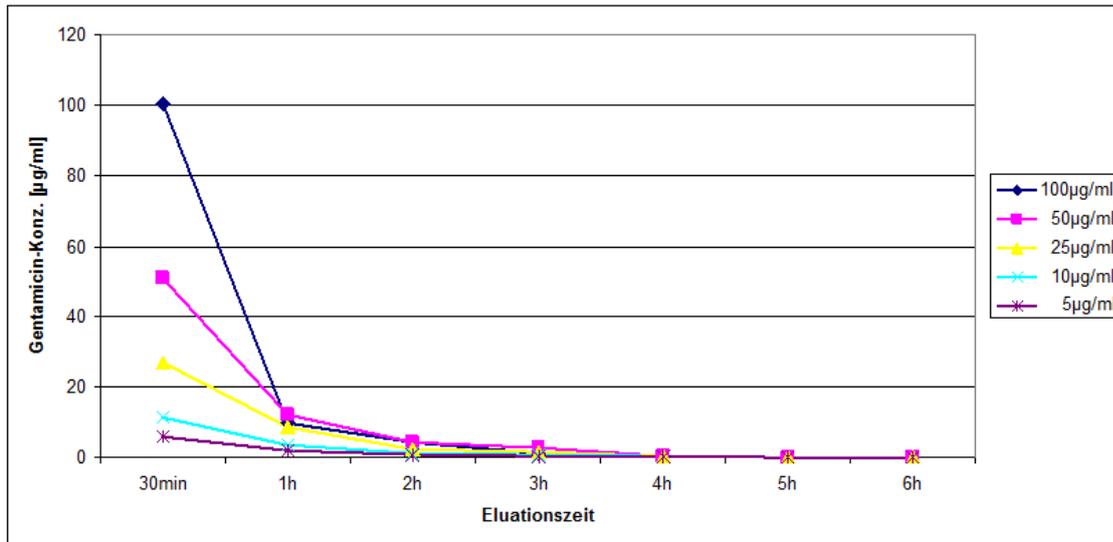


Abb. 15: DXC-Analytik der Gentamicin-Freisetzung aus Plasmaclots bei einer stündlichen Probenabnahme.

Tab. 8: DXC-Analytik der Gentamicin-Freisetzung aus Plasmaclots bei einer täglichen Probenabnahme.

Ausgangsvolumen	300µg/ml	150µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	10µg/ml	5µg/ml
1d	66µg/ml	40µg/ml	17µg/ml	13µg/ml	8,7µg/ml	4,2µg/ml	1,6µg/ml
2d	2µg/ml	2µg/ml	1,7µg/ml	1,6µg/ml	1,4µg/ml	0,9µg/ml	0,2µg/ml
3d	1,5µg/ml	0,1µg/ml	0,2µg/ml	0,1µg/ml	0,2µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml
4d	0,2µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml
5d	0,2µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml	0,1µg/ml
6d	0,1µg/ml						
7d	0,1µg/ml						

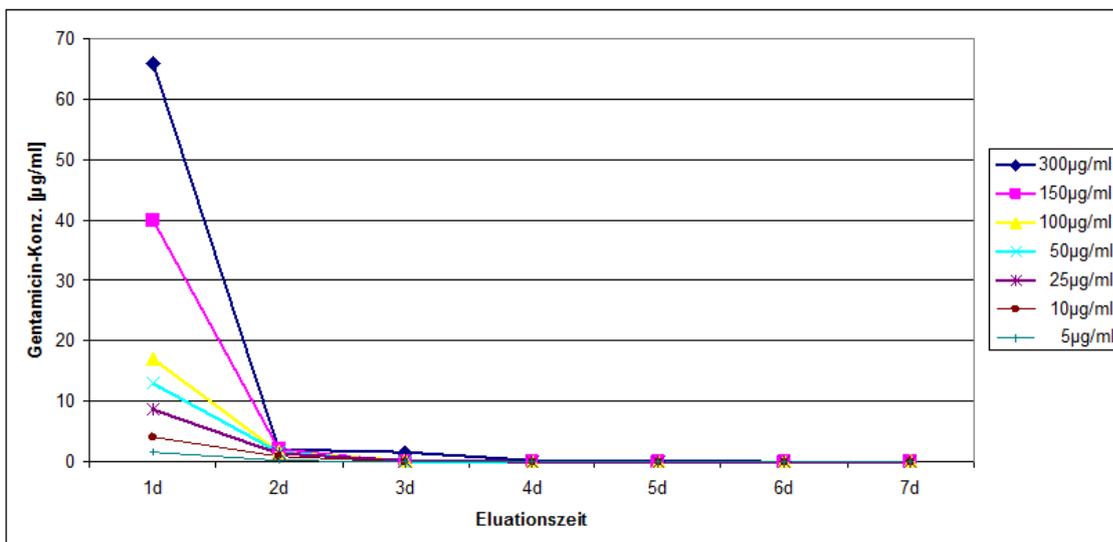


Abb. 16: DXC-Analytik der Gentamicin-Freisetzung aus Plasmaclots bei einer täglichen Probenabnahme bis 7d.

5.4 Quantitative Messung der Silberkonzentration mittels AAS (Atomabsorptionsspektroskopie) im Eluat

Für die AAS-Analyse war die höchste Silber-Ausgangskonzentration der eingesetzten PVP-Ag-NP im Plasmaclot – bedingt durch die Nanopartikel-Synthese – auf 66,8 µg/ml limitiert. Bei Ag-Acetat-haltigen Clots wurde der gleiche Silbergehalt verwendet.

Beim Vergleich der Eluate von Ag-Acetat- und Ag-NP-haltigen Plasmaclots wurde ersichtlich, dass der Silbergehalt im Eluat von Ag-Acetat-Clots bei einer stündlichen Probenabnahme zu allen Eluationszeitpunkten weit über dem Silbergehalt von Ag-NP-Clots lag (Tab. 9, Abb.17). Während z.B. nach einer Eluationszeit von 30 min bei Ag-Acetat-Clots 13,15 µg/ml Silber analysiert wurden, betrug der Silbergehalt im Eluat von Ag-NP-Clots nur 0,30 µg/ml.

Tabelle 9: AAS-Analyse des Silbergehalts im Eluat von Ag-Acetat- und Ag-NP-haltigen Plasmaclots mit einer Silber-Ausgangskonzentration von 66,8 µg/ml nach einer Eluationszeit von 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h.

Probe: Eluat	Silber-Ausgangskonz. [µg/ml] im Clot	Eluationszeit	Silberkonz. im Eluat [µg/ml]
Clot Ag-Ac	66,8	30 min	13,15
Clot Ag-Ac	66,8	1h	12,99
Clot Ag-Ac	66,8	2h	10,79
Clot Ag-Ac	66,8	3h	9,50
Clot Ag-Ac	66,8	4h	5,28
Clot Ag-Ac	66,8	5h	2,34
Clot Ag-Ac	66,8	6h	0,77
Clot Ag-NP	66,8	30 min	0,30
Clot Ag-NP	66,8	1h	0,24
Clot Ag-NP	66,8	2h	0,38
Clot Ag-NP	66,8	3h	0,67
Clot Ag-NP	66,8	4h	0,96
Clot Ag-NP	66,8	5h	0,86
Clot Ag-NP	66,8	6h	0,33

Um die antimikrobielle Wirksamkeit der Eluate zu untersuchen, wurden zusätzlich jeweils 100µl Eluat mit 900µl Bakteriensuspension (1×10^3 Keime / ml RPMI/10% FCS) für 18h inkubiert und anschließend jeweils 100µl auf Blutagarplatten ausgestrichen (Abb. 17 und Abb.18.). Hier konnte nach einer Eluationszeit von 30 min – 2h eine deutliche bakteriostatische Wirkung mit einer Keimreduzierung von ca. 97%-99% beobachtet werden. Dagegen zeigten die Eluate nach einer Eluationszeit von 3h – 6h keine antimikrobielle Wirksamkeit (Abb. 17). Eluate von Ag-NP-haltigen Plasmaclots hatten zu allen Zeitpunkten keine Wirkung gegen die Bakterien (Abb. 17).

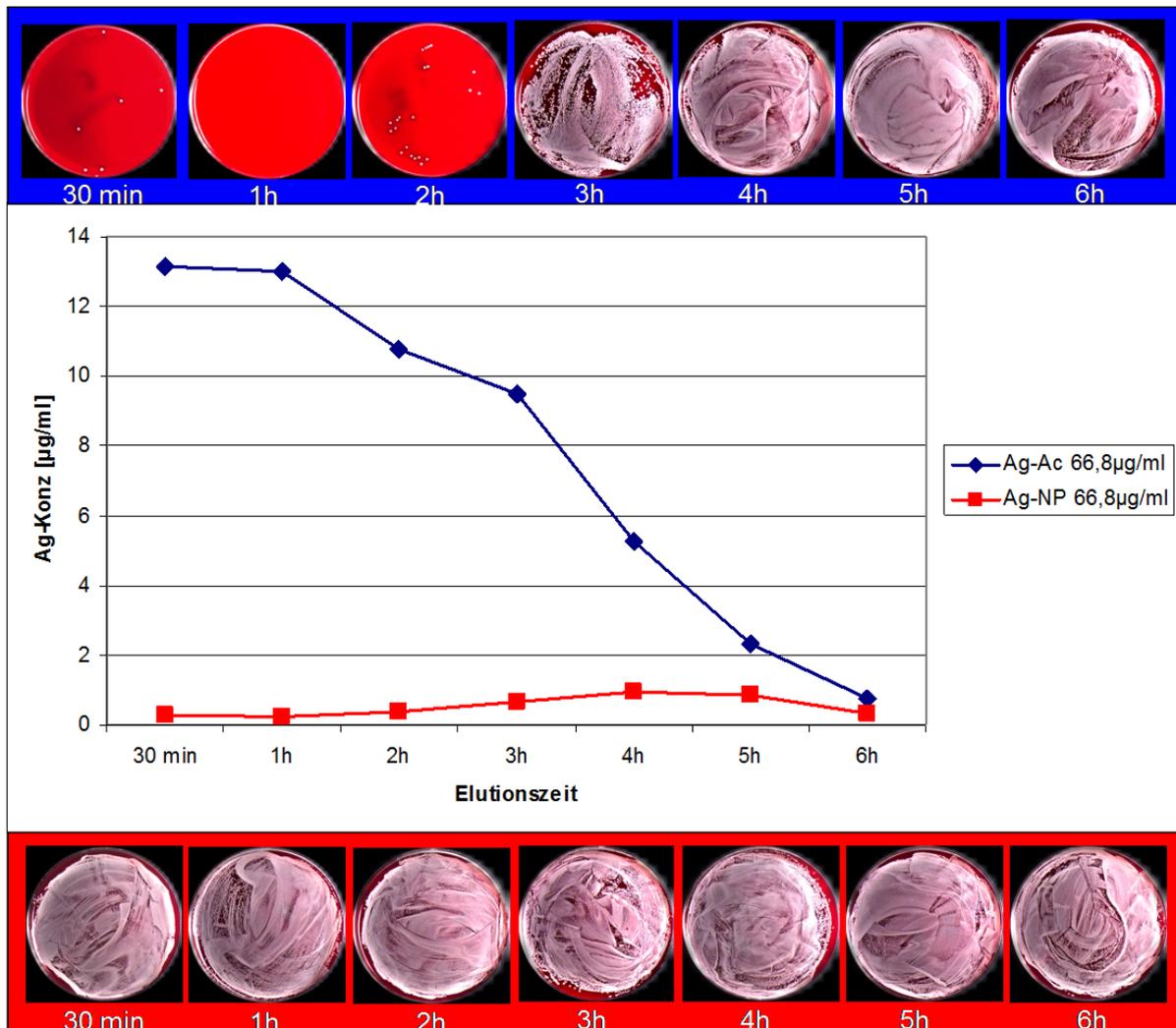


Abb. 17: AAS-Analyse des Silbergehalts im Eluat von Ag-Acetat- und Ag-NP-haltigen Plasmaclots nach einer Eluationszeit von 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h. Mikrobiologische Analyse der Eluate von Ag-Acetat-Clots oben (blau) und PVP-Ag-NP unten (rot).

Bei der täglichen Probenabnahme konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied in der Silber-Freisetzung beobachtet werden. Während Eluate von Ag-Acetat-haltigen Plasmaclots kontinuierlich die höchste Freisetzung verzeichneten (0,71 – 39,48µg/ml), wiesen die Eluate von Ag-NP-haltigen Clots nur am ersten Tag einen Spitzenwert von 2,57µg/ml auf, der in den darauffolgenden Tagen rapide gegen Null steuerte (Tab. 10 und Abb. 18).

Tabelle 10: AAS-Analyse des Silbergehalts im Eluat von Ag-Acetat- und Ag-NP-haltigen Plasmaclots mit einer Silber-Ausgangskonzentration von 66,8 µg/ml nach einer Eluationszeit von 1d, 2d, 3d, 4d, 7d, 8d und 9d.

Probe: Eluat	Silber-Ausgangs-konz. [µg/ml] im Clot	Eluationszeit	Silberkonz. im Eluat [µg/ml]
Clot Ag-Ac	66,8	1d	39,48
Clot Ag-Ac	66,8	2d	12,19
Clot Ag-Ac	66,8	3d	4,03
Clot Ag-Ac	66,8	4d	1,13
Clot Ag-Ac	66,8	7d	0,82
Clot Ag-Ac	66,8	8d	0,25
Clot Ag-Ac	66,8	9d	0,71
Clot Ag-NP	66,8	1d	2,57
Clot Ag-NP	66,8	2d	0,77
Clot Ag-NP	66,8	3d	0,28
Clot Ag-NP	66,8	4d	0,09
Clot Ag-NP	66,8	7d	0,12
Clot Ag-NP	66,8	8d	0,06
Clot Ag-NP	66,8	9d	0,04

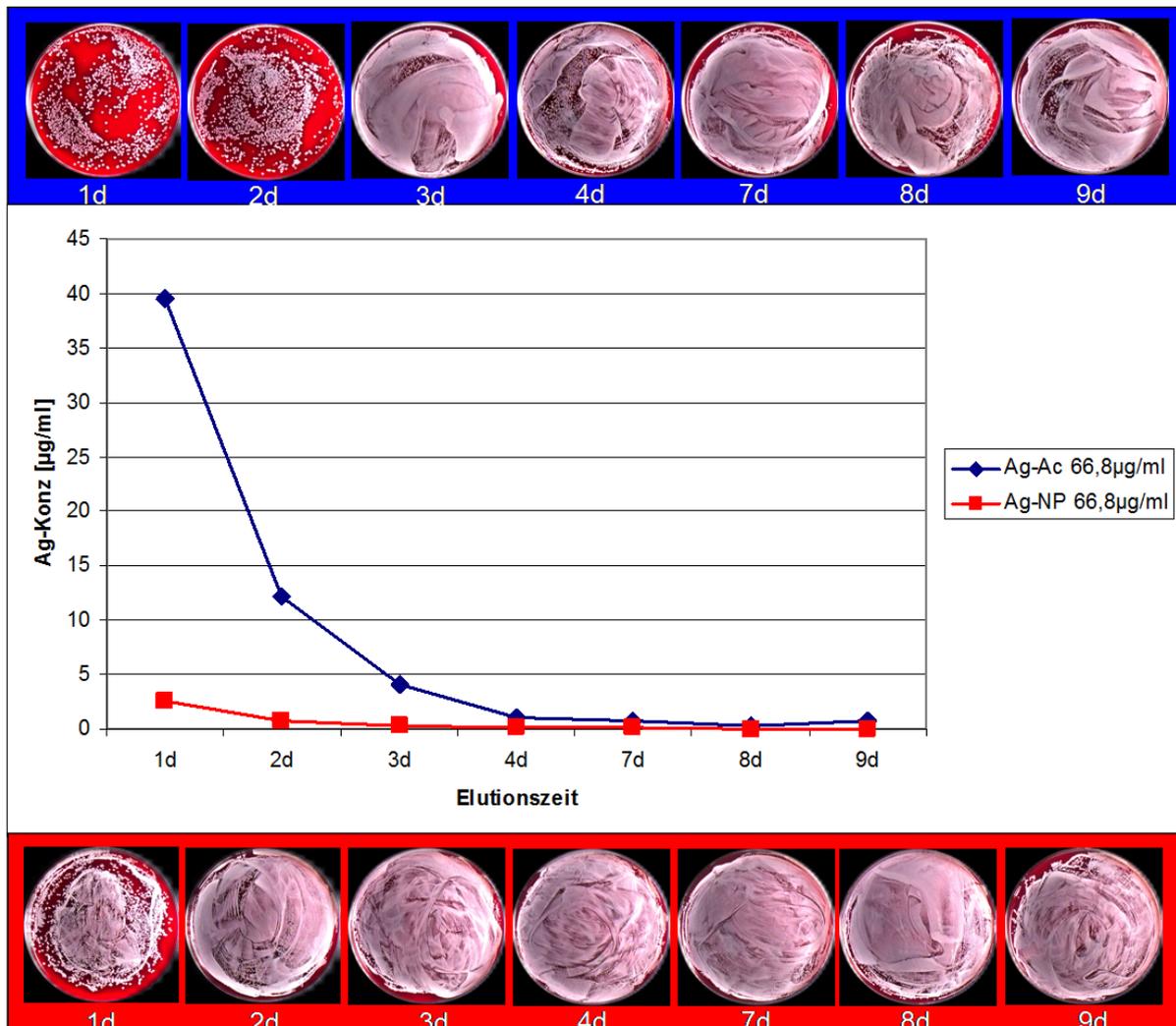


Abb. 18: AAS-Analyse des Silbergehalts im Eluat von Ag-Acetat- und Ag-NP-haltigen Plasmaclots nach einer Eluationszeit von 1d, 2d, 3d, 4d, 7d, 8d und 9d. Mikrobiologische Analyse der Eluate von Ag-Acetat-Clots oben (blau) und PVP-Ag-NP unten (rot).

Bei den mikrobiologischen Untersuchungen war bei Eluaten von Ag-Acetat-Clots nach einer Eluationszeit von 1d und 2d eine deutliche Keimzahlverminderung im Vergleich zu den gewonnenen Eluaten nach einer Eluationszeit von 3d – 9d zu beobachten (Abb. 18). Dagegen zeigten die Eluate von Ag-NP-Clots zu allen Zeitpunkten keine antimikrobielle Wirksamkeit (Abb. 18).

Die gesamten Ergebnisse der mikrobiologischen Ergebnisse werden in Anhang IV dargestellt.

5.5 Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

5.5.1 Bakterien-Adhäsionstest

Nach Inkorporation von Linezolid in Plasmaclots wurde eine minimal reduzierte Bakterienadhäsion nach Clot-Ausstrich bzw. eine deutliche bakteriostatische Wirkung nach Ausstrich des Clot-Überstands bis zu einer Konzentration von 100µg/ml erzielt. Die Integration von Vancomycin und Gentamicin führte zu einem anti-adhäsiven Effekt bis zu einer Konzentration von 100µg/ml bei Vancomycin und von 50µg/ml bei Gentamicin. Darüberhinaus zeigte sich eine bakterizide Wirksamkeit nach Ausstrich des Clot-Überstands bis zu einer Konzentration von 100µg/ml bei Vancomycin und von 50µg/ml bei Gentamicin (Abb. 19). Bei Plasmaclots mit Gentamicin war die Keim-Adhärenz bei einer Konzentration von 25µg/ml im Clot-Ausstrich deutlich reduziert und die Keim-Reduzierung betrug im Clot-Überstand ca. 50%.

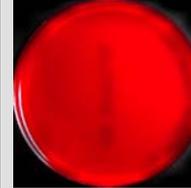
Ausstrich Clots mit			Ausstrich Überstand von Clots mit		
Linezolid	Vancomycin	Gentamicin	Linezolid	Vancomycin	Gentamicin
 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml			
 150µg/ml	 150µg/ml	 150µg/ml			
 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml			
 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml			
 25µg/ml	 25µg/ml	 25µg/ml			
 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml			
 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml			

Abb: 19: Ausstrich Antibiotika-haltige Clots und Clot-Überstand.

Abbildung 20 präsentiert auch in der Kombination von Plasmaclots mit Ag-Acetat einen deutlich sichtbaren anti-adhäsiven Effekt allerdings nur bei sehr hohen Konzentrationen (200µg/ml – 500µg/ml) beim Clot-Ausstrich. Desweiteren zeigte sich bei diesen hohen Konzentrationen eine bakterizide Wirksamkeit nach Ausstrich des Clot-Überstands. Die Konzentrationen 100µg/ml und 50µg/ml wiesen eine sichtbare Reduzierung der Adhärenz beim Clot-Ausstrich und eine Keim-Reduzierung von ca. 95% bei 100µg/ml und ca. 50% bei 50µg/ml im Clot-Überstand auf.

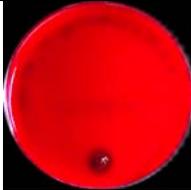
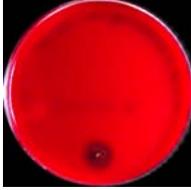
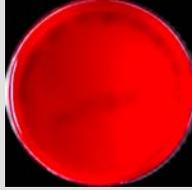
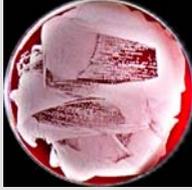
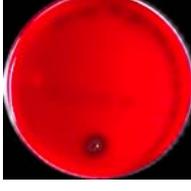
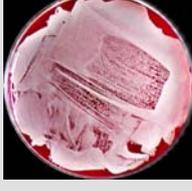
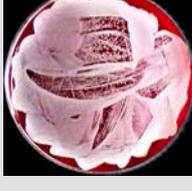
Ausstrich Clots mit Ag-Acetat	Austrich Clot-Überstand	Ausstrich Clots mit Ag-Acetat	Austrich Clot-Überstand
 500µg/ml	 500µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml
 400µg/ml	 400µg/ml	 20µg/ml	 20µg/ml
 300µg/ml	 300µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml
 200µg/ml	 200µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml
 100µg/ml	 100µg/ml	 Kontrollclot	 Kontrollclot

Abb: 20: Ausstrich Clots mit unterschiedlichen Ag-Acetat-Konzentrationen und Clot-Überstand. Zusätzlich Austrich Kontrollclot ohne Ag-Acetat und Überstand.

Bei den PVP-Ag-NP konnte im Plasmaclot aufgrund des Herstellungsprozesses nur eine Konzentration von 80µg/ml erreicht werden. Abbildung 21 stellt nur die höchsten Konzentrationen (50µg/ml und 80µg/ml) im Vergleich zum Kontrollclot dar.

Die Inkorporation von PVP-Ag-NP führte in diesen Konzentrationen zu keinem anti-adhäsiven Effekt und zeigte keine antimikrobielle Wirksamkeit nach Ausstrich des Clot-Überstands.

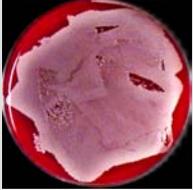
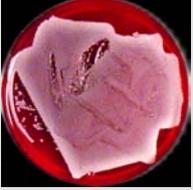
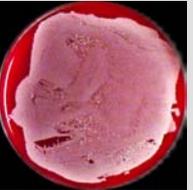
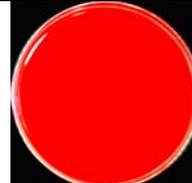
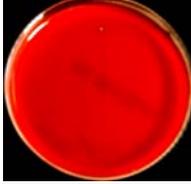
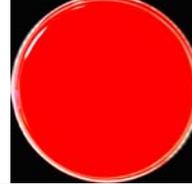
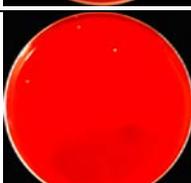
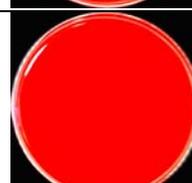
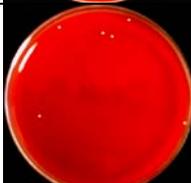
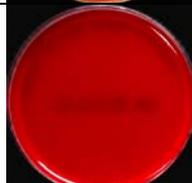
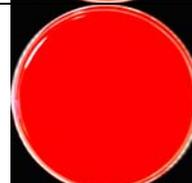
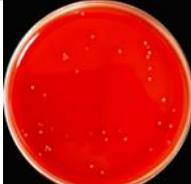
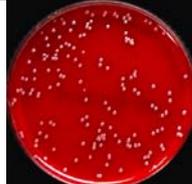
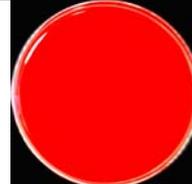
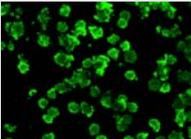
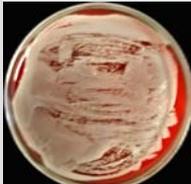
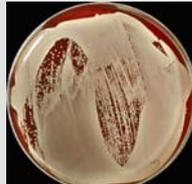
	Ausstrich Ag-NP-Clots	Ausstrich Überstand Clots
80µg/ml	 80µg/ml	
50µg/ml	 50µg/ml	
Kontrollclot		

Abb. 21: Ausstrich Plasmaclots mit 80µg/ml und 50µg/ml PVP-Ag-Nanopartikeln und Clot-Überstand. Zusätzlich Austrich Kontrollclot ohne Nanopartikel und Überstand.

5.5.2 Wachstumsverhalten und Viabilität der Testkeime auf den wirkstoffbeladenen Plasmaclots

Bei den Antibiotika-haltigen Plasmaclots waren nach 18 Stunden auf der Clot-Oberfläche keine Keime detektierbar. Auch im Clot-Überstand war bei Gentamicin in allen Konzentrationen (5µg/ml-100µg/ml) sowie bei Vancomycin bis 10µg/ml kein bakterielles Wachstum nachweisbar. Linezolid-haltige Clots zeigten bei 100µg/ml und 50µg/ml einen bakteriziden Effekt im Clot-Überstand und eine gute bakterio-statische Wirkung bei 25µg/ml bis 5µg/ml. Auf der Oberfläche und im Überstand von Antibiotika-freien Kontrollclots war das Keimwachstum dagegen ungehemmt (Abb. 22).

Oberfläche Linezolid-Clot	Überstand Linezolid-Clot	Oberfläche Vanco-Clot	Überstand Vanco-Clot	Oberfläche Genta-Clot	Überstand Genta-Clot
 100µg/ml		 100µg/ml		 100µg/ml	
 50µg/ml		 50µg/ml		 50µg/ml	
 25µg/ml		 25µg/ml		 25µg/ml	
 10µg/ml		 10µg/ml		 10µg/ml	
 5µg/ml		 5µg/ml		 5µg/ml	
 Oberfläche Kontrollclot	 Überstand Kontrollclot	 Keimausgangs- Konzentration 1×10^3 CFU/ml	 Keimausgangs- Konzentration 1×10^3 CFU/ml nach 24h	Abb: 22: Viabilität des Test- keims auf Antibiotika-haltigen Plasmaclots sowie Ausstrich der Clot-Überstände auf Blut- agarplatten.	

Die Oberflächen von Ag-Acetat-haltigen Plasmaclots wiesen bis zu einem Ag-Gehalt von 20µg/ml keine antimikrobielle Wirkung auf. Bei einem Ag-Gehalt von 40µg/ml – 80µg/ml kam es im Vergleich zum Kontrollclot zu einer Reduzierung des Bakterienwachstums (Ab. 23).

	Oberfläche Ag-Acetat-Clot	Überstand Ag-Acetat-Clot	Oberfläche Ag-NP-Clot	Überstand Ag-NP-Clot
Ag-Gehalt: 80µg/ml				
Ag-Gehalt: 50µg/ml				
Ag-Gehalt: 40µg/ml				
Ag-Gehalt: 20µg/ml				
Ag-Gehalt: 10µg/ml				
Ag-Gehalt: 5µg/ml				
Kontrollclot				
			Keimausgangs- Konzentration 1 x10 ³ CFU/ml	Keimausgangs- Konzentration 1 x10 ³ CFU/ml nach 24h

Abb: 23: Viabilität des Testkeims auf Ag-Acetat- und PVP-Ag-NP-haltigen Plasmaclots sowie Ausstrich der Clot-Überstände auf Blutagarplatten. Um eine Vergleichbarkeit von beiden Substanzen zu erhalten, wurde der Silbergehalt von Ag-Acetat berechnet und die gleichen Ag-Konzentrationen wie bei den PVP-Ag-NP eingesetzt.

PVP-Ag-NP-haltige Plasmaclots zeigten auf ihrer Oberfläche eine Keimreduzierung, die bei allen Konzentrationen (5µg/ml – 80µg/ml) gleich blieb. Im Clot-Überstand war sowohl bei Ag-

Acetat als auch bei PVP-Ag-NP im Vergleich zum Kontrollclot das Bakterienwachstum ungehemmt (Abb. 23).

5.5.3 Wachstumsverhalten und Viabilität der Testkeime in Plasmaclots mit PVP-Ag-Nanopartikeln und Silberacetat

Nach Integration von Keimen in Ag-Acetat-haltige Plasmaclots mit einem Silbergehalt von 5µg/ml zeigten sich zahlreiche vitale (grün gefärbte) Bakterien, die große Kolonien bildeten. Ab einem Silbergehalt von 10µg/ml kam es in Ag-Acetat-Clots zu einer Wachstumshemmung der Keime und es waren vermehrt avitale (rot gefärbte) Bakterien detektierbar. Dagegen fanden sich in PVP-Ag-haltigen Plasmaclots überwiegend große Bakterienkolonien mit vitalen und wenigen avitalen Keimen bis zu einer Konzentration von 50µg/ml. Erst bei 80µg/ml wurde eine Wachstumshemmung der Keime sichtbar. Hier konnten hauptsächlich avitale und sehr wenige vitale Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 24).

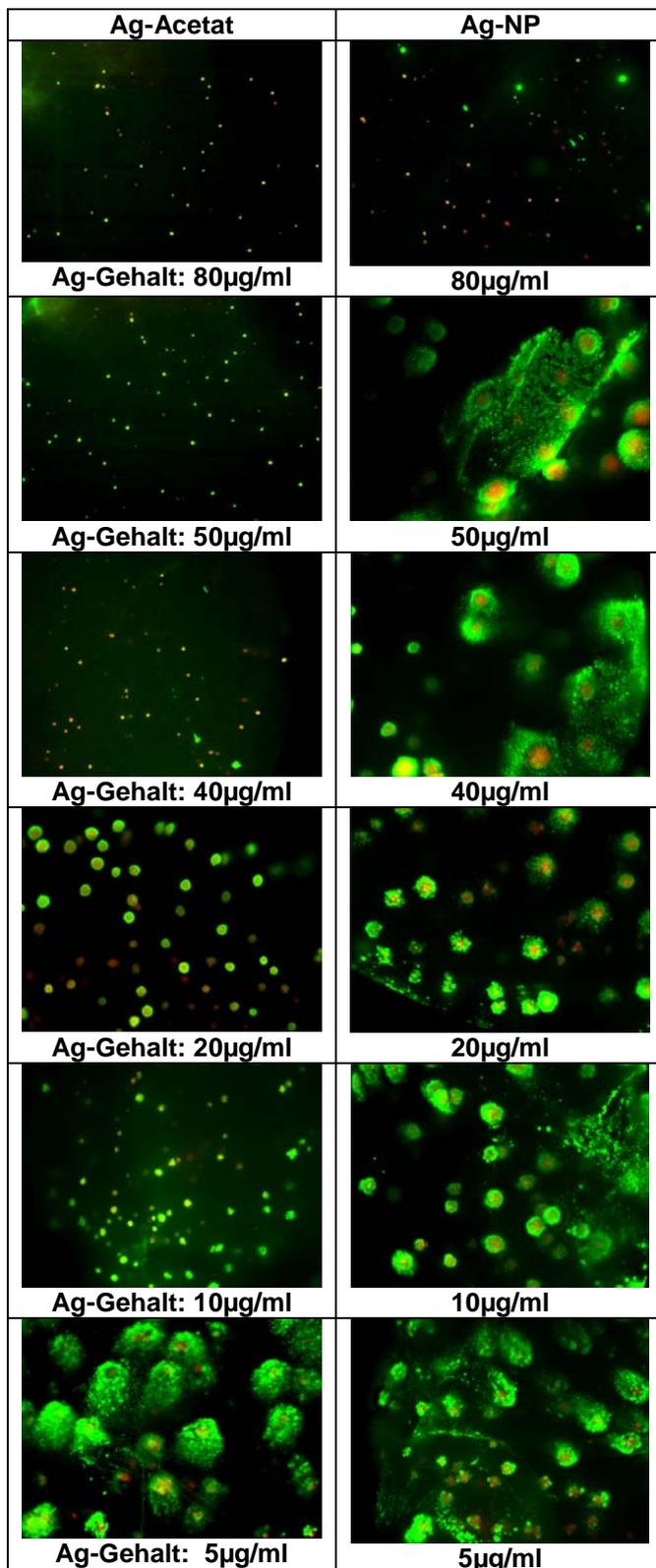


Abb: 24: Viabilität des Testkeims in Ag-Acetat- und PVP-Ag-NP-haltigen Plasmaclots. Um eine Vergleichbarkeit von beiden Substanzen zu erhalten, wurde der Silbergehalt von Ag-Acetat berechnet und die gleichen Ag-Konzentrationen wie bei den PVP-Ag-NP eingesetzt.

5.5.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Testkeime auf den Wirkstoff-beladenen Plasmaclots

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten auf der Oberfläche von Kontrollclots (ohne Wirkstoff) als auch auf der Oberfläche von Linezolid-haltigen Plasmaclots mit einer Linezolid-Ausgangskonzentration von 5µg/ml ein vermehrtes Bakterienwachstum (Abb. 25, 26). Dagegen fanden sich auf den Oberflächen von Clots mit höheren Linezolid-Konzentrationen (10-100µg/ml) sowie bereits bei Gentamicin- und Vancomycin-Clots mit der niedrigsten Konzentration (5µg/ml) nur vereinzelt liegende Keime (Abb. 26).

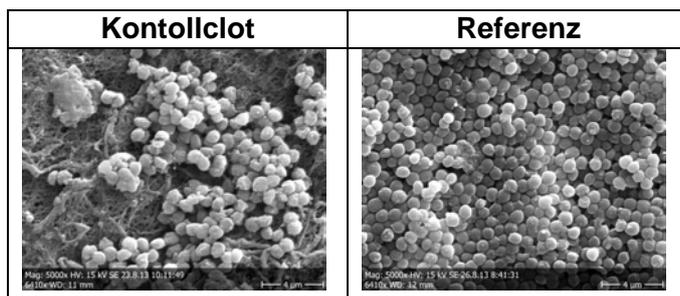
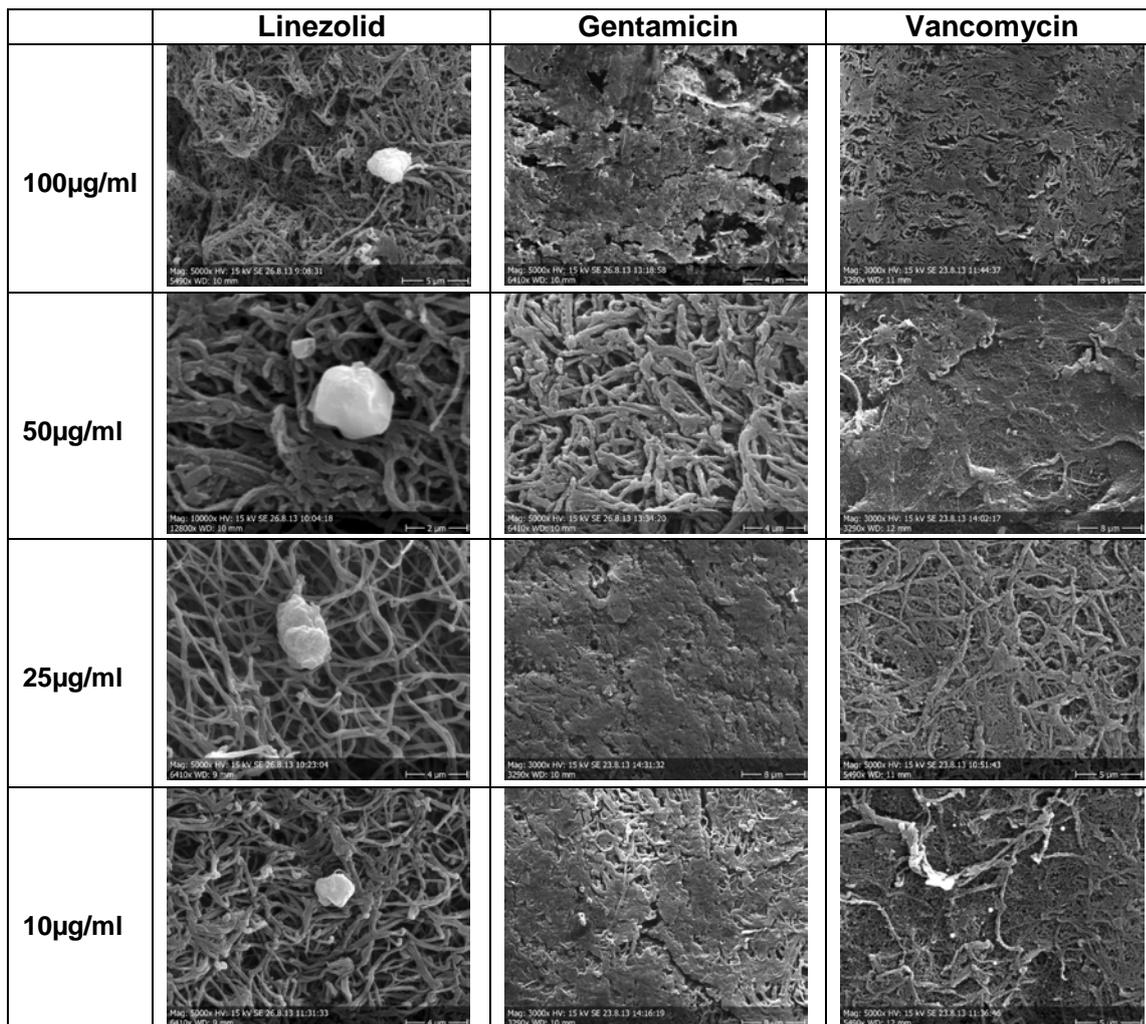


Abb. 25: Repräsentative Aufnahme von Testkeim *S. aureus* auf der Oberfläche eines Kontrollclots (links). Für ein Referenzbild (rechts) wurden Keime auf ein Glas-Deckgläschen ausgestrichen. (Vergrößerung x5000)



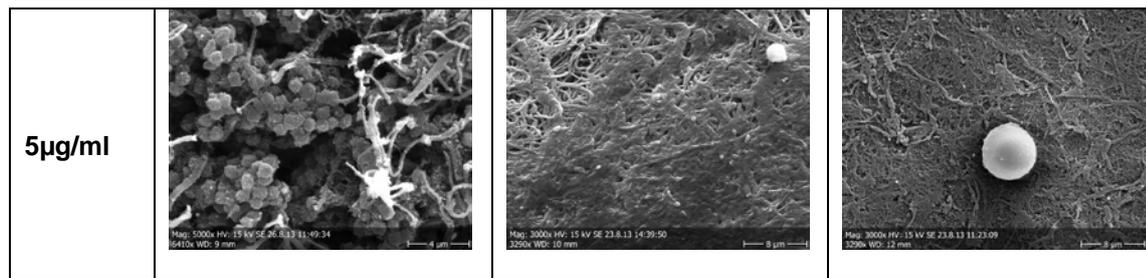


Abb. 26: Repräsentative Aufnahmen von *S. aureus* auf der Oberfläche von Antibiotika-haltigen Plasmaclots (Vergrößerung x5000).

5.5.5 *In-vitro* Empfindlichkeitstestung

Für die nachfolgenden Empfindlichkeitstestungen wurden in den ersten Schritten im Mikrodilutionstest bzw. Agardiffusionstest die methodischen Grundlagen für die antimikrobiellen Plasmaclots optimiert. Bei der Mikrodilution wurden die verschiedenen Einfluss-Parameter auf die MHK-Bestimmung hinsichtlich der Eignung von RPMI/10%FCS als Medium für die Bakteriensuspension sowie hinsichtlich der Eignung für den Einsatz von antimikrobiellen Plasmaclots untersucht. Desweiteren wurde die Standardisierbarkeit und die Praktikabilität (z.B. Ablesbarkeit von MHK-Werten in der Mikrotiterplatte nach der Inkubation) geprüft. Die Mikrodilution erwies sich dabei als eine einfach durchzuführende, verlässliche Methode zur standardisierten Empfindlichkeitstestung der antimikrobiellen Plasmaclots.

Die effizienteste Methode zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung der Wirkstoff-beladenen Plasmaclots mittels Agardiffusionstest war ein modifizierter Agardiffusionstest. Hierbei wurden die unterschiedlichen Plasmaclots direkt auf den Bakterienrasen der Müller-Hinton-Agarplatten gelegt und inkubiert. Dieser Ansatz erwies sich als günstig und repräsentierte zusätzlich noch die physiologische Situation.

Beide eingesetzten *in-vitro*-Empfindlichkeitstestungen erwiesen sich als geeignet, das antimikrobielle Potential bezüglich der bakteriostatischen und bakteriziden Wirksamkeit von Wirkstoff-beladenen Plasmaclots nachzuweisen.

5.5.4.1 Mikrodilution

Unter Berücksichtigung der MHK-Resultate erwiesen sich die eingesetzten Antibiotika-Einzelsubstanzen *in vitro* als hochwirksam gegenüber dem Testkeim *Staphylococcus aureus*. Die MHK-Werte lagen alle bei $\leq 5\mu\text{g/ml}$. Darüber hinaus bestätigte sich eine hohe Gentamicin-Wirksamkeit ($\text{MHK} \leq 5\mu\text{g/ml}$) im Plasmaclot. Die Vancomycin-MHK im Plasmaclot von $\geq 10\mu\text{g/ml}$ war niedriger als von Linezolid ($\leq 50\mu\text{g/ml}$). Im Vergleich zur Einzelsubstanz zeigten diese beiden Antibiotika höhere MHK-Werte im Plasmaclot (Tab. 11).

Tabelle 11: Vergleich der MHK-Werte der antimikrobiellen Einzelsubstanz mit den MHK-Werten der antimikrobiellen Plasmaclots.

Wirkstoff	MHK Einzelsubstanz	MHK Plasmaclot
Linezolid	≤ 5µg/ml	≥50µg/ml
Vancomycin	≤ 5µg/ml	≥10µg/ml
Gentamicin	≤ 5µg/ml	≤5µg/ml
Ag-Acetat	≥10µg/ml	≥100µg/ml
PVP-NP	≥20µg/ml	-

Tabelle 12 stellt die MBK-Werte der antimikrobiellen Einzelsubstanzen im Vergleich zum Plasmaclot mit integrierten Wirkstoffen dar. Die MBK-Werte lagen bei Vancomycin und Gentamicin bei Verwendung der Einzelsubstanzen und beim Plasmaclot mit Gentamicin im Bereich der MHK-Werte bei ≤ 5µg/ml. Beim Plasmaclot mit Vancomycin war der MBK-Wert zwei Verdünnungsstufen höher (≥ 25µg/ml). Beim Einsatz von Linezolid wurde eine deutliche bakteriostatische Wirkung erzielt, es konnte jedoch kein konzentrationsabhängiger Effekt auf Staphylococceen, die Konzentrationen zwischen dem 2- bis 60-fachen der MHK ausgesetzt waren, gezeigt werden (Abb. 29 Antibiotika-Einzelsubstanz). Hier konnte eine Keimreduzierung von ca. 90%-95% erreicht werden. Bis zur 10-fachen MHK konnte nach Inkorporation von Linezolid in Plasmaclots eine Keimreduzierung (ca. 90%-95%) erzielt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass kein Wirkungsverlust nach Inkorporation von Gentamicin in eine Plasmaclot-Matrix bzw. ein geringer Wirkungsverlust bei Vancomycin und Linezolid eintritt.

Tabelle 12: Vergleich der MBK-Werte der antimikrobiellen Einzelsubstanz mit den MBK-Werten der antimikrobiellen Plasmaclots.

Wirkstoff	MBK Einzelsubstanz	MBK Plasmaclot
Linezolid	-	-
Vancomycin	≤ 5µg/ml	≥25µg/ml
Gentamicin	≤ 5µg/ml	≤ 5µg/ml
Ag-Acetat	10µg/ml (Ag-Gehalt: 6,45µg/ml)	200µg/ml (Ag-Gehalt: 129µg/ml)
PVP-NP	≥20µg/ml	> 80µg/ml

Abbildung 27 zeigt repräsentative Aufnahmen von Blutagarplatten mit Clot-Ausstrich bzw. Ausstrich des Clot-Überstandes der Antibiotika-haltigen Plasmaclots und Abbildung 28 Blutagarplatten mit Ausstrich der Antibiotika-Einzelsubstanzen (Qualitätskontrolle).

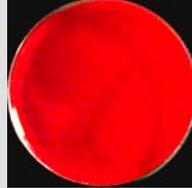
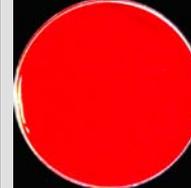
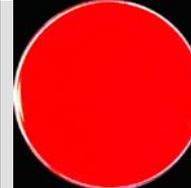
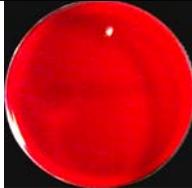
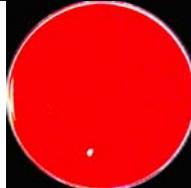
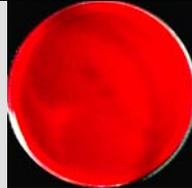
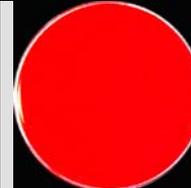
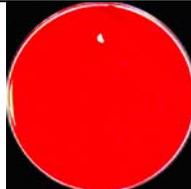
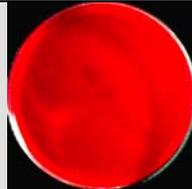
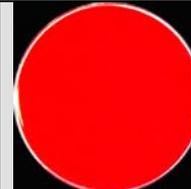
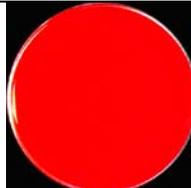
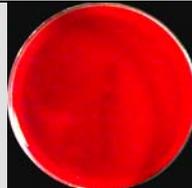
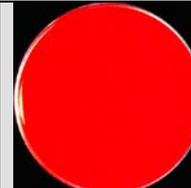
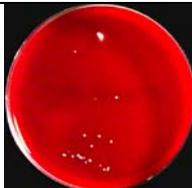
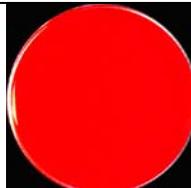
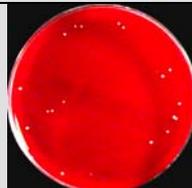
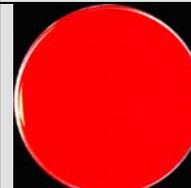
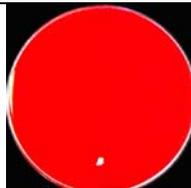
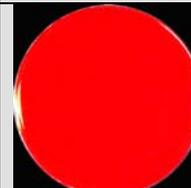
Ausstrich Clots mit			Ausstrich Überstand von Clots mit		
Linezolid	Vancomycin	Gentamicin	Linezolid	Vancomycin	Gentamicin
					
300µg/ml	300µg/ml	300µg/ml			
					
150µg/ml	150µg/ml	150µg/ml			
					
100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml			
					
50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml			
					
25µg/ml	25µg/ml	25µg/ml			
					
10µg/ml	10µg/ml	10µg/ml			
					
5µg/ml	5µg/ml	5µg/ml			

Abb: 27: Ausstrich der Antibiotika-haltigen Clots und des Clot-Überstands auf Blutagarplatten.

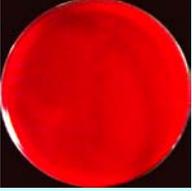
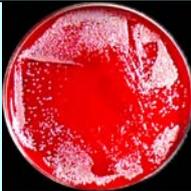
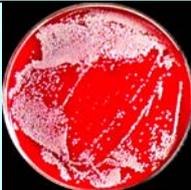
Qualitätskontrolle: Einzelsubstanz		
Linezolid	Vancomycin	Gentamicin
 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml
 150µg/ml	 150µg/ml	 150µg/ml
 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml
 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml
 25µg/ml	 25µg/ml	 25µg/ml
 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml
 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml

Abb: 28: Ausstrich der Qualitätskontrolle (Antibiotika-Einzelsubstanzen) auf Blutagarplatten.

Bei Verwendung von Ag-Acetat bzw. PVP-Ag-NP als Einzelsubstanz lagen die MHK-Werte für Ag-Acetat bei $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ und für PVP-Ag-NP bei $\geq 20 \mu\text{g/ml}$. Nach Inkorporation von Ag-Acetat in Plasmaclots war der MHK-Wert 10-fach erhöht ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) (Tab. 11). Die MHK für PVP-Ag-NP im Plasmaclot wurde nicht erreicht, da die eingesetzte Ausgangskonzentration von $80 \mu\text{g/ml}$ Clotgemisch – bedingt durch die Nanopartikel-Synthese - zu niedrig war (Tab. 11).

Bei Einsatz der Einzelsubstanz zeigte Ag-Acetat eine bakterizide Wirksamkeit (MBK) gegenüber dem Testkeim bis $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ (Ag-Gehalt = $6,24 \mu\text{g/ml}$). Diese Wirksamkeit wurde nach Integration von Ag-Acetat in Plasmaclots stark reduziert, jedoch nicht aufgehoben. Der MBK-Wert war 20-fach erhöht und lag bei $200 \mu\text{g/ml}$ (Ag-Gehalt = $129 \mu\text{g/ml}$) (Tab. 12). Der MBK-Wert von PVP-Ag-NP als Einzelsubstanz lag bei $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ und nach Kombination in Plasmaclots wurde die MHK aus den oben bereits erwähnten Gründen nicht erzielt (Tab. 12).

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Inkorporation von Silberionen (Ag-Acetat) in Plasmaclots die bakterizide Wirksamkeit erheblich reduziert und ein bakterizider Effekt nur bei Einsatz von sehr hohen, zelltoxischen Konzentrationen erreicht wird (siehe Kapitel 5.5.5.1). Die bakterizide Wirkung von Silberkationen beruht auf der Komplexbildung mit Bakterien-Proteinen. Struktur- und Funktionsverlust der Bakterienmembran, Interaktion mit dem Enzymsystem und der RNA/DNA führen zum Zelltod. Allerdings binden Silberkationen nicht spezifisch an Bakterienproteinen, sondern auch an alle zellulären (z.B. Stammzellen, Fibroblasten usw.) und nicht zellulären Proteinen (z.B. Serum, Blut, Fibrin). Daraus resultieren sowohl die effektive Bakterizidie als auch Zytotoxizität und der hohe, so genannte „Eiweißfehler“ d.h. der Verlust an antimikrobieller Wirksamkeit in Anwesenheit von freien Eiweißen.

In Abbildung 29 werden repräsentative Aufnahmen von Blutagarplatten mit Clot-Ausstrich bzw. Ausstrich des Clot-Überstandes der Ag-Acetat-haltigen Plasmaclots bzw. Blutagarplatten mit Ausstrich der Ag-Acetat-Einzelsubstanz (Qualitätskontrolle) dargestellt.

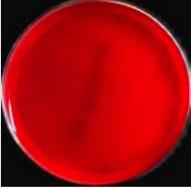
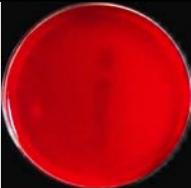
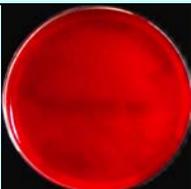
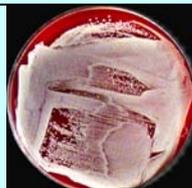
Ausstrich Clots mit Ag-Acetat	Ausstrich Überstand	Qualitätskontrolle	Ausstrich Clots mit Ag-Acetat	Ausstrich Überstand	Qualitätskontrolle
 500µg/ml	 500µg/ml	 500µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml
 400µg/ml	 400µg/ml	 400µg/ml	 20µg/ml	 20µg/ml	 20µg/ml
 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml
 200µg/ml	 200µg/ml	 200µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml
 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml	 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Ausgangskonz.: 5x10 ⁵ CFU/ml

Abb: 29: Ausstrich der Plasmaclots mit unterschiedlichen Ag-Acetat-Konzentrationen (weiß) und der Clot-Überstände (grau) bzw. Ausstrich der Qualitätskontrolle (Ag-Acetat-Einzelsubstanz) (hellblau).

Abbildung 30 demonstriert repräsentative Aufnahmen von Blutagarplatten mit Clot-Ausstrich bzw. Ausstrich des Clot-Überstandes der PVP-Ag-NP-haltigen Plasmaclots und Blutagarplatten mit Ausstrich der PVP-Ag-NP-Einzelsubstanz (Qualitätskontrolle).

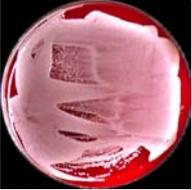
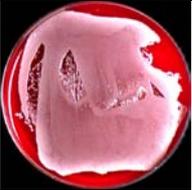
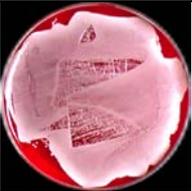
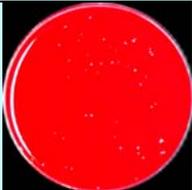
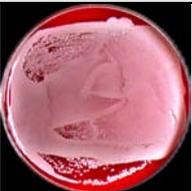
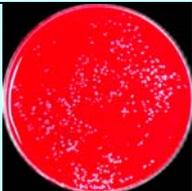
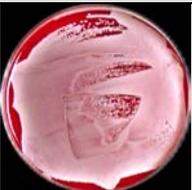
Ausstrich Clots mit Ag-NP	Ausstrich Überstand	Qualitätskontrolle
 80µg/ml	 80µg/ml	 80µg/ml
 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml
 40µg/ml	 40µg/ml	 40µg/ml
 20µg/ml	 20µg/ml	 20µg/ml
 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml
 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml
 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Ausgangskonz.: 5x10 ⁵ CFU/ml

Abb: 30: Ausstrich der Plasmaclots mit unterschiedlichen PVP-Ag-NP-Konzentrationen (weiß) und der Clot-Überstände (grau) bzw. Ausstrich der Qualitätskontrolle (PVP-Ag-NP-Einzelsubstanz) (hellblau).

5.5.4.2 Agardiffusion

Für jede Wirkstoffkonzentration wurde der Hemmhofdurchmesser ausgemessen. Die Grenze des Hemmhofes war dort, wo das Keimwachstum eindeutig gehemmt bzw. nicht mehr gehemmt wurde. Danach wurden die Ergebnisse tabellarisch dokumentiert und statistisch ausgewertet. Kam es zu keiner Hemmhofbildung, wurde dieser Effekt als Querstrich (-) angegeben. Tabellen, repräsentative Aufnahmen der entstandenen Hemmhöfe sowie die statistische Auswertung der Resultate werden detailliert in Anhang V dargestellt. Zusätzlich wird in Anhang V die Auswertung der Eluationsergebnisse, die mittels herkömmlichem Agardiffusionstest mit Filterpapier-Testblättchen erzielt wurden, dargestellt.

Bei Verwendung des modifizierten Agardiffusionstestes war die Antibiotika-Freisetzung aus den Plasmaclots konzentrationsabhängig: je höher die Antibiotikum-Konzentration, desto mehr Antibiotikum diffundierte heraus und desto größer war der Hemmhofdurchmesser. Der durchgeführte Spearman Rank Test bestätigte eine hoch signifikante Korrelation zwischen Antibiotikum-Konzentration und Hemmhofdurchmesser bei einer stündlichen Probenabnahme (Gentamicin: $r=0,6812$, $p<0,0001$; Vancomycin: $r=0,4719$, $p<0,005$; Linezolid: $r=0,7529$, $p<0,0001$). Dagegen korrelierten Antibiotika-Konzentration und Hemmhofdurchmesser bei der täglichen Probenabnahme nur bei Vancomycin signifikant ($r=0,6716$, $p<0,0001$). Bei Gentamicin ergab sich keine Korrelation ($r=0,2192$, ns).

In den Eluationsversuchen mit stündlichen Probenabnahmen und anschließendem modifizierten Agardiffusionstest war die Antibiotikafreisetzung initial direkt nach Clot-Polymerisation und einer Eluationszeit von 30 min am höchsten und die entsprechenden Hemmhöfe wiesen daher die größten Durchmesser auf. Bei den eingesetzten Antibiotika waren die Unterschiede der gemessenen Hemmhöfe in diesen beiden Zeitabschnitten in allen Konzentrationsstufen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, siehe Anhang V, Tab. 60). Plasmaclots mit $10\mu\text{g/ml}$ bis $100\mu\text{g/ml}$ Gentamicin wiesen ab 1h eine retardierte Gentamicin-Freisetzungskinetik mit nahezu konstanter Dosis auf und zeigten gering variierende Hemmhofdurchmesser pro Konzentrationsstufe und Zeiteinheit. Dagegen bildeten Clots mit einer Gentamicin-Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ nur bis 3h messbare Hemmhöfe (Abb. 31).

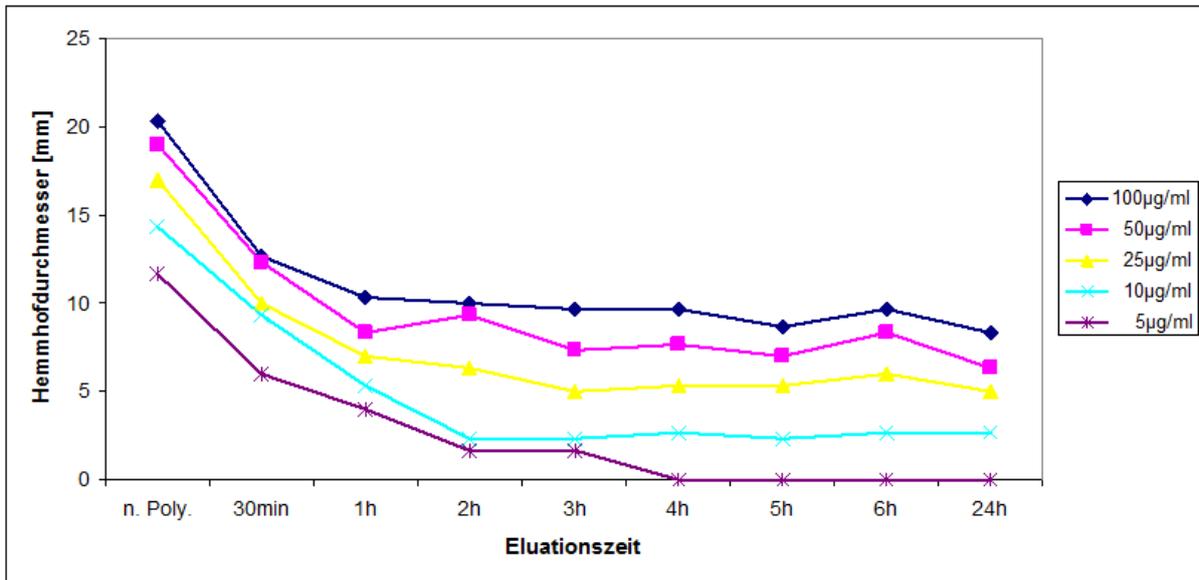


Abb. 31: Modifizierter Agardiffusionstest: Auflegen der Clots direkt auf Bakterienrasen. Hemmhofdurchmesser der Gentamicin-haltigen Plasmaclots (100µg/ml – 5µg/ml) nach Polymerisation und nach einer Eluationszeit von 30 min, 1h-6h und 24h.

Bei Linezolid-haltigen Plasmaclots mit einer Konzentration von 25µg/ml – 100µg/ml kam es dagegen zu einer sehr schnellen Antibiotikafreisetzung innerhalb von 3h mit entsprechenden, fast linear abfallenden Hemmhofdurchmessern. Bei Clots mit einer Linezolid-Konzentration von 5µg/ml und 10µg/ml wurde ein Hemmhof nur bis 30 min sichtbar (Abb. 32).

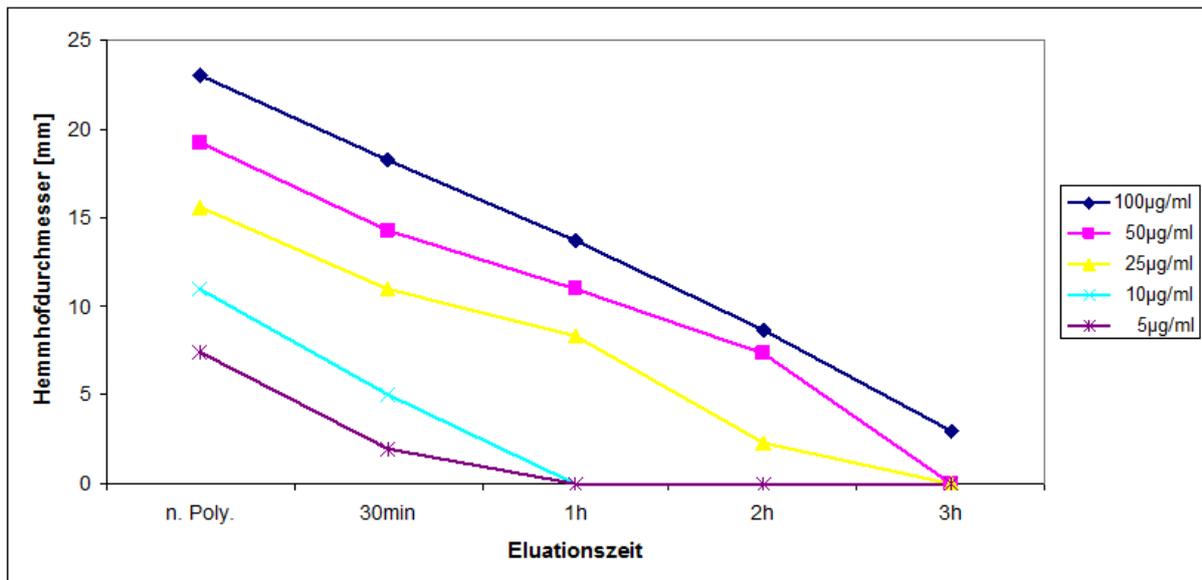


Abb. 32: Messung der Hemmhöfe im modifizierten Agardiffusionstest: Clots mit Linezolid (100µg/ml – 5µg/ml) nach Polymerisation und einer Eluationszeit von 30 min und 1h-3h.

Plasmaclots mit 50µg/ml und 100µg/ml Vancomycin zeigten in einem Zeitraum von 6h kontinuierlich abnehmende Hemmhofdurchmesser. Bei einer Vancomycin-Konzentration von 25µg/ml waren Hemmhöfe nur bis 4h und bei 5µg/ml – 10µg/ml bis 3h detektierbar (Abb. 33).

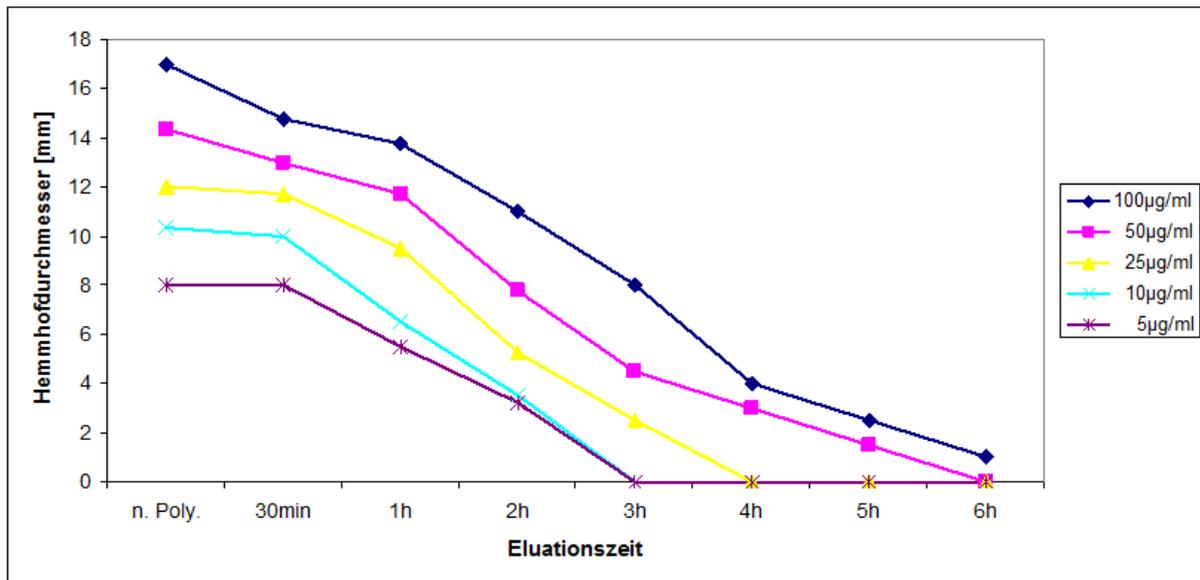


Abb. 33: Messung der Hemmhöfe im modifizierten Agardiffusionstest: Clots mit Vancomycin (100µg/ml – 5µg/ml) nach Polymerisation und einer Eluationszeit von 30 min und 1h-6h.

Beim Vergleich zwischen Clots, hergestellt mit 100µg/ml und 50µg/ml Gentamicin bzw. Vancomycin, zeigten sich beim Hemmhofdurchmesser nach 5h signifikante Unterschiede (100µg/ml: $p < 0,05$ und 50µg/ml: $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Auch nach 6h war der Unterschied zwischen Gentamicin- und Vancomycin-Clots bei einer Konzentration von 100µg/ml im Mann-Whitney-U-Test signifikant ($p < 0,05$). Eine detaillierte statistische Auswertung befindet sich in Anhang V, Tabelle 60.

In den Eluationsversuchen mit täglichen Probenabnahmen und anschließendem modifizierten Agardiffusionstest war die Gentamicin- bzw. Vancomycin-Freisetzung initial direkt nach Clot-Polymerisation am höchsten und die entsprechenden Hemmhöfe wiesen daher die größten Durchmesser auf (Abb. 34 und 35). In Abbildung 34 und 35 sind zwei unterschiedliche Kurvenverläufe der Hemmhofdurchmesser von Gentamicin- und Vancomycin Clots erkennbar. Gentamicin-Clots mit einer Ausgangskonzentration von 50µg/ml -300µg/ml zeigen einen flachen kontinuierlichen Verlauf, während bei Vancomycin-Clots mit einer Ausgangskonzentration von 150µg/ml – 300µg/ml nach einem flacheren Kurvenabschnitt innerhalb der ersten beiden Stunden ein rascher Abfall der Hemmhofdurchmesser folgt. Desweiteren erzeugten Gentamicin-Clots über die gesamte Testdauer größere Hemmhöfe als Vancomycin-Clots. Beim Vergleich zeigten sich aber nur beim Hemmhofdurchmesser direkt nach der Polymerisation signifikante Unterschiede (150µg/ml: $p < 0,05$; 100µg/ml: $p < 0,05$; 25µg/ml: $p < 0,05$; 10µg/ml: $p < 0,05$ und 5µg/ml: $p < 0,05$).

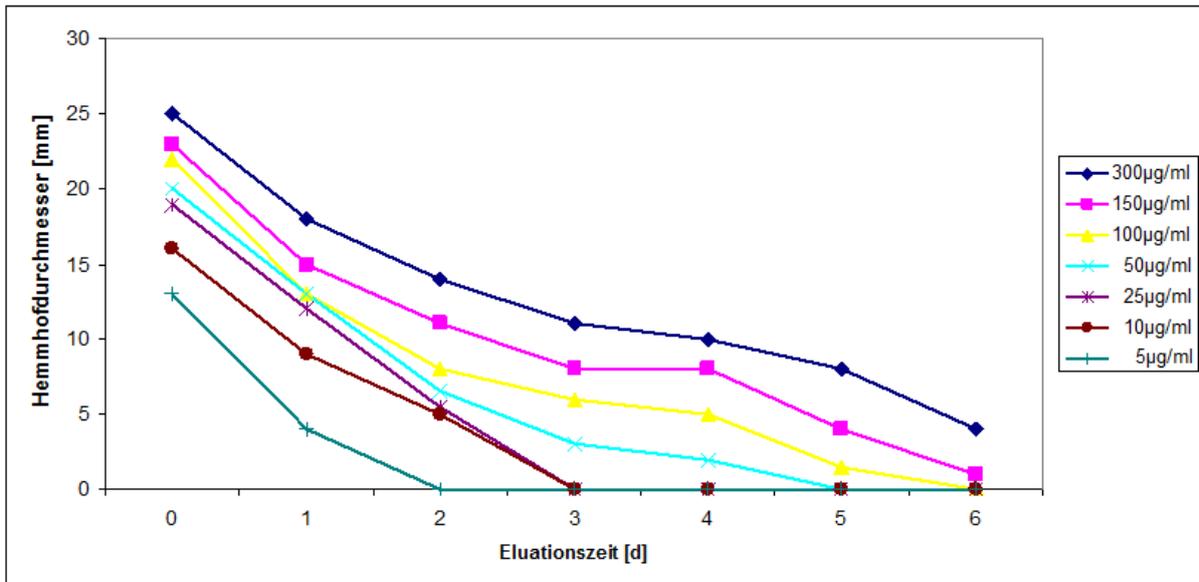


Abb. 34: Messung der Hemmhöhe im modifizierten Agardiffusionstest: Clots mit Gentamicin (300µg/ml – 5µg/ml) nach Polymerisation und einer Eluationszeit von 1-6 Tagen.

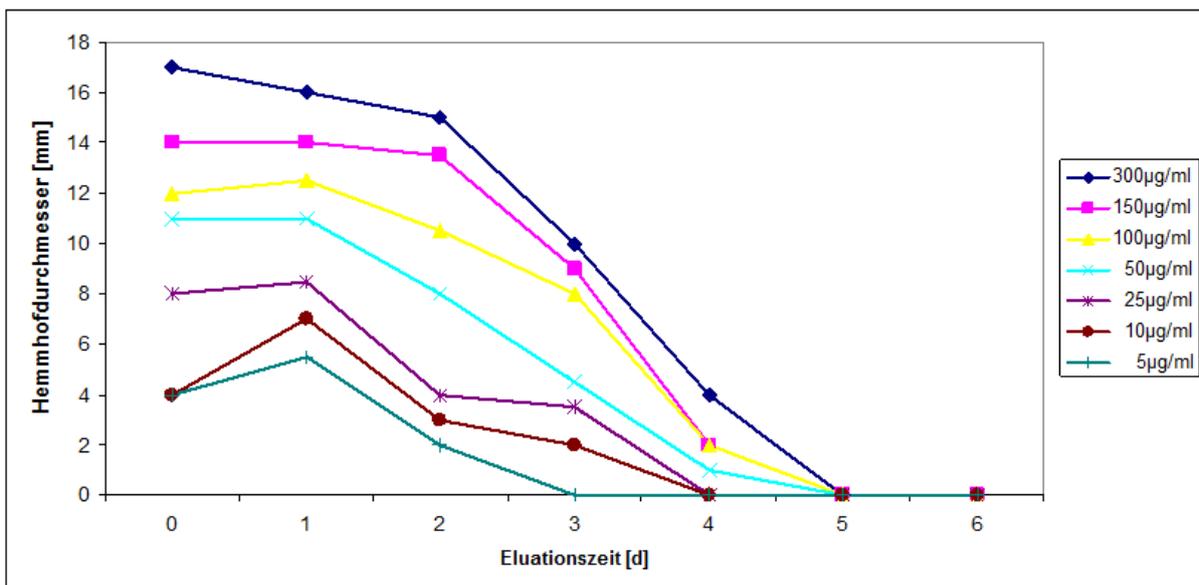


Abb. 34: Messung der Hemmhöhe im modifizierten Agardiffusionstest: Clots mit Vancomycin (300µg/ml – 5µg/ml) nach Polymerisation und einer Eluationszeit von 1d-6d.

Beim Vergleich der mittels Agardiffusionstest und HPLC erhaltenen Ergebnisse stellt sich erwartungsgemäß ein enger statistischer Zusammenhang im Spearman Rank Test dar. Die errechnete Gesamtkorrelation für alle Paare der beiden Methoden Agardiffusionstest und HPLC betrug $r = 0,9087$ mit einer hohen Signifikanz von $p < 0,001$. Es ergaben sich fast zu allen Messzeitpunkten sehr gute Korrelationswerte (siehe Anhang V).

Die Freisetzungsprofile von Ag-Acetat und PVP-Ag-NP waren ähnlich wie beim Mikrodilutionstest. Ganz offensichtlich verhinderte der Plasmaclot die Freisetzung von Silberionen. Nur bei initial sehr hohen Ag-Acetat-Konzentrationen von 200µg/ml bis 500µg/ml zeigten sich messbare Hemmhöfe über einen Untersuchungszeitraum von 4 Tagen. Bei einer Ag-Acetat-Konzentration von 500µg/ml (Silbergehalt = 322,6µg/ml) waren die Hemmhofdurchmesser zu allen Zeitpunkten gleich. Dagegen nahmen die Hemmhofdurchmesser von Plasmaclots mit einer Ag-Acetat-Konzentration von 400µg/ml – 200µg/ml kontinuierlich ab. Ab einer Konzentration von 100µg/ml waren keine Hemmhöfe detektierbar (Abb. 36).

Nach Inkorporation von PVP-Ag-NP (5µg/ml – 80µg/ml) wurden keine Hemmhöfe sichtbar.

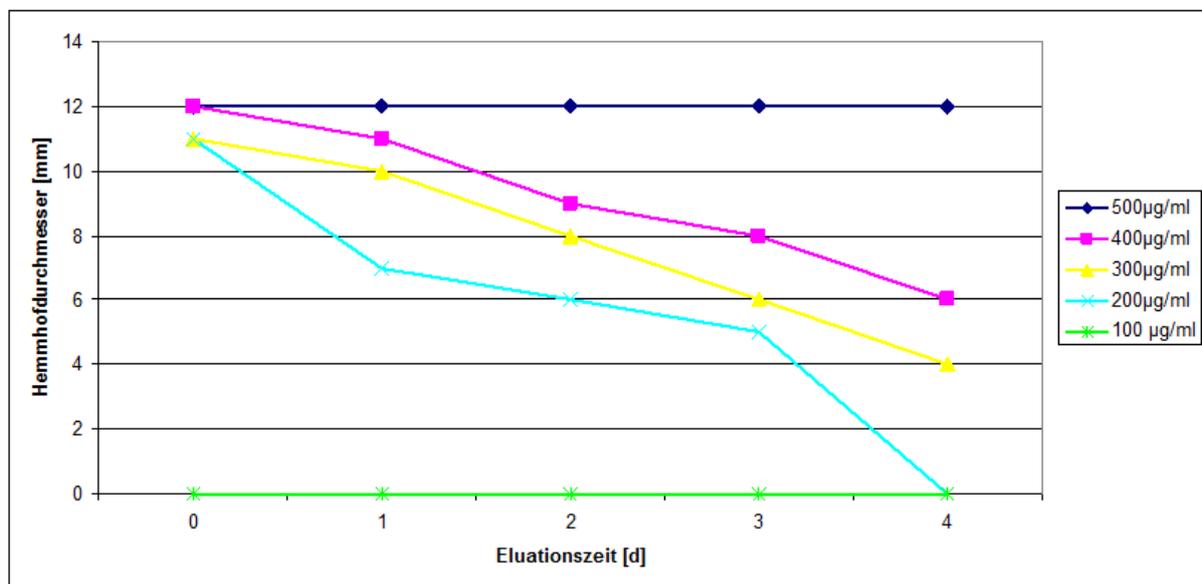


Abb. 36: Messung der Hemmhöfe im modifizierten Agardiffusionstest: Clots mit Ag-Acetat (500µg/ml – 100µg/ml) nach Polymerisation und einer Eluationszeit von 1d-4d.

5.5.5 Überprüfung der Toxizität der eingesetzten Wirkstoffe in der Zellkultur

5.5.5.1 Zellviabilität von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Plasmaclot mit unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen

Neben der antimikrobiellen Wirksamkeit der unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen ist es besonders wichtig, auch die mögliche Zytotoxizität dieser Substanzen auf humane Zellen zu untersuchen.

Abbildung 37 zeigt, dass die Zellviabilität von MSC im Plasmaclot durch die Anwesenheit von den verwendeten Antibiotika im untersuchten Zeitraum nicht beeinträchtigt wurde.

Dagegen zeigte Ag-Acetat nach Inkorporation im Plasmaclot eine toxische Wirkung auch bei geringen Konzentrationen bis 5µg/ml und PVP-Ag-NP bis zu 10µg/ml. Bei einer Ag-Acetat-Konzentration von 10µg/ml bzw. bei einer PVP-Ag-NP-Konzentration von 20µg/ml kam es

zu einer Proliferationsreduzierung und es wurden Änderungen der Zellstruktur und Zellgröße sichtbar.

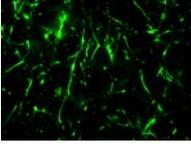
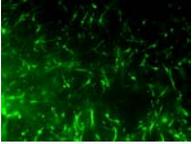
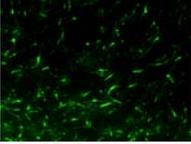
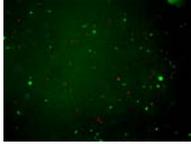
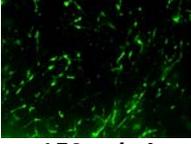
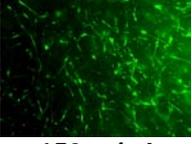
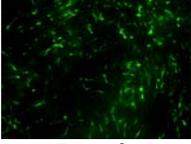
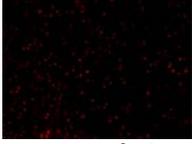
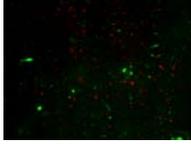
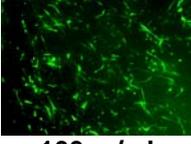
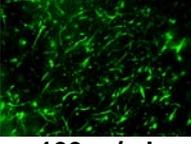
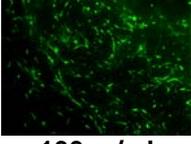
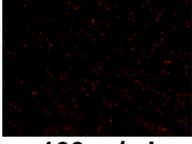
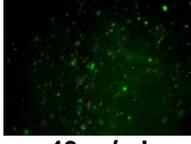
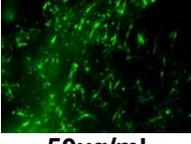
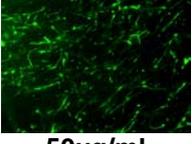
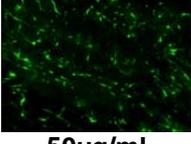
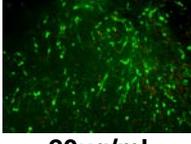
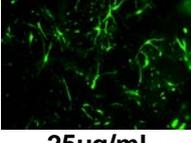
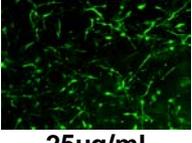
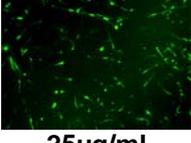
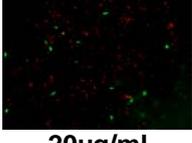
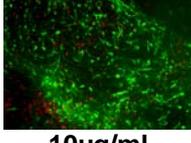
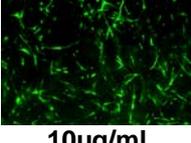
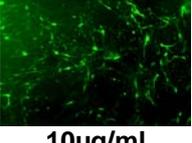
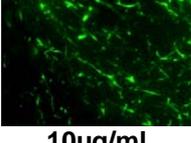
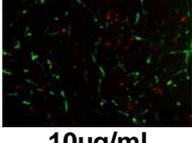
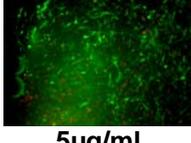
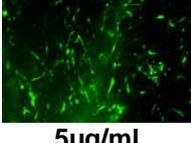
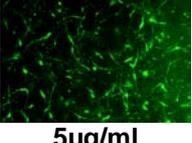
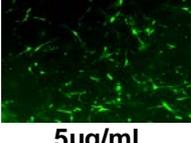
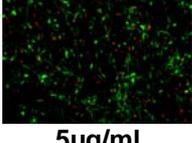
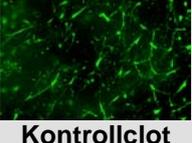
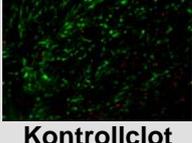
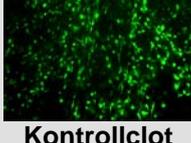
Linezolid	Vancomycin	Gentamicin	Ag-Acetat	Ag-NP
 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml	 80µg/ml
 150µg/ml	 150µg/ml	 150µg/ml	 200µg/ml	 50µg/ml
 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml	 40µg/ml
 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml	 20µg/ml
 25µg/ml	 25µg/ml	 25µg/ml	 20µg/ml	 10µg/ml
 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml	 5µg/ml
 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml	
 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Kontrollclot

Abb. 37: Zellviabilität im Plasmaclot nach 7 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration der Wirkstoffe. Vitale MSC sind grün und avitale Zellen rot gefärbt.

Aufgrund der erhobenen Daten wird verdeutlicht, dass sowohl Ag-Acetat- als auch Ag-NP-haltige Plasmaclots bei hohen Silberkonzentrationen (Ag-Acetat: 300µg – 5µg/ml; PVP-Ag-NP: 80µg – 10µg) einen zytotoxischen Effekt auf MSC zeigen und nicht biokompatibel waren. Diese Ergebnisse werden durch andere Studien belegt.

Es wurden zahlreiche Studien auch anderer Arbeitsgruppen durchgeführt, die die Biokompatibilität und die mögliche Zytotoxizität von Ag-haltigen Biomaterialien untersuchten. Einerseits wird die Zytotoxizität von Silber in zahlreichen Studien beschrieben, andererseits gibt es auch viele Studien, die keine Anzeichen von Toxizität bis zu einem bestimmten Schwellwert aufzeigen. Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen können jedoch nicht miteinander verglichen werden, da jede einzelne Studie mit unterschiedlichen Silberkonzentrationen, Nanopartikelgrößen und -formen, mit unterschiedlichen Zelllinien und unterschiedlichen Carrier, uneinheitlichen Versuchsbedingungen sowie -parametern durchgeführt wurden.

Albers, C.E. und Mitarbeiter zeigten u.a. in ihrer Studie dosisabhängige zytotoxische Effekte von Silberionen (0,5µg – 500µg/ml) und Silber-Nanopartikeln (8µg – 500µg/ml) auf Osteoblasten und Osteoklasten, die zu einer deutlichen Beeinflussung der Zellviabilität und -differenzierung in vitro führten. Sie beobachteten eine Dosiskorrelation der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. epidermidis* mit den zytotoxischen Effekten auf Osteoblasten sowie auf Osteoklasten (2013).

Chen und Mitarbeiter untersuchten die Zytotoxizität von silberbeladenen Hydroxylapatitbeschichtungen, die mit Fibroblasten kultiviert wurden. Auch hier hatten die Beschichtungen bis zu einem Silbergehalt von 5 Gew.-% keine toxischen Auswirkungen auf die Zellen [Chen, Y et al. 2008]. In einer weiteren Studie demonstrierten Chen, W. et al., dass silberhaltige Hydroxylapatit-Beschichtungen mit 1 Gew.-% Silber keinen toxischen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von menschlichen embryonalen Gaumenmesenchymzellen (HEPM) haben [2006, 2007].

5.5.5.2 Ko-Inkubation von MSC mit Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen

Im Vergleich zu den Kontrollclots störten Antibiotika-haltige Clots nicht das Zellwachstum. Bei einer Ag-Acetat-Konzentration von 5µg/ml und 10µg/ml kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Proliferationsreduzierung. Bei Ag-Acetat-Konzentrationen von 20µg/ml bis 300µg/ml kam es zu einer massiven Zellwachstumsstörung und es wurden Änderungen der Zellstruktur und Zellgröße der verbleibenden Einzelzellen sichtbar (Abb. 38).

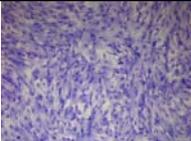
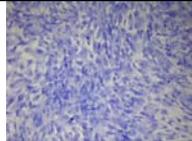
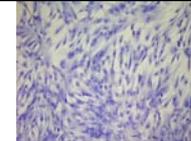
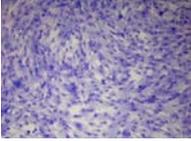
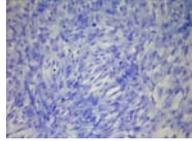
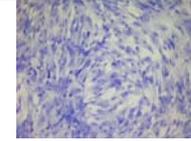
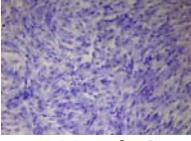
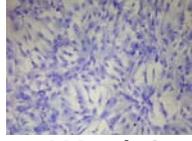
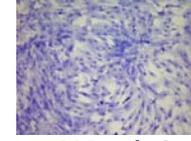
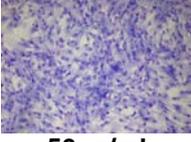
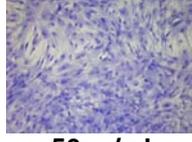
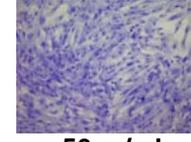
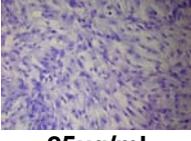
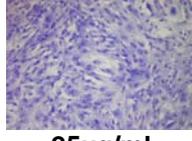
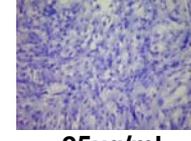
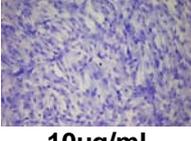
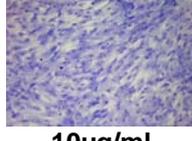
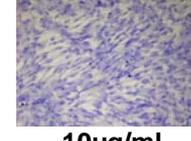
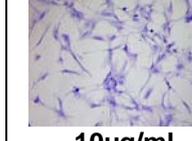
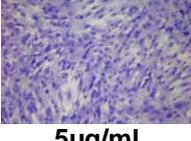
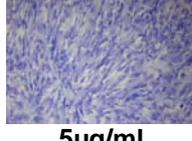
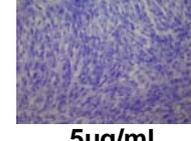
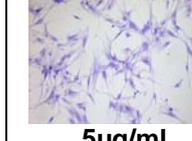
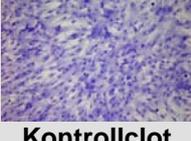
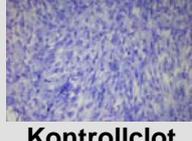
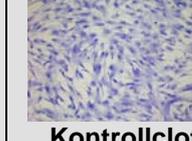
Linezolid	Vancomycin	Gentamicin	Ag-Acetat
 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml	 300µg/ml
 150µg/ml	 150µg/ml	 150µg/ml	 200µg/ml
 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml	 100µg/ml
 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml	 50µg/ml
 25µg/ml	 25µg/ml	 25µg/ml	 20µg/ml
 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml	 10µg/ml
 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml	 5µg/ml
 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Kontrollclot	 Kontrollclot

Abb. 38: Ko-Inkubation von MSC mit Plasmaclots mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen über einen Zeitraum von 7 Tagen. (Färbung nach Pappenheim).

6. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Ergebnisse, Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen. Ggf. Beschreibung der Konsequenzen für das Vorhaben.

Für das Vorhaben relevante Ergebnisse, Veröffentlichungen und Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen liegen nicht vor.

7. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen, Beschreibung der Relevanz der Ergebnisse für die gesetzliche Unfallversicherung insbesondere im Hinblick auf die Praxisverknüpfung.

7.1 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von wirkstoffbeladenen autologen Plasmaclots für eine Deposition und Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen (Vancomycin, Gentamicin, Linezolid, Nanosilber, Silberionen) im Bereich von Knochendefekten. Systematische Untersuchungen zum Einfluss der Wirkstoffbeladung auf die Eigenschaften der Plasmaclot-Matrix und die Wirkstofffreisetzung aus den Clots wurden durchgeführt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der beladenen Clots kamen sowohl analytische Messmethoden als auch mikrobiologische Methoden zum Einsatz.

Die Projektinhalte wurden entsprechend des Arbeitsplanes vollständig bearbeitet. Dabei konnten folgende wesentliche Erkenntnisse gewonnen werden, die für den klinischen Einsatz derartiger autologer antimikrobiell-wirkender Plasmaclots von Bedeutung sind:

Die Generierung von Plasmaclots mit Antibiotika (Vancomycin, Gentamicin, Linezolid) ist möglich und könnte auch im OP-Bereich erfolgen. Das Linezolid hat durch schlechte Bindung an die Clotmatrix die geringste Wirkzeit (innerhalb 3 h). Das Nanosilber sowie eingebettete Silberionen sind nicht geeignet, da die antimikrobielle Aktivität durch Bindung an Plasmaclotmatrix nicht mehr ausreichend ist.

7.2 Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnte das Potential der Plasmaclot-Matrix hinsichtlich Antibiotika-Beladung und -freisetzung aufgezeigt werden. Autologe Plasmaclots bieten zudem den Vorteil der variablen Wirkstoff-Beladung und ermöglichen dadurch eine gezielte Antibiotikabehandlung im Bereich von Knochendefekten. Desweiteren kann durch das Clot-Volumen und die Konzentration des eingebundenen Antibiotikums Einfluss auf die Freisetzungskinetik und auf die insgesamt freigesetzte Antibiotikummenge genommen werden. Auch die dargestellten

Eluationsversuche und Empfindlichkeitstestungen demonstrieren, dass die freigesetzten Antibiotika-Konzentrationen eine gute Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus aureus* haben.

In den Eluationsversuchen mit anschließender HPLC-Analyse weisen Plasmaclots mit 300µg/ml und 150µg/ml Gentamicin nach einem initialen Burst eine retardierte Gentamicin-Freisetzungskinetik bis zum 6. Tag noch im therapeutischen Bereich auf, ohne systemisch toxische Konzentrationen zu erreichen. Auch bei Plasmaclots mit 300µg/ml und 150µg/ml Vancomycin ist nach einem initialen Burst ein ausreichend hoher Wirkspiegel bis zum 4. Tag realisierbar.

Linezolid-haltige Plasmaclots sind dagegen nur zur Kurzzeitversorgung geeignet wie z.B. als Prophylaxe für offene Frakturen oder Osteomyelitiden. Hier ist klinisch eine schnelle Antibiotikafreisetzung günstig. Für die Behandlung z.B. einer Osteomyelitis ist es erforderlich, dass schon gleich nach Débridement und Implantateinsatz Antibiotikum freigesetzt wird, um Bakterien im eventuell verbleibenden infizierten Gewebe abzutöten. Durch Einsatz eines Linezolid-haltigen Plasmaclots würde die komplette Linezolidfreisetzung während der ersten 3h erfolgen, so dass eine optimale Bekämpfung des Infektionsherdes erreicht werden kann.

Die starke Beeinträchtigung der Zellviabilität beim Einsatz von Ag-Acetat und PVP-Ag-NP limitiert die klinische Anwendbarkeit. Sowohl Ag-Acetat als auch PVP-Ag-NP wirken nur nach Integration von hohen Konzentrationen im Plasmaclot antibakteriell. Plasmaclots wirken dabei wie ein Silberdepot, das kontinuierlich zelltoxische Silberionen freisetzt. Der antimikrobielle Einsatz von Plasmaclots mit Silberionen bzw. -Nanopartikeln sollte daher möglichst vermieden werden bzw. nur erfolgen, wo er aus medizinischen Gründen notwendig ist und wo Antibiotika keine Wirkung zeigen. Hier kann eventuell ein möglicher Nutzen ein Risiko der Zytotoxizität aufwiegen.

7.3 Beschreibung der Relevanz der Ergebnisse für die gesetzliche Unfallversicherung insbesondere im Hinblick auf die Praxisverknüpfung

Durch den Einsatz der entwickelten Plasmaclots steht eine zusätzliche therapeutische Option für Patienten mit besonderen Risikoprofilen oder für die postoperative Infektionsprävention zur Verfügung. Autologe Antibiotika-haltige Plasmaclots offerieren ein hohes Potential für die Erzeugung schnell verfügbarer und kostengünstiger Drug-Release-Systeme. Plasmaclots sind mit verschiedenen Antibiotika kompatibel, lösen sich mit der Zeit auf und können resorbiert werden.

Die Freisetzung war bei allen eingesetzten Antibiotika initial in der ersten Stunde am höchsten, was beim klinischen Einsatz besonders günstig für die peri- bzw. unmittelbar

postoperative Phase ist. In dieser Zeit besteht durch die offene Wunde die größte Gefahr einer bakteriellen Kontamination.

Desweiteren ist die entwickelte autologe Plasmaclot-Matrix als Träger von antimikrobiellen Substanzen von großem volkswirtschaftlichem Nutzen. Therapiekosten aus stationärer Behandlung sowie weitere Folgekosten könnten drastisch gesenkt werden. Durch eine postoperative Infektionsprävention könnte eine bakterielle Infektion vermieden werden, in deren Folge es häufig zu Revisionsoperationen, lang andauernder systemischer Antibiotikabehandlung und verlängertem Krankenhausaufenthalt des Patienten kommt.

8. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan möglichst mit Angabe der absehbaren Zeithorizonte.

Der klinische Einsatz der antimikrobiellen Plasmaclots setzt hohe Qualitätsansprüche voraus, die eine Herstellung im Reinraum erforderlich machen. GMP-gerechte Herstellung der antimikrobiellen Plasmaclots sowie die Erfüllung der umfassenden europäischen und nationalen arzneimittelrechtlichen Vorgaben sind die Grundvoraussetzung für den Einsatz am Menschen. Nur so können die Sicherheit und der Nutzen dieser neuen Therapieform für den Patienten garantiert werden.

Seit Anfang 2014 verfügt das Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum über einen eigenen Reinraum. Die Inbetriebnahme sowie die Zertifizierung werden allerdings noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Damit wurden wichtige Voraussetzungen für den klinischen Einsatz der antimikrobiellen Plasmaclots geschaffen. Die Umsetzung ist frühestens in 2 Jahren realisierbar.

9. Literatur

- Albers CE, Hofstetter W, Siebenrock KA, Landmann R, Klenke FM.
In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. *Nanotoxicology* 7(1):30-36 (2013)
- Chen Y, Zheng X, Xie Y, Ding C, Ruan, H.; Fan, C.
Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings. *J Mater Sci Mater Med* 19 (12): 3603-3609 (2008)
- Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, Ong JL.
In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 27: 5512–5517 (2006)
- Chen W, Oh S, Ong AP, Oh N, Liu Y, Courtney HS, Appleford M, Ong JL.
Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *J Biomed Mater Res A* 82(4): 899-906 (2007)
- Cho SH, Song HR, Koo KH, Jeong ST, Park YJ. Antibiotic-impregnated cement beads in the treatment of chronic osteomyelitis. *Bull Hosp Jt Dis* 56(3): 140-144 (1997)
- Dougherty SH, Simmons RL. Infections in bionic man: the pathobiology of infections in prosthetic devices-Part II. *Curr Probl Surg* 19 (6): 265-319 (1982)
- Holtom PD, Pavkovic SA, Bravos PD, Patzakis MJ, Shepherd LE, Frenkel B. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro. *J Orthop Res* 18(5): 721-727 (2000)
- Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R.
Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 82(2): 161-173 (2000)
- Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH.
Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 17(3): 212-216 (2003)
- Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA.
Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover R H (Hrsg.): *Manual of Clinical Microbiology*. 7. Aufl. ASM Press Washington, D.C., 1526-1543 (1999)
- Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE.
Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 16(4): 509-512 (1998)
- Nelson CL.
The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Relat Res* 427: 72-78 (2004)
- Neut D, van de Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ.
Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 47(6): 885-891 (2001)
- Perry AC, Prpa B, Rouse MS, Piper KE, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R.
Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *Clin Orthop Relat Res* 414: 95-100 (2003)

10. Kurzfassung (deutsch) für die DGUV-Internetdatenbank

Ziel dieser Studie war die Entwicklung von wirkstoffbeladenen autologen Plasmaclots für eine Deposition und Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen im Bereich von Knochendefekten.

Thrombozytenfreie Plasmaclots wurden mit drei Antibiotika (5 bis 300 µg/ml Vancomycin, Gentamicin, Linezolid) oder mit 5 bis 80 µg/ml Silber-Ionen (Ag-Acetat) bzw. PVP-Silber-Nanopartikel ($\varnothing < 75$ nm) hergestellt. Die antimikrobielle Aktivität der Clotmatrices wurde gegen *Staphylococcus aureus* mittels Bakterien-Adhäsionstest, BacLight-Cytotoxizitätstest und Empfindlichkeitstestungen (modifizierter Mikrodilutionstest, modifizierter Agardiffusionstest) ermittelt. Die Gewebstabilität wurde mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) über den Calcein/PI-Viabilitätstest analysiert. Freisetzungsanalysen der Substanzen aus den Clots wurden mittels hoch-auflösender Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) und Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS) durchgeführt.

Alle Antibiotika zeigten eine konzentrationsabhängige maximale Freisetzung aus den Plasmaclots nach 30 min. Die Dauer der antimikrobiellen Aktivität (MHK) erreichte bei Gentamicin max. 6 Tage, bei Vancomycin max. 4 Tage und bei Linezolid nur max. 3 Stunden. Eine antimikrobielle Aktivität innerhalb der Clotmatrix konnte korrelierend gemessen werden. Ebenfalls war die bakterielle Adhärenz an die Clotoberflächen inhibiert. Im Gegensatz zu den Antibiotika war die Freisetzung von Silberacetat und von Silbernanopartikeln aus den Plasmaclots inhibiert. Eine antibakterielle Wirkung konnte in den jeweiligen Eluaten bei den Nanopartikeln nicht und bei Silberacetat nur in gewebstoxischen Konzentrationen (200-500 µg/ml) erreicht werden.

Im Gegensatz zum Linezolid hatte die Freisetzung von Gentamicin und Vancomycin aus Plasmaclots eine mehrtägige antimikrobielle Effektivität. Eine Beladung mit Silberionen (Silberacetat) oder Silbernanopartikeln ist wegen mangelnder antimikrobieller Wirkung im Eluat und der Plasmamatrix unter Einsatz von gewebsverträglichen Konzentrationen nicht geeignet.

11. Kurzfassung (englisch) für die DGUV-Internetdatenbank

It was the purpose of this study to develop drug-loaded autologous plasma clots for the deposition and the release of antimicrobial substances for bone fracture therapy.

Platelet-free plasma clots containing antibiotics (5 to 300 µg/ml vancomycin, gentamicin, linezolid), 5 to 80 µg/ml silver ions (Ag-acetate) or PVP-silver-nanoparticles (spherical, Ø <75 nm) were produced. The bioactivity of antimicrobial agents released from plasma matrices was tested against *Staphylococcus aureus* using bacterial adhesion assay, the *BacLight*-cytotoxicity test and bacterial susceptibility tests (modified microdilution assay and modified agar diffusion assay). Tissue compatibility was analyzed by live/dead assay (calcein AM / propidium iodide) using mesenchymal stem cells (MSC). The release kinetics for each antimicrobial agent was carried out by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and atomic absorption spectroscopy (AAS).

All antibiotics showed a concentration-dependent maximal release from the plasma clots within 30 min. The duration of antimicrobial activity (MIC) was max. 6 days for gentamicin, max. 4 days for vancomycin and only max. 3 hours for linezolid. A correlated antimicrobial activity within the clot matrix and the inhibition of bacterial adhesion to clot surfaces were determined.

Contrary to these antibiotics, release of silver acetate or silver-nanoparticles from plasma clots was inhibited. An antimicrobial effect in the respective eluates could not be achieved for PVP-Ag-nanoparticles and for silver acetate only above tissue toxic concentrations (200-500 µg/ml).

In contrast to linezolid, the release of gentamicin and vancomycin from plasma clots resulted in an antimicrobial activity lasting several days. Due to the lack of antimicrobial effect in the eluate and the plasma matrix, loading with tissue-compatible concentrations of silver ions (silver acetate) or silver-nanoparticles is not suitable.