

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

**Exogenes Surfactant als Trägersubstanz für Antibiotika –
in vitro Untersuchungen zur Interaktion zwischen Poractant alfa
und verschiedenen Antibiotika**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Barbara Steiner
aus München

Lübeck 2024

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Guido Stichtenoth, Ph.D.

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Thomas Bollinger

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.06.2024

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

INHALT

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>ENDOGENES SURFACTANT</i>	1
1.1.1	ZUSAMMENSETZUNG	1
1.1.2	SYNTHESE UND SEKRETION	2
1.1.3	DIE ROLLE DER PHOSPHOLIPIDE	4
1.1.4	DIE ROLLE DER SURFACTANTPROTEINE	5
1.2	<i>EXOGENES SURFACTANT</i>	8
1.2.1	ANWENDUNG IN DER PÄDIATRIE	8
1.2.2	SURFACTANTSPREITUNG	9
1.2.3	PHARMAKOLOGISCHE SURFACTANTPRÄPARATE	9
1.3	<i>BAKTERIELLE INFEKTIONEN DES NEUGEBORENEN</i>	12
1.3.1	URSACHEN	12
1.3.2	HÄUFIGE PATHOGENE KEIME	13
1.3.3	NEONATALE PNEUMONIE	14
1.4	<i>THERAPIEANSÄTZE BEI PULMONALEN INFEKTIONEN</i>	15
1.4.1	THERAPIE DER BAKTERIELLEN INFEKTION DES NEUGEBORENEN	15
1.4.2	TOPISCHE PULMONALE ANTIBIOTIKATHERAPIE – MÖGLICHKEITEN IN ZUKUNFT	15
1.5	<i>DIE KOMBINATION VON SURFACTANT UND ANTIBIOTIKA: VORSTUDIEN</i>	16
2	FRAGESTELLUNG	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	<i>IN VITRO BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE</i>	19
3.1.1	MATERIALIEN	19
3.1.2	VERSUCHSVORBEREITUNGEN	21
3.1.2.1	BLUTAGAR	21
3.1.2.2	BAKTERIENAUSWAHL	21
3.1.2.3	HERSTELLUNG DER BAKTERIENSUSPENSIONEN	22
3.1.2.4	INTERNE KONTROLLE DER VITALEN BAKTERIENKONZENTRATION	22
3.1.2.5	ANTIBIOTIKA	23
3.1.2.5.1	CHARAKTERISTISCHE EIGENSCHAFTEN	23
3.1.2.5.2	VERDÜNNUNG DER ANTIBIOTIKAPROBEN	26
3.1.3	VERSUCHSABLAUF	27
3.1.4	VERSUCHSAUSWERTUNG	27
3.2	<i>PULSATING BUBBLE SURFACTOMETER - FUNKTIONSPRINZIP</i>	29
3.2.1	MESSVORGANG	29

3.2.2	PROBENMATERIAL	31
3.3	STATISTISCHE ANALYSE	32
4	ERGEBNISSE	34
4.1	<i>IN VITRO</i> BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE	34
4.1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	34
4.1.2	<i>GRUPPE-B-STREPTOKOKKEN (HIGH DENSITY)</i>	38
4.1.3	<i>GRUPPE-B-STREPTOKOKKEN (LOW DENSITY)</i>	43
4.1.4	<i>STAPHYLOKOKKUS AUREUS</i>	47
4.2	<i>IN VITRO</i> OBERFLÄCHENSPANNUNGMESSUNGEN AM PBS	51
4.2.1	AZITHROMYCIN	52
4.2.2	CEFOTAXIM	55
4.2.3	GENTAMICIN	56
4.2.4	MOXIFLOXACIN	58
4.2.5	TEICOPLANIN	59
4.3	ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE	61
5	DISKUSSION	66
5.1	<i>INAKTIVIERUNG VON PORACTANT ALFA DURCH ANTIBIOTIKA</i>	66
5.2	<i>IN VITRO</i> BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE – DIE LOKALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA MIT UND OHNE PORACTANT ALFA UNTER VERSCHIEDENEN EINFLUSSFAKTOREN	71
5.2.1	POLARITÄT VON ANTIBIOTIKA UND PORACTANT ALFA: LIPOPHILIE UND HYDROPHILIE	72
5.2.2	EINFLUSS DER ANTIBIOTIKAKONZENTRATION AUF DIE BAKTERIENHEMMUNG	75
5.2.3	ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN VON EXOGENEM SURFACTANT	77
5.2.4	EINFLUSS VON PORACTANT ALFA AUF DIE LOKALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA	78
5.2.5	EINFLUSS DES HYPOPHASENVOLUMENS AUF DIE LOKALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA MIT UND OHNE PORACTANT ALFA	82
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	LITERATUR	87
8	DANKSAGUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> ; dt.: destilliertes Wasser
AUC	<i>engl.: area under the curve</i> ; dt.: Fläche unter der Kurve
CF	<i>engl.: cystic fibrosis</i> ; dt.: Zystische Fibrose; Mukoviszidose
Ch.-B.	Chargennummer
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EOS	<i>engl.: early-onset sepsis</i> ; Frühsepsis
ETOH p. a.	Ethanol pro analysi (dt.: für analytische Zwecke geeignet)
EUCAST	<i>engl.: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GBS	<i>Streptokokken der Gruppe B</i>
HD (GBS)	<i>high density (Gruppe-B-Streptokokken)</i>
HV	Hypophasenvolumen; Bakteriensuspensionsvolumen
IgA	Immunglobulin A
KBE	koloniebildende Einheit
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LD (GBS)	<i>low density (Gruppe-B-Streptokokken)</i>
LOS	<i>engl.: late-onset sepsis</i> ; Spätsepsis
Lot.	Lotnummer
MHK	minimale Hemmkonzentration
n	Versuchswiederholungen
NaCl 0,9%	Natriumchlorid 0,9% (w/v); isotone Kochsalzlösung
OFS	Oberflächenspannung
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA	Poractant alfa; porcines Surfactantpräparat; Handelsname: Curosurf [®]
PBS	Pulsating Bubble Surfactometer
PG	Phosphatidylglycerol
PL	Phospholipide
RDS	<i>engl.: Respiratory distress syndrome</i> ; dt.: Atemnotsyndrom des Frühgeborenen; Surfactantmangelsyndrom
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
SP	Surfactantprotein
<i>spp.</i>	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche

γ_{\max}

maximale Oberflächenspannung

γ_{\min}

minimale Oberflächenspannung

1 EINLEITUNG

Das Krankheitsbild der bakteriellen Pneumonie bei Früh- und Neugeborenen ist aufgrund seiner Häufigkeit und der potenziell schwerwiegenden Folgen von großer Bedeutung. In den Industrienationen erkranken daran etwa 0,15-0,5% aller Neugeborenen. Das Sterblichkeitsrisiko dieser Patienten liegt trotz intensivmedizinischer Maximalversorgung bei ca. 13%. Unter den Frühgeborenen erkranken ca. 10% an einer bakteriellen Pneumonie, wobei das Infektionsrisiko mit sinkendem Gestationsalter steigt (1). Häufig besteht bei Kindern, die vor der 34. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren werden, ein pulmonaler Surfactantmangel. Dies steht im Kontext mit einer Lungenunreife von Frühgeborenen (primärer Surfactantmangel). Im Zusammenhang mit einer pulmonalen Infektion kann es durch inflammatorische Prozesse zu einer Inaktivierung von vorhandenem endogenem Surfactant kommen (sekundärer Surfactantmangel) und einen bereits bestehenden primären Surfactantmangel unter Umständen verstärken. Die derzeitige Therapie einer perinatalen Pneumonie beinhaltet daher in der Regel die Gabe von intravenösen Antibiotika (AB) und die intratracheale Applikation von exogenem Surfactant (2). Während beide Therapiemaßnahmen einen positiven Effekt auf die Eliminierung pathogener Keime haben, führt die Behandlung mit therapeutischem Surfactant oft zu einer raschen Verbesserung der Atmung (2). Bis heute ist die Applikation von AB bzw. Surfactant nur auf getrennte Weise möglich (z. B. intravenös bzw. intratracheal). Die potenzielle gemeinsame intratracheale Gabe ist zentraler Aspekt dieser Arbeit.

1.1 ENDOGENES SURFACTANT

Surfactant (*engl.: surface active agent*) ist ein Lipoprotein-Komplex, welcher in den Lungenalveolen vorkommt und dort die Oberflächenspannung (OFS) reduziert. Auf diese Weise wird ein Kollabieren der Lungenbläschen in der endexpiratorischen Phase verhindert und die Eröffnung der Alveolen bei der Inspiration erleichtert (3-8). Neben diesen biophysikalischen Eigenschaften wird dem Surfactant auch eine immunologische Rolle zugeschrieben. Aufgrund seiner antimikrobiellen und entzündungsregulierenden Fähigkeiten spielt Surfactant auch eine wesentliche Rolle in der lokalen pulmonalen Immunabwehr (3-6, 9-12).

1.1.1 ZUSAMMENSETZUNG

Endogenes Surfactant besteht zu ca. 90% aus Lipiden und etwa 10% (w/w) aus den vier spezifischen Surfactantproteinen (SP) A-D (3-6, 9). Den größten Anteil der Lipide stellen die Phospholipide (PL) mit etwa 80-85% (w/w) dar. Die übrigen ca. 10% (w/w) bestehen aus neutralen Lipiden wie Triglycerol, freien Fettsäuren, vor allem aber Cholesterin. Zudem beinhaltet endogenes Surfactant Kohlenhydrate. Das wichtigste PL ist das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Unter den Lipiden ist es die bedeutendste oberflächenaktive Komponente, die zur größten

Reduktion der OFS in den Alveolen führt (3-7, 9). Es gehört zur Gruppe der Phosphatidylcholone, die mit ca. 80% (w/w) den größten Anteil der PL ausmachen. Etwa die Hälfte davon ist DPPC. Auch anderen PL wie Phosphatidylglycerol (PG), das nach DPPC mit 5-15% (w/w) den zweitgrößten Anteil der PL ausmacht, Phosphatidylinositol sowie die eher unbedeutenderen Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Sphingomyeline sind an der Reduktion der OFS in den Lungenalveolen beteiligt (3, 4, 9). In Abbildung (Abb.) 1 ist die Zusammensetzung von endogenem Surfactant graphisch dargestellt.

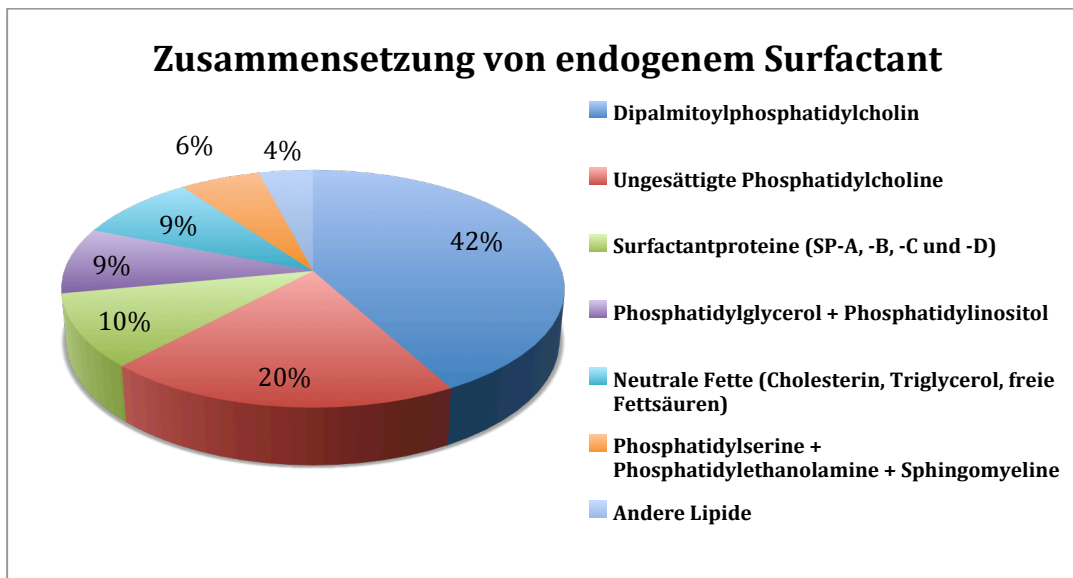


Abbildung 1: Zusammensetzung von humanem pulmonalem Surfactant (% (w/w)) (3, 4, 6, 7, 9).

1.1.2 SYNTHESE UND SEKRETION

PL- und Proteinbestandteile von endogenem Surfactant werden in unterschiedlichen Prozessen im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Pneumozyten synthetisiert. Es folgt die Bündelung der Lipide und der SP-B und SP-C in Form von Doppelschicht-Phospholipidmembranen (s. Abb. 2) in intrazellulären Speicherorganellen, den sogenannten Lamellarkörperchen.

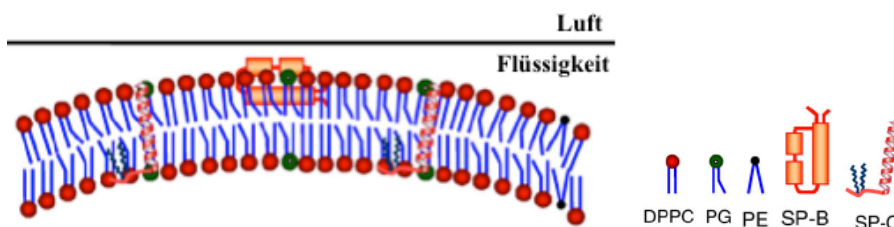


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Doppelschicht-Phospholipidmembran mit Surfactantproteinen B und C an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche. Abkürzungen: DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholin, PG: Phosphatidylglycerol, PE: Phosphatidylethanolamine, SP-B und SP-C: Surfactantproteine B und C; Abbildung modifiziert nach Zuo et al. (13).

Der Transport von PL, SP-B und SP-C zu den Lamellarkörperchen findet über den Golgi-Apparat statt (3-7, 9). Für die PL existieren direkte Transportwege zu den Lamellarkörperchen (7). SP-A und SP-D hingegen werden nach ihrer Prozessierung im Golgi-Apparat über ein Vesikeltransportsystem in den Alveolarraum sezerniert (6, 9). Während SP-A, SP-B und SP-D

auch von Club-Zellen des bronchialen Epithels sezerniert werden (5, 7, 8), entstammt SP-C lediglich den Typ-II-Pneumozyten. SP-D wird als einziges SP zusätzlich von zilienlosen Epithelzellen in den Bronchiolen und der Trachea abgegeben (12, 14). Aufgrund unterschiedlicher Stimuli kommt es zur Exozytose der Lamellarkörperchen in die alveoläre Hypophase. Die Hypophase ist ein dünner Flüssigkeitsfilm, der die Alveolen und die terminalen Bronchiolen auskleidet. Sie liegt den Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten unmittelbar auf und ist von der Luft in den Alveolen durch den Surfactantfilm getrennt. Die Hypophase beinhaltet u. a. Makrophagen, Defensine und weitere antimikrobielle Moleküle (15). Der bedeutsamste Stimulus für die Sekretion der Lamellarkörperchen ist die Atmung selbst. Bereits physiologische Atembewegungen, insbesondere tiefe Atemzüge führen zur Dehnung des alveolären Gewebes. Dieser Reiz fördert über eine Signaltransduktion die Surfactant-Sekretion. So kommt es besonders während der ersten Atemzüge des Neugeborenen zu einer hohen Surfactantabgabe. Auch sekretionsanregende Substanzen wie β -adrenerge und purinerge Agonisten sowie Glukokortikoide erhöhen die Surfactantsynthese bzw. -sekretion (3, 4, 9, 14).

Nach Exozytose in die Hypophase nehmen Surfactantbestandteile eine komplexe Tertiärstruktur an. Dieses gitterartige Netzwerk, das aus Surfactant-Lipiden besteht, wird tubuläres Myelin genannt (3-9). Für diesen Prozess ist neben einem physiologischen pH-Wert, DPPC und PG die Präsenz von extrazellulärem Kalzium, SP-A und SP-B entscheidend (3, 4, 6-8, 14, 16, 17). Anschließend werden von dort oberflächenaktive Moleküle, insbesondere DPPC, an die Grenzfläche zwischen alveolärer Hypophase und Luft adsorbiert. Surfactantbestandteile von verbrauchtem (teils abgebautem) Surfactant werden einerseits von Alveolarmakrophagen aufgenommen und abgebaut, andererseits aus dem Alveolarraum via Endozytose erneut in die Typ-II-Pneumozyten aufgenommen, um wiederaufbereitet zu werden (3-9, 14). Endogenes Surfactant wird ab der 20. SSW in der fetalen Lunge produziert und etwa ab der 24. SSW aus den Typ-II-Pneumozyten sezerniert (8, 9, 18). In Abb. 3 ist der physiologische Surfactant-Zyklus graphisch dargestellt (5).

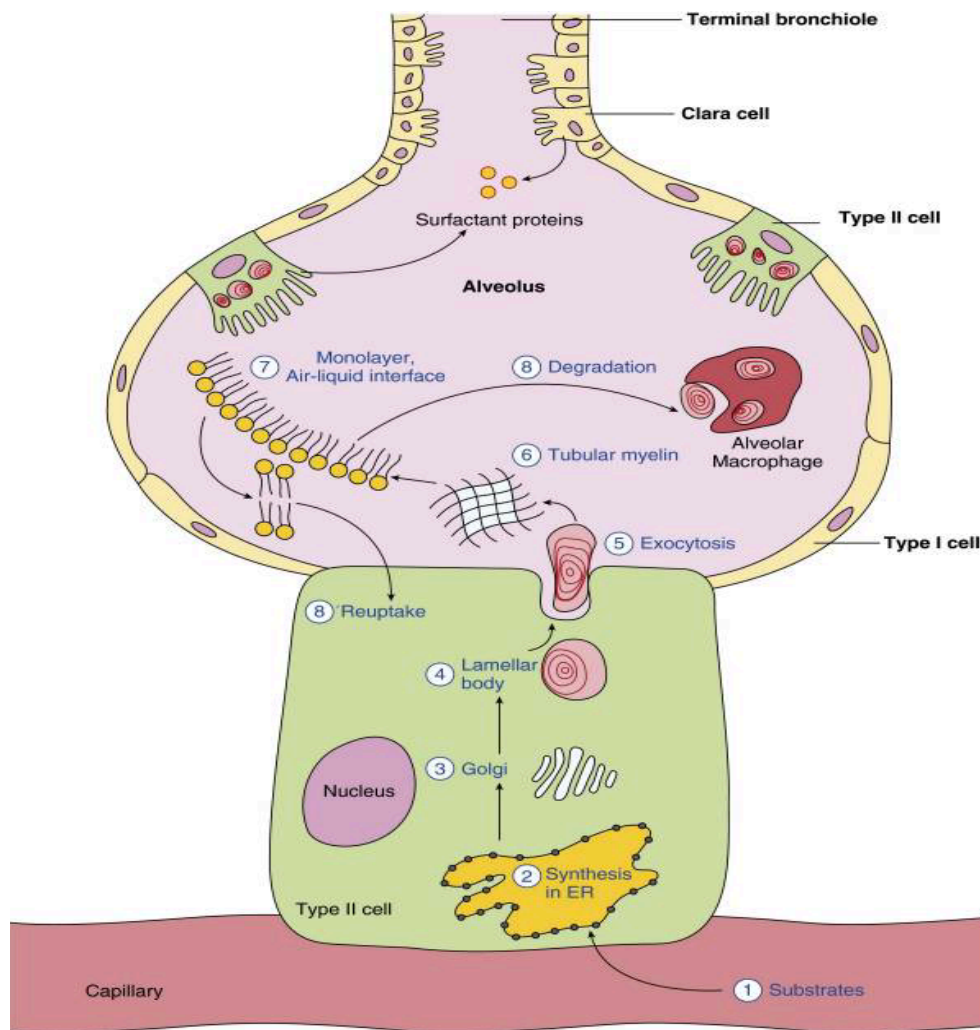


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Surfactantzyklus (Synthese, Sekretion, Recycling); Typ-II-Pneumozyten (*engl.: Type II cell*) sind überwiegend für die Produktion von Bestandteilen endogenen Surfactants verantwortlich: 1. benötigtes Substrat (*engl.: Substrates*) wird in die Zelle aufgenommen. 2. Surfactantbestandteile werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert (*engl.: Synthesis in ER*) und 3. ggf. nach Modifikation im Golgi-Apparat (*engl.: Golgi*) als 4. Lamellarkörperchen (*engl.: Lamellar body*) in der Zelle gespeichert. 5. Via Exozytose (*engl.: Exocytosis*) kommt es zur Sezernierung der Lamellarkörperchen in die alveoläre Hypophase, welche die Alveolen (*engl.: Alveolus*) und terminalen Bronchiolen (*engl.: Terminal bronchiole*) auskleidet. 6. Das Surfactant nimmt eine gitterartige Struktur an (tubuläres Myelin, *engl.: Tubular myelin*) woraufhin 7. die Phospholipide (v. a. Dipalmitoylphosphatidylcholin) in Form einer Phospholipid-Monoschicht (*engl.: monolayer*) an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (*engl.: Air-liquid interface*) adsorbiert werden und die alveoläre Oberflächenspannung somit reduziert wird. Verbrauchtes Surfactant wird 8. zum einen von Alveolarmakrophagen (*engl.: Alveolar Macrophage*) aufgenommen und abgebaut (*engl.: Degradation*). Zum anderen 8'. werden die Surfactantbestandteile aus dem Alveolarraum via Endozytose erneut in die Typ-II-Pneumozyten aufgenommen (*engl.: Reuptake*) um im Rahmen von Surfactantrecycling wiederaufbereitet zu werden. Die Surfactantproteine A, B sowie D (*engl.: Surfactant proteins*) werden außerdem auch in den skizzierten Club-Zellen (hier: Clara cell) synthetisiert. *Engl.: Type I cell*, *dt.: Typ-I-Pneumozyt*; *engl.: Capillary*, *dt.: Blutkapillare*. Abbildung aus einer Arbeit von Han et al. (5).

1.1.3 DIE ROLLE DER PHOSPHOLIPIDE

Die biophysikalische Funktion des endogenen Surfactants besteht darin, die OFS an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche herabzusetzen, um einen endexpiratorischen alveolären Kollaps zu verhindern (3-8). Die Köpfe der PL sind in Richtung wässrige Hypophase und die hydrophoben Fettsäureschwänze in Richtung Luft ausgerichtet (3-8). Durch die expiratorisch zunehmende dichte Anordnung der Lipide verringert sich die Anzahl der zur Luft exponierten Wassermoleküle, was zu einer Verminderung der Druckdifferenz und somit zur Absenkung der OFS führt (6, 8). Nach dem **Gesetz von Laplace** gilt in sphärischen Körpern bzw. Hohlorganen (z. B. Alveolen)

$\Delta p = 2\gamma/r$. Der alveoläre Druck Δp ist abhängig von der alveolären OFS γ und dem Radius r . Da die OFS für eine bestimmte Flüssigkeit in der Regel konstant ist (19), verändert sich der Druck überwiegend durch die Veränderung des Radius. Je kleiner der Radius (z. B. während der Expiration), desto größer ist der Druck und folglich die Gefahr eines alveolären Kollabierens (8, 19). Bei miteinander verbundenen Alveolen unterschiedlicher Größe würde sich ohne die Surfactant-bedingte Reduktion der OFS auf etwa 0 mN/m (20) die kleine Alveole aufgrund des höheren Drucks in die benachbarte größere Alveole entleeren und schließlich kollabieren ($r_1 > r_2 \rightarrow \Delta p_1 < \Delta p_2$; s. Abb. 4) (19). Atelektatische Lungenareale einerseits und überblähte Alveolen andererseits wären die Folge. Dies wird durch Surfactant verhindert. Durch die so entstandene erhöhte Lungencompliance wird deutlich weniger Kraft für die Atemarbeit benötigt (7, 8, 19, 21). Es wird vermutet, dass bestimmte Surfactant-PL auch eine Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell (22) konnte gezeigt werden, dass virale Infektionen und pulmonale Entzündungsreaktionen durch Surfactant-PL (z. B. PG oder Phosphatidylserine) positiv beeinflusst werden können (3, 4, 7, 8, 23, 24).

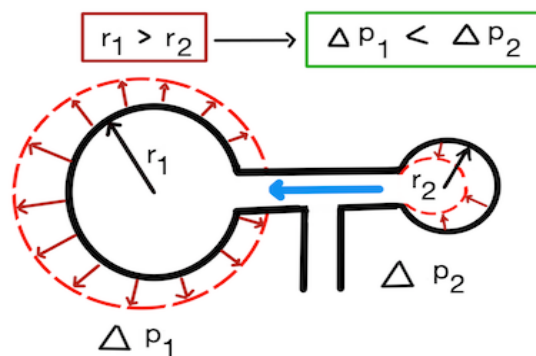


Abbildung 4: Schematische Darstellung zweier Alveolen unterschiedlicher Größe ohne Surfactant, es gilt das *Gesetz von Laplace* $\Delta p = 2\gamma/r$. Die kleinere Alveole würde sich aufgrund des höheren Drucks ($\Delta p_1 < \Delta p_2$) zugunsten der größeren Alveole entleeren und kollabieren. Eine Überblähung der großen Alveole wäre die Folge. r – Radius der Alveole, p – intraalveolärer Druck. *Abbildung modifiziert nach (19).*

1.1.4 DIE ROLLE DER SURFACTANTPROTEINE

Die bis heute am ausführlichsten beschriebenen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D werden aufgrund ihrer Struktur, ihrer biochemischen und funktionellen Eigenschaften unterschieden. Während die Funktion der hydrophoben, lipid-assoziierten SP-B und SP-C überwiegend darin besteht, die OFS in den Alveolen zu reduzieren, spielen die hydrophilen SP-A und SP-D eine wichtige Rolle in der lokalen pulmonalen Immunabwehr (3-9, 14). Zusätzlich ist SP-A für den Surfactant-Metabolismus von Bedeutung. SP-B und SP-C scheinen ebenso immunologische Eigenschaften zu haben (s. Tabelle 1) (4, 5, 7-9, 25, 26).

Tabelle 1: Eigenschaften der Surfactantproteine (SP) A-D; Abkürzungen: +++: sehr große Bedeutung, +: geringe Bedeutung, (+): sehr geringe Bedeutung, -: keine Bedeutung (3, 7, 8, 12, 14).

	Molekulargewicht & Größe	Syntheseort	Immunologische Bedeutung	Biophysikalische Bedeutung	Polarität
SP-A	26-35 kDa 248 Aminosäuren	Typ-II-Pneumozyten, Club-Zellen	+++	+	hydrophil
SP-B	8 kDa 79 Aminosäuren	Typ-II-Pneumozyten, Club-Zellen	(+)	+++	hydrophob
SP-C	4 kDa 35 Aminosäuren	Typ-II-Pneumozyten	(+)	+++	hydrophob
SP-D	43 kDa 355 Aminosäuren	Typ-II-Pneumozyten, Club-Zellen, zilienlose Epithelzellen in Bronchiolen und Trachea	+++	-	hydrophil

Auch wenn das hydrophile SP-A in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt, wird die rasche Adsorption der PL an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche durch dieses Protein unterstützt (8, 16, 17). SP-B und SP-C gewährleisten während der dynamischen Größenveränderung der Alveolen (Inspiration/Expiration) durch die Interaktion mit den PL zudem eine Stabilität der PL-Monoschicht an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (14, 27, 28) (s. Abb. 5).

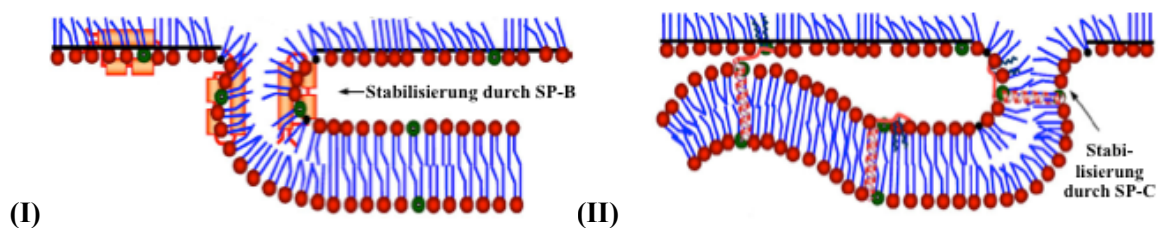


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktion von Surfactantprotein (SP) B (I) und SP-C (II) innerhalb einer Phospholipidschicht an der alveolären Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche. Neben der beschleunigten Phospholipid-Adsorption und -Spreitung wird die Monoschicht durch die Proteine stabilisiert. Sie interagieren simultan in der Phospholipidschicht und nicht getrennt voneinander wie in den Abbildungen (I) und (II) dargestellt. Abbildung modifiziert nach Zuo et al. (13).

SP-B ist für die Entstehung und Sekretion der Lamellarkörperchen relevant (3, 7, 28). SP-A, SP-B und SP-C spielen eine wichtige Rolle bei der Wiederaufnahme und -aufbereitung von Surfactant-Bestandteilen in Typ-II-Pneumozyten (4, 6-8, 27). Ein hereditär bedingter Mangel an SP-C kann zu einem neonatalen Atemnotsyndrom oder zu einer chronisch interstitiellen Lungenerkrankung führen. Eine genetische Inaktivierung oder Fehlfunktion von SP-B führt postnatal rasch zu einer respiratorischen Insuffizienz und zum Tod. Eine exogene Surfactanttherapie ist in diesem Fall aufgrund der intra- und extrazellulären Funktionen von SP-B nicht möglich (3, 4, 6, 7, 14, 27, 29). SP-A und SP-D ähneln sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion. Beide Proteine konnten in Geweben und Schleimhäuten anderer Organsysteme nachgewiesen werden und sind somit nicht lungenspezifisch. Ihnen wird eine immunologische Funktion im gesamten Organismus zuteil (9, 11, 14, 30, 31). Sie gehören zur Gruppe der Kollektine, die eine Untergruppe der kohlenhydratbindenden Lektine darstellen (3-5, 8, 9, 12, 32). Sie erkennen mithilfe einer

Carbohydrate Recognition Domain (dt.: Kohlehydrat erkennende Domäne) Zellwandbestandteile pathogener Mikroorganismen (4, 5, 9, 10, 12, 28). SP-A und SP-D interagieren zum einen über direkten Kontakt mit Mikroorganismen, was zur Eliminierung der Krankheitserreger führen kann (4, 5, 12, 32). Zum anderen wird von den Proteinen eine Immunantwort herbeigeführt. Nach Erkennung und Bindung körperfremder Strukturen kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems oder zur Opsonierung der Keime, was folglich die Phagozytose durch Zellen des angeborenen Immunsystems ermöglicht (5, 9, 11, 12). Auch durch einfache Aggregation der Mikroorganismen initiieren SP-A und SP-D deren Phagozytose (11, 12). Untersuchungen zeigten, dass durch SP-A und SP-D die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche alveolärer Makrophagen erhöht wird, die eine Rolle in der Erkennung und Phagozytose pathogener Keime spielen (12, 33, 34). Kollektine beeinflussen auch das adaptive Immunsystem, indem sie T-Lymphozyten sowie antigenpräsentierende Immunzellen aktivieren. Zudem können sie Immunglobulin E bzw. histaminabhängige allergische Prozesse vermitteln (11, 12). SP-A und SP-D besitzen neben ihren entzündungsfördernden Eigenschaften ebenso protektiv entzündungshemmende Fähigkeiten (11, 12, 35, 36). Bei geringer Keimzahl binden SP-A bzw. SP-D an ein inhibitorisches Signalpeptid (SIRP-alpha) an der Oberfläche von Makrophagen, was die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren vermindert. Somit wird eine permanente Entzündungsreaktion in Geweben vermieden, die physiologisch dauerhaft einer gewissen Anzahl an Keimen oder Allergenen ausgesetzt sind (4, 10, 11, 16, 35, 36). So ist in einem Mäuseversuch von Liu et al. ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von SP-D und einer reduzierten Gewebsinfiltration mit Neutrophilen sowie einer geringeren Apoptoserate entzündeter Zellen zu erkennen (37). Im Gegensatz dazu erlitten Mäuse ohne SP-D signifikant mehr Zellschäden durch gesteigerte Entzündungsreaktionen (12, 32, 37). SP-A und SP-D verringern zusätzlich pulmonale Entzündungsreaktionen, indem sie die Beseitigung apoptotischer und nekrotischer Zellen aus der Lunge mittels Phagozytose fördern (4, 12). In Arbeiten von Clark et al. konnte gezeigt werden, dass aus Entzündungsprozessen resultierenden chronischen Lungenveränderungen durch eine intrapulmonale Applikation von rekombinanten SP-D-Fragmenten entgegengewirkt werden kann (38-41). Auch Beresford und Shaw sahen in ihren Untersuchungen einen klaren Zusammenhang zwischen einem verringerten SP-D-Spiegel und der Entwicklung chronischer Lungenschäden Neugeborener und Säuglinge (40). Die Anwesenheit von SP-A und SP-C schützt Surfactant vor einer Inaktivierung durch proteolytische Serumproteine aus Transsudat oder Ödemflüssigkeit im Alveolarraum (8, 16, 17, 42). In einer Studie von Herting et al. wurde *in vitro* die Inaktivierung verschiedener Surfactantpräparate durch Mekonium untersucht (43). Im Fokus standen modifiziert natürliche Surfactantpräparate, synthetische Surfactantpräparate (s. Punkt 1.2.2) sowie ein natürliches Kaninchen-Surfactant, welches als einziges Präparat etwa 5% (w/w) SP-A enthielt. Im Vergleich konnte beobachtet werden, dass zur Inaktivierung des natürlichen Kaninchen-Surfactants eine weitaus höhere Mekoniumkonzentration notwendig war.

1.2 EXOGENES SURFACTANT

1.2.1 ANWENDUNG IN DER PÄDIATRIE

Eine exogene Surfactanttherapie ist bei einem primären Surfactantmangel indiziert. So ist bei einem Atemnotsyndrom des Frühgeborenen (*engl.: Respiratory Distress Syndrome; RDS*) die intratracheale Applikation von exogenem Surfactant unter mechanischer Beatmung (Intubation) bzw. mit Atemunterstützung (*engl.: Continuous Positive Airway Pressure; CPAP*) die derzeitige Therapie der Wahl (8, 44). Das RDS ist als Krankheitsbild mit typisch klinischem Erscheinungsbild (Tachy-/Dyspnoe, Zyanose, expiratorisches Stöhnen) definiert, welches auf einem primären Surfactantmangel in einer strukturell unreifen Lunge beruht (44). Da die fetale Surfactantproduktion und -sekretion initial nur langsam zunimmt (28), besteht etwa bis zur 34. SSW ein individuell ausgeprägter Surfactantmangel. Die Gefahr, an einem RDS zu erkranken, steigt mit sinkendem Gestationsalter und Geburtsgewicht. Folglich entwickeln in Deutschland ca. 60-80% aller Frühgeborenen vor der 28. SSW, etwa 15-30% der Kinder, die zwischen der 28. und 34. SSW und < 5% der Kinder, die nach der 34. SSW geboren werden, ein RDS (18, 45). Auch bei spät Frühgeborenen bzw. Reifgeborenen kann in seltenen Fällen eine intratracheale Surfactant-Applikation notwendig sein. Während unter Umständen ebenso ein primärer Surfactantmangel ursächlich sein kann, ist in diesen Fällen häufiger ein sekundärer Surfactantmangel Grund für die Entwicklung respiratorischer Probleme. Dieser entsteht bei intakter endogener Surfactantsynthese aufgrund einer Inaktivierung des vorhandenen funktionsfähigen Surfactants im Alveolarraum. Durch Entzündungszellen, Plasmaproteine oder Phospholipasen können Surfactant-Lipide und Surfactant-Proteinbestandteile gehemmt werden (2, 46). Ursprung dieses Prozesses kann eine Mekoniumaspiration, eine Pneumonie, eine Sepsis oder eine pulmonale Blutung sein (46, 47). Auch Typ-II-Pneumozyten können z. B. durch bakterielle Toxine geschädigt werden, wodurch sowohl die Synthese als auch die Sekretion von Surfactant negativ beeinflusst werden kann (2). Ein Surfactantmangel kann ebenso iatrogen als Folge einer maschinellen Beatmung herbeigeführt bzw. verstärkt werden. Einerseits können Scherkräfte am Lungenepithel zu Epithelnekrosen führen, wodurch die Surfactantproduktion beeinträchtigt wird (18). Andererseits kann es durch eine hoch konzentrierte Sauerstofftherapie zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen kommen, welche die PL des Surfactants oxidieren und so das endogene Surfactant inaktivieren können (8, 18). Oxidativer Stress kann zudem zur Inaktivierung von SP-A und somit zum Verlust seiner antipathogenen Wirkung führen (48). Bei jeder Art des Surfactantmangels besteht eine erhöhte OFS in den Alveolen. Je nach Ausmaß des Surfactantmangels wird hierdurch die initiale Entfaltung der neonatalen Lunge sowie die physiologische Atmung erschwert. Die Bildung von Atelektasen sowie erhebliche pulmonale Funktionseinschränkungen können die Folge sein. Diesen pathologischen Prozessen soll mithilfe einer exogenen Surfactanttherapie entgegengewirkt werden (6, 18, 44, 46). Bei intubierten/beatmeten Patienten kann die Applikation über den Trachealtubus erfolgen. Bei bestehender Spontanatmung kann unter CPAP-Beatmung für die Applikation ein

dünner Katheter in der Trachea platziert werden, worüber das Surfactant gegeben wird (**LISA**-Methode; *engl.: Less Invasive Surfactant Administration*). Alternativ kann für die Surfactant-Applikation eine Intubation erfolgen. Nach einer kurzzeitigen mechanischen Beatmung folgt dann die rasche Extubation (**INSURE**; Akronym für *engl.: Intubation, Surfactant, Extubation*). Aufgrund besserer Kurzzeit- und Langzeitergebnisse in Vergleichsstudien wird die weniger invasive Surfactant-Applikation heutzutage, wenn möglich, bevorzugt (44, 45, 49). Oft kann bereits unmittelbar nach der Surfactant-Applikation eine Verbesserung des Gasaustauschs und eine zunehmende Lungen-Compliance mit einer anhaltend verbesserten Oxygenierung beobachtet werden (14, 46, 50). Eine Surfactant-Bolus-Gabe zeigt im Vergleich zu einer kontinuierlichen langsamen Applikation bessere Ergebnisse. Grund hierfür ist bei langsamer Gabe eine inadäquate Verteilung des Surfactants (20, 44, 51). Mithilfe der Surfactanttherapie konnte seit den ersten Therapieversuchen 1980 durch Fujiwara et al. eine enorme Reduktion von Morbidität und Mortalität bei Frühgeborenen mit einem RDS erzielt werden (45, 52).

1.2.2 SURFACTANTSPREITUNG

Surfactant besitzt eine enorme Spreitungsfähigkeit. Dies führt nach einer intratrachealen Applikation von Surfactant zu einer raschen Verteilung selbst in periphere und ggf. auch atelektatische Lungenareale. Hierfür sind zum einen die hydrophoben PL sowie SP-B und SP-C von Bedeutung (20). Zum anderen spielt bei der Spreitung des Surfactants der Marangoni-Effekt eine entscheidende Rolle. Der Marangoni-Effekt, auch Marangoni-Konvektion genannt, beschreibt ein physikalisches Phänomen, bei dem sich eine Flüssigkeit aufgrund eines OFS-Gradienten an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien (z. B. Luft und Wasser; in den Alveolen an der Grenzfläche zwischen wässriger Hypophase und Luft) vom Ort niedriger OFS zum Ort höherer OFS bewegt. Wird Surfactant intratracheal appliziert, besteht aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaften am Applikationsort eine niedrigere OFS als in der Umgebung. Dies führt auf der feuchten Lungenoberfläche zu einer Spreitung des Surfactants in die Peripherie der Lunge (53, 54). Da die SP sowie Surfactant-Lipide dort an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche adsorbiert werden, kommt es folglich zu einer Reduktion der OFS in diesen Abschnitten. Die Surfactantspreitung endet, sobald die OFS-Differenzen ausgeglichen sind. Eine weitere, weitaus langsamere Ausbreitung erfolgt daraufhin durch Diffusion (53).

1.2.3 PHARMAKOLOGISCHE SURFACTANTPRÄPARATE

Weltweit stehen zur exogenen Surfactanttherapie Präparate unterschiedlichen Ursprungs und Zusammensetzung zur Verfügung (s. Tabelle 2). Neben den natürlichen und den modifiziert natürlichen Surfactantpräparaten, die aus Rinder- bzw. Schweinelungen mittels bronchoalveolärer Lavage oder aus Lungengewebe selbst gewonnen werden, existieren auch rekombinant hergestellte

Surfactantpräparate (8, 20, 45). Diese Produkte gleichen strukturell dem humanen Surfactant. Durch die Zentrifugation von Lavageflüssigkeit werden natürliche Surfactantpräparate gewonnen, die PL sowie alle vier SP enthalten (20). Durch Extraktionsprozesse entstehen modifiziert natürliche Surfactantpräparate. Die hydrophilen SP gehen hierbei verloren (20, 41). Folglich entstehen Surfactant-Suspensionen mit einem hohen PL-Gehalt und den hydrophoben SP-B und SP-C. Trotz des vergleichsweise geringen Anteils an SP zeichnen sich diese Präparate durch sehr gute biophysikalische Eigenschaften aus (8, 20, 45, 55, 56). Eine 80 mg/ml Suspension des porcinen Surfactants Poractant alfa (PA; *Curosurf*[®]) entspricht beispielsweise etwa 74 mg/ml Gesamt-PL und 0,9 mg/ml hydrophoben SP. Mit der Idee, den biophysikalischen Effekt weiter zu verstärken, werden einige Produkte mit Triglyceriden oder Fettsäuren angereichert, die in natürlichem Surfactant nur in sehr geringer Konzentration vorkommen (20, 52). Die synthetischen Präparate unterscheiden sich in ihrer Komposition stärker (20, 45). Neben proteinfreien reinen PL-Wirkstoffen, die zur 1. Generation der synthetischen Surfactantpräparate gezählt werden, wurden in der Vergangenheit bereits Präparate mit rekombinanten SP-Analoga (SP-B oder SP-C) getestet (2. Generation der synthetischen Surfactantpräparate) (45). Die Wirksamkeit tierischer und synthetischer Surfactantpräparate (mit oder ohne rekombinanten SP) wurde im Rahmen von Studien an Frühgeborenen, die an einem RDS litten bzw. gefährdet waren eines zu erleiden, miteinander verglichen. Dabei waren Präparate tierischen Ursprungs proteinfreien synthetischen Surfactantpräparaten bislang überlegen (45, 55, 57). Während sich Lucinactant, ein rein synthetisches Surfactantpräparat mit einem SP-B-ähnlichen Peptid, dem proteinfreien synthetischen Präparat Colfosceril palmitat in einer Studie von Moya et al. hinsichtlich der Prävention eines RDS bei Frühgeborenen überlegen zeigte (58), konnten in einer anderen Studie rund um Pfister et al. nach einer Behandlung mit einerseits proteinfreien und andererseits proteinhaltigen rekombinanten Surfactantpräparaten keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen bzgl. Mortalität und der Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie (chronische Lungenerkrankung des Neugeborenen, die beispielsweise im Rahmen verlängerter Beatmungszeiten oder auch durch hohe Sauerstoffkonzentrationen verursacht werden kann) gezeigt werden (59). In dieser Studie konnte aber eine verminderte Inzidenz an RDS in der Gruppe verzeichnet werden, die proteinhaltige rekombinante Surfactantpräparate erhalten hatten. Modifiziert natürliche Surfactantpräparate und synthetische Präparate, die ein SP-B-Analoga beinhalten, zeigten in Vergleichsstudien ähnliche Ergebnisse, sodass von einer vergleichbaren Effektivität ausgegangen werden kann (60-62). Aktuell (2021) sind zur Therapie eines Surfactantmangels in Deutschland ausschließlich modifiziert natürliche Surfactantpräparate zugelassen. Für die Zulassung von Lucinactant sind insbesondere in Hochrisikokollektiven weitere Studien notwendig (44). Zur Verfügung steht momentan das bovine SF-RI 1 (*Alveofact*[®]) und das porcine PA (44). Die beiden Präparate weisen in einer Vergleichsstudie von Proquitté et al. bei Frühgeborenen (durchschnittliches Gestationsalter 28,4 Wochen) keine signifikanten Unterschiede

in ihrer Effektivität auf (50). In Studien mit einem synthetischen Surfactantpräparat, welches ein SP-C-Analogon enthält, konnte bei Erwachsenen mit einem akuten Lungenversagen (*engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS*) keine langfristige Reduktion von Morbidität bzw. Mortalität verzeichnet werden (63). Gegenstand aktueller Forschung ist CHF5633, das erste synthetische Surfactantpräparat in klinischer Erprobung, das sowohl ein rekombinantes SP-B als auch SP-C enthält (3. Generation synthetischer Surfactantpräparate). Sowohl *in vitro* Beobachtungen (64) als auch die erste klinische Studie an Frühgeborenen (Gestationsalter 27. - 34. SSW) mit einem RDS zeigten bei sofortiger und anhaltender Verbesserung der Atemsituation positive Ergebnisse mit CHF5633 (56). In Tierversuchen konnte während eines pulmonalen Entzündungsgeschehens im Vergleich eine bessere Wirkung durch CHF5633 erzielt werden als durch modifiziert natürliche (65) oder synthetische Surfactantpräparate mit nur einem SP-Peptid (66). CHF5633 wurde in den Versuchen sowohl durch Albumin (64, 65) als auch im Falle eines chemisch induzierten ARDS (66) weniger stark inaktiviert als die übrigen Präparate. Somit zeigte sich ein synthetisches Surfactantpräparat einem Präparat tierischen Ursprungs in seiner Wirksamkeit erstmals überlegen (65). Sollten in Deutschland synthetische Surfactantpräparate zur Therapie eines pulmonalen Surfactantmangels zukünftig zugelassen werden, hätte dies weitere Vorteile gegenüber den natürlich gewonnenen Präparaten. Einerseits bestehen Kenntnisse über die exakte Zusammensetzung der synthetischen Surfactantpräparate, andererseits ist eine Übertragung von Krankheitserregern weitestgehend ausgeschlossen und die Gefahr immunologischer Reaktionen vermindert. Letztlich sind die Vorteile durch geringere Produktionskosten sowie die Herstellung einer bedarfsgerechten Menge zu beachten (20, 45, 64, 67).

Tabelle 2: Übersicht über den Ursprung und die Hauptbestandteile verschiedener Surfactantpräparate. Abkürzungen: SP-B und SP-C: Surfactantproteine B und C, PL: Phospholipide, DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholin, PG: Phosphatidylglycerol (20, 44, 45, 52, 68, 69).

Wirkstoff (Handelsname)	Ursprung	Hauptbestandteile	Zulassung
SF-RI 1 (<i>Alveofact</i> [®])	Natürlich - Rinderlungenlavage	PL, SP-B, SP-C	weltweit
Poractant alfa (<i>Curosurf</i> [®])	Natürlich - Schweinelungen- extrakt	PL, SP-B, SP-C (höchster PL-Gehalt aller Surfactant-Präparate)	weltweit
Calfactant (<i>Infasurf</i> [®])	Natürlich - Kälberlungenextrakt	PL, SP-B, SP-C	USA, Korea
Surfactant TA	Natürlich - Rinderlungenextrakt	PL, SP-B, SP-C; Zusatz von DPPC, Palmitinsäure und Tripalmitin	Japan, Korea

Beractant (<i>Survanta</i> [®])	Natürlich - Rinderlungenextrakt	wie Surfactant TA, zusätzlich modifiziert	USA, Teile Europas
Colfosceril palmitat (<i>Exosurf</i> [®])	Rein synthetisch (1. Generation)	DPPC, PG; Zusatz von Tyloxapol und Hexadecanol (für eine verbesserte Spreitungsfähigkeit)	Keine
Artificial lung expanding compound (<i>ALEC</i> [®] , <i>Pumactant</i> [®])	Rein synthetisch (1. Generation)	DPPC, PG	Keine
Lucinactant (<i>Surfaxin</i> [®])	Rein synthetisch (2. Generation)	DPPC, Palmitoyl-oleoyl- PG, Palmitinsäure, SP-B- ähnliches Peptid (KL ₄)	Deutschland: derzeit Erprobung in klinischen Studien, USA: Zulassung seit 2012
Lusupultid (<i>Venticute</i> [®])	Synthetische Lipide, Peptid hergestellt in <i>Escherichia coli</i> (2. Generation)	DPPC, PG, Palmitinsäure, rekombinantes SP-C	Keine
CHF5633	Rein synthetisch (3. Generation)	DPPC, Palmitoyl-oleoyl- PG, rekombinantes SP-B, rekombinantes SP-C	Derzeit Erprobung in klinischen Studien

1.3 BAKTERIELLE INFEKTIONEN DES NEUGEBORENEN

1.3.1 URSACHEN

Bakterielle Infektionen gelten weltweit als häufige Erkrankung des Neugeborenen und sind einer der vorherrschenden Gründe für neonatale Morbidität und Mortalität. Aufgrund des noch nicht vollständig ausgereiften Immunsystems sind Neugeborene, besonders Frühgeborene, speziell gefährdet. Je ausgeprägter die Unreife ist (niedriges Gestationsalter, geringes Geburtsgewicht) desto höher ist das Risiko für eine Infektion (70, 71). Eine Übertragung von Krankheitserregern auf das Kind kann pränatal sowie perinatal durch die Mutter oder postnatal erfolgen. Nach der Geburt sind Neugeborene potentiellen Infektionsquellen ihrer Umwelt ausgesetzt. Pränatal kann eine Infektion als Folge einer vaginalen bakteriellen Aszension auftreten, wenn der mütterliche Geburtskanal mit pathogenen Keimen besiedelt ist (40, 71-73). Eine bakterielle Aszension ist häufig ursächlich für die Entwicklung einer intrauterinen Inflammation und/oder Infektion (*Triple I* - dieser Begriff ersetzt seit 2019 den Begriff Chorioamnionitis bzw. Amnioninfektionssyndrom, um eine Differenzierung zum isolierten maternalen Fieber klar zu definieren) (73, 74). Ein vorzeitiger Blasensprung (insbesondere ≥ 18 Stunden vor der Geburt) spielt hierbei eine begünstigende Rolle,

da Bakterien der Vaginalflora während dieser Zeit ungehindert in die Fruchthöhle aufsteigen können (75-77). Zum einen besteht nach erfolgter Aszension der Bakterien aufgrund inflammatorischer Prozesse die Gefahr einer frühzeitigen Wehentätigkeit und folglich einer frühzeitig einsetzenden Geburt. Bei 20-80% aller Frühgeburten wird eine oftmals subklinisch verlaufende intraamniotische Infektion nachgewiesen, wobei die Bakterien überwiegend mit denen des unteren Genitaltraktes der Mutter übereinstimmen (73). Zum anderen kann es nach erfolgter Keimaszension durch die Aspiration kolonisierter Amnionflüssigkeit zur Infektion des Kindes kommen (71, 77, 78). In 30% der Fälle werden die Keime, welche die intraamniotische Infektion verursacht haben, auch in der Zirkulation des Kindes nachgewiesen. Insbesondere bei Frühgeborenen ist die neonatale Sepsis eine gefürchtete Folge (73). Im Falle einer Keimbeseidung der maternalen Geburtswege kann eine Übertragung auf das Neugeborene auch während der Passage durch den Geburtskanal stattfinden (71, 79). Ebenso ist pränatal prinzipiell eine hämatogen transplazentare Infektion im Rahmen einer mütterlichen Bakteriämie möglich (71, 73, 77). Dies tritt jedoch weitaus seltener auf, da eine Sepsis bei Schwangeren kein häufiges Krankheitsbild ist und in diesem Fall die Plazentaschranke überwunden werden muss.

1.3.2 HÄUFIGE PATHOGENE KEIME

Im Rahmen von Infektionen bei Neugeborenen wird zwischen *early-onset* (dt.: früh beginnende) und *late-onset* (dt.: spät beginnende) unterschieden. Während sich eine *early-onset* Infektion innerhalb der ersten 72 Lebensstunden manifestiert, spricht man von einer *late-onset* Infektion, wenn ein Kind nach dem dritten Lebenstag symptomatisch wird (76-78). *Early-onset* Infektionen werden überwiegend pränatal oder perinatal übertragen (80) und manifestieren sich meist als konnatale Pneumonie oder als Sepsis (engl.: **Early-Onset Sepsis**; EOS), seltener als Meningitis (71, 78). *Streptokokken der Lancefield-Gruppe B (GBS)* spielen gefolgt von *Escherichia coli (E. coli)* bei der Entwicklung einer *early-onset* Infektion eine prädominante Rolle in Deutschland (76-78). Grund ist eine hohe *GBS*-Besiedlungsrate des Vaginal- und/oder Analbereichs bei Schwangeren, die deutschlandweit auf durchschnittlich 16% (78) geschätzt wird. Da eine Übertragung von *GBS* auf das Neugeborene häufig ist (50 - 60% (2, 71)) und potentiell zu schweren Infektionen führen kann (in ca. 0,5 - 1 %, mit stark steigendem Risiko bei Frühgeborenen), ist ein *GBS*-Screening zwischen der 36. und 38. SSW empfohlen. Im Falle eines positiven Testergebnisses sollte eine subpartale AB-Prophylaxe z. B. mit Penicillin G durchgeführt werden (78). Seit Einführung der *GBS*-Prophylaxe ist die Inzidenz der frühen Infektionen gesunken (78). Gehäufte Infektionen durch *E. coli* lassen sich aufgrund der räumlichen Nähe des Genitaltraktes zum Verdauungssystem erklären. Bei Frühgeborenen mit geringem Geburtsgewicht (< 1500g) sind Infektionen mit *E. coli* vorherrschend (76, 81, 82). Deutlich seltener sind Infektionen mit Staphylokokken, Enterokokken, Listerien, Streptokokken anderer Lancefield-Gruppen, *Haemophilus influenzae*, Enterobakterien und vereinzelt Anaerobiern (76, 81). Im Falle einer präpartalen AB-Therapie der Mutter sind

vermehrt Infektionen durch *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus*, *Pseudomonas spp.* und Ampicillin-resistente *E. coli* zu erwarten. Bei *late-onset* Infektionen handelt es sich hingegen oftmals um nosokomiale Infektionen, die postnatal einer horizontalen Erregerübertragung aus dem Klinikumfeld entstammen. Auch Keime der patienteneigenen Flora sind gehäuft nachweisbar (76, 81). Diese Infektionen manifestieren sich ebenso als Pneumonie oder als Sepsis (engl.: *Late-Onset Sepsis*; LOS), es treten aber auch Meningitiden, seltener Arthritiden oder Osteomyelitiden auf. Neu- oder Frühgeborene mit einer verlängerten Hospitalisierungsdauer und invasiven Therapiemaßnahmen (invasive Beatmung, intravasale Katheter) sind einer erhöhten Infektionsgefahr ausgesetzt (76, 81, 83). Das Keimspektrum unterscheidet sich von dem der frühen Infektionen. Neben *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) gelingt überwiegend der Nachweis von Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) (70, 76, 81) gefolgt von *Enterobacter spp.*

1.3.3 NEONATALE PNEUMONIE

Die neonatale Pneumonie stellt nach der primären Sepsis die häufigste invasive bakterielle Infektion bei Neugeborenen dar (84). Es kann zwischen einer *konnatale Pneumonie* (Entstehung prä- oder perinatal; Manifestation innerhalb der ersten 72 Stunden) und einer *Neugeborenenpneumonie* (Entstehung postnatal durch horizontale Keimübertragung; Manifestation nach dem dritten Lebenstag) unterschieden werden (71, 77). Das Keimspektrum, das für eine Pneumonie ursächlich ist, entspricht je nach Infektionszeitpunkt den in Punkt 1.3.2 aufgeführten Bakterien. Symptome einer pulmonalen Infektion gehen bei Neugeborenen vor allem mit einer Verschlechterung der Atemsituation (Dyspnoe, Tachypnoe, Stöhnen, thorakale Einziehungen, selten Apnoen) einher. Unter Umständen kann die Farbe oder die Konsistenz des Trachealsekrets verändert sein (84). Weitere Symptome sind hingegen eher unspezifisch und variieren in ihrer Intensität abhängig von der Schwere der bakteriellen Infektion. Bei systemischer Ausbreitung können neben Veränderungen des Hautkolorits und der Kreislaufsituation (Tachykardie, Hypotonie, verlängerte Rekapillarierungszeit) auch eine Instabilität der Körpertemperatur, eine Trinkschwäche, Lethargie und weitere neurologische Auffälligkeiten Zeichen der Infektion sein (76, 84). Wie in Punkt 1.2.1 beschrieben, können Entzündungsprozesse pulmonales, endogenes Surfactant partiell inaktivieren. Eine neonatale Pneumonie kann folglich mit einem individuell ausgeprägten Surfactantmangel einhergehen, was im Verlauf zu Atelektasen und einer weiteren Verschlechterung der Atemsituation führen kann. Die Gefahr, eine respiratorische Insuffizienz zu entwickeln, ist im Rahmen einer pulmonalen Infektion daher stark erhöht (85). Oftmals ist v. a. bei Frühgeborenen eine Differenzierung zwischen einem RDS und einer Pneumonie zunächst nicht sicher möglich (2).

1.4 THERAPIEANSÄTZE BEI PULMONALEN INFEKTIONEN

1.4.1 THERAPIE DER BAKTERIELLEN INFEKTION DES NEUGEBORENEN

Neu- aber insbesondere Frühgeborene haben bei einem verzögerten Therapiebeginn im Rahmen einer bakteriellen Infektion ein erhöhtes Risiko, innerhalb kürzester Zeit eine Sepsis zu entwickeln (76). Aus diesem Grund gehört bereits bei dem Verdacht auf eine invasive bakterielle Infektion bei Neugeborenen neben der stationären Überwachung und einer supportiven Behandlung (z. B. Analgesie und Volumentherapie) die sofortige Einleitung einer systemischen AB-Therapie zu den wichtigsten Maßnahmen. Nach anfänglicher Gabe von Breitbandantibiotika folgt im Verlauf die Adaption nach Antibiogramm (76, 84). Bei dem Verdacht auf eine *early-onset* Infektion ist Penicillin G oder Ampicillin in Kombination mit einem Aminoglykosid häufig Mittel der Wahl (76). Die Empfehlungen für die empirische Therapie einer *late-onset* Infektion weichen teils stark voneinander ab. Während im angloamerikanischen Raum häufig Vancomycin gemeinsam mit einem Aminoglykosid appliziert wird, gibt es auch Empfehlungen für ein mehrstufiges Vorgehen. Die Wahl des AB ist u. a. von der antibiotischen Vorbehandlung der Mutter und der lokalen Resistenzsituation abhängig, welche vor Einleitung einer empirischen AB-Therapie immer berücksichtigt werden müssen (76, 84). Stufe 1 beinhaltet ein Aminoglykosid (Gentamicin) und Ampicillin/Sulbactam oder Flucloxacillin. In Stufe 2 soll Piperacillin/Tazobactam verabreicht werden und bei ausbleibender Wirkung wird als 3. Stufe eine Kombination aus Vancomycin (alternativ ggf. Teicoplanin) und Meropenem empfohlen (76).

Bei infizierten Neugeborenen ist bei Zeichen einer respiratorischen Insuffizienz neben der systemischen AB-Therapie häufig die Applikation von exogenem Surfactant indiziert (85, 86). Eine Untersuchung zeigte, dass sich die Surfactant-Applikation bei Früh- und Neugeborenen mit einer pulmonalen *GBS*-Infektion positiv auf den Gasaustausch auswirken kann (85). In *E. coli* infizierten Ratten führte schon die alleinige Applikation des porcinen Surfactants PA zu einer signifikant verbesserten Oxygenierung (87). Das Surfactant könnte im Rahmen einer pulmonalen Infektion zur Wiederbelüftung atelektatischer Lungenareale und folglich zu einem besseren Gasaustausch führen (88). Zudem konnte bereits in den neunziger Jahren in Studien mit *GBS* infizierten Tierlungen gezeigt werden, dass auch PA selbst antibakterielle und antiproliferative Eigenschaften besitzt (86, 89-91).

1.4.2 TOPISCHE PULMONALE ANTIBIOTIKATHERAPIE – MÖGLICHKEITEN IN ZUKUNFT

Im Falle einer bakteriellen pulmonalen Infektion bestehen abhängig von der Ätiologie des Infekts unterschiedliche antibiotische Therapiemöglichkeiten. Während bei ambulant bzw. nosokomial erworbenen Pneumonien die systemische Therapie Mittel der Wahl ist, wird Mukoviszidose-Patienten (zystische Fibrose; *engl.: cystic fibrosis*; CF) mit einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa*- (*P. aeruginosa*) Infektion derzeit eine inhalative antibiotische Intervallbehandlung

empfohlen (92). Von einer Behandlung dieser Art können z. B. auch Patienten mit einer Non-CF-Bronchiektasie (Bronchiektasien, die nicht auf einer zystischen Fibrose basieren) profitieren (93, 94). Da in diesem Fall aufgrund der begrenzten Studienlage inhalative AB aber oftmals unzulässig sind, wird eine strenge Indikationsstellung vorausgesetzt (94).

Eine inhalative bzw. lokale AB-Therapie könnte im Vergleich zu einer systemischen Behandlung unter Umständen gewisse Vorteile haben. Neben der oftmals problemlosen Vorgehensweise besteht ein geringeres Risiko, systemische Nebenwirkungen zu entwickeln. Zudem erreicht ein lokal appliziertes Arzneimittel aufgrund des geringeren Verteilungsvolumens im Körper das zu therapierende Organ bzw. Gewebe besser (Absorption), schneller und in einer höheren Konzentration (Distribution) (95). Letzteres macht eine geringere Medikamentendosierung notwendig. Bei lokalen Anwendungen von AB kommt es außerdem zu weniger Resistenzentwicklungen. Die derzeit für bakterielle Lungenerkrankungen zugelassenen Therapieoptionen können unter Umständen limitierende Faktoren aufweisen. Im Falle einer schlechten Lungenfunktion oder aufgrund von Atelektasen kann die Verteilungsrate eines Aerosols in periphere Lungenabschnitte z. B. vermindert sein (96). Im Rahmen einer lokalen Kombinationstherapie mit AB und Surfactant könnten jedoch bestehende Atelektasen durch das Surfactant wiedereröffnet (53, 88, 97) und das beigemischte AB gemeinsam mit dem Surfactant durch seinen Spreitungseffekt in genau diese Lungenareale verteilt werden (s. Punkt 1.5). Die Verteilung des Arzneimittels wäre in diesem Fall auch nicht von der Leistungsfähigkeit des Patienten während der Inhalation abhängig. Ebenso kann eine intravenöse AB-Therapie im Rahmen einer pulmonalen Infektion eine eingeschränkte Wirkung haben. Hier spielt der Euler-Liljestrand-Reflex eine zentrale Rolle. Aufgrund dessen kann in atelektatischen/minderbelüfteten Lungenabschnitten, die von einer Infektion oftmals am stärksten betroffen sind (96), eine Vasokonstriktion und folglich eine reduzierte Durchblutung auftreten (19). Eine intravenöse AB-Therapie könnte so eine verminderte Distribution und somit Konzentration des AB in diesen Bereichen zur Folge haben. Die intratracheale Surfactant-Applikation könnte diesem Phänomen durch eine Wiederbelüftung der Atelektasen entgegenwirken und ein kombiniertes AB ggf. direkt am Infektionsort lokal wirken.

1.5 DIE KOMBINATION VON SURFACTANT UND ANTIBIOTIKA: VORSTUDIEN

Bereits in den letzten Jahrzehnten wurde die Kombination aus exogenem Surfactant und AB sowohl *in vitro* als auch in Studien am Tiermodell untersucht. Bis heute besteht die Idee, dass Surfactant im Rahmen einer lokalen pulmonalen Therapie für AB - aber auch für andere Arzneimittel - als Trägerstoff fungieren kann (88, 95, 98, 99). Die Hypothese ist, dass sich das AB bei einer kombinierten intratrachealen Applikation gemeinsam mit dem Surfactant auf der feuchten Lungenoberfläche bis in die Peripherie der Lunge ausbreitet und somit eine großflächigere lokale antibakterielle Wirkung erzielt werden kann (53, 97). In einer Studie von Kharasch et al. wurde die

pulmonale Verteilung von Pentamidin, einem Antiprotozoikum, nach intratrachealer Applikation einmal mit Surfactant und einmal mit Kochsalzlösung in Hamsterlungen untersucht (98). Der Vergleich zeigte eine signifikant weitere und homogenere Verteilung der Proben, die Surfactant enthielten. Derselbe und ein weiterer Effekt zeigte sich in einer ähnlich aufgebauten Studie von van't Veen et al. (88). Zum einen hatte die Hinzugabe von Surfactant zu intratracheal appliziertem Tobramycin einen positiven Effekt auf die lokale antimikrobielle Wirkung. Zum anderen führte die Kombination im Vergleich zu reinem Tobramycin zu einem erhöhten systemischen AB-Spiegel. Dies wurde auf eine vermehrte alveoläre Absorption des AB zurückgeführt, was vermutlich ebenso aus der stärkeren Verteilung resultierte. Möglicherweise könnte sich eine gesteigerte Arzneimittelabsorption als Nachteil erweisen, da aufgrund dessen mehr systemische Nebenwirkungen auftreten könnten. Es zeigt jedoch, dass diese Art der Therapie durchaus auch als alternative Applikationsform für systemische Therapien in Betracht gezogen werden könnte. So konnte beispielsweise an diabeteskranken Ratten gezeigt werden, dass eine kombinierte pulmonale Applikation von Insulin und Surfactant zu einer signifikant besseren Absorption des Insulins führte als eine alleinige Insulinapplikation (100). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von Surfactant auf das klinische Ergebnis einer lokalen pulmonalen AB-Therapie (95). Es wurde die Überlebensrate von *Klebsiella pneumoniae* infizierten Mäusen verglichen, die entweder mit AB (Tobramycin), Surfactant oder einer Kombination aus beiden intratracheal therapiert wurden. Die Überlebensrate bei Mäusen mit einer kombinierten Behandlung war nach acht Tagen mehr als doppelt bzw. viermal so hoch wie bei den anderen Mäusen. Die kombinierte intratracheale Applikation unterschiedlicher Pharmaka zusammen mit Surfactant könnte diesen Ergebnissen zur Folge eine zukunftsreiche Therapiemöglichkeit darstellen.

2 FRAGESTELLUNG

Ziel unserer Forschungsarbeit war es, den gegenseitigen Einfluss von PA und insgesamt fünf AB zu untersuchen. Für jeden Einzelversuch sollten daher folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat das porcine exogene Surfactant PA als möglicher Trägerstoff *in vitro* einen Effekt auf die lokale Ausbreitung verschiedener Antibiotika?
- Nimmt eine steigende AB-Konzentration *in vitro* Einfluss auf das Ausmaß der lokalen Bakterienhemmung?
- Hat ein erhöhtes Hypophasenvolumen *in vitro* Einfluss auf die lokale Ausbreitung des zentral applizierten AB mit und ohne PA?
- Kommt es im Rahmen einer Kombination von PA und AB zu Interaktionen, die einen Funktionsverlust der OFS-reduzierenden Eigenschaften des Surfactants herbeiführen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 IN VITRO BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE

3.1.1 MATERIALIEN

In folgenden Tabellen werden Informationen über Bakterienstämme, Arzneimittel, technische Hilfsmittel sowie weitere verwendete Substanzen bzw. Materialien zusammengefasst.

Tabelle 3: Bakterienstämme, die im Rahmen der *in vitro* Versuche verwendet wurden (86).

Bakterienspezies	Bakterienstamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
<i>High density und Low density Gruppe-B-Streptokokken</i>	Ia Colindale	bereitgestellt von der Universität Umeå, Schweden
<i>Staphylokokkus aureus</i>	ATCC 25923	ATCC, Rockville, USA

Tabelle 4: Antibiotika, die für die *in vitro* Versuche verwendet wurden; Abkürzungen: Aqua dest.: *Aqua destillata* (dt.: destilliertes Wasser), Ch.-B.: Chargenbezeichnung, ETOH: Ethanol, i. m.: intramuskulär, i. v.: intravenös, Lot.: Lotnummer, NaCl 0,9%: Natriumchlorid 0,9% (w/v).

Antibiotikum	Produkt	Ansatz des AB	Lagerung	Chargen-/ Lot-/ Bestellnummer
<i>Azithromycin</i>	Azithromycin der Marke SIGMA-ALDRICH® PHR 1088 – 1 g; Firma <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Dtl.	10 mg Pulver gelöst in 1 ml 100% ETOH – nicht löslich in NaCl 0,9% oder Aqua dest.	gefroren bei -20°C	Ch.-B: 11771780 Lot.: LRAA8976
<i>Cefotaxim</i>	CEFOTAXIM EBERTH 0,5 g; Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung der Firma <i>EBERTH</i> , Ursensollen, Dtl.	0,5 g Pulver gelöst in 2 ml Aqua dest. → Verdünnung auf 10 mg/ml mit NaCl 0,9%	gefroren bei -20°C	Ch.-B: B15001A
<i>Gentamicin</i>	Gentamicin-ratiopharm® 80 mg/2 ml SF als Injektionslösung zur i.v.- oder i.m.-Gabe der Firma <i>ratiopharm GmbH</i> , Ulm, Dtl.	40 mg Pulver gelöst in 1 ml NaCl 0,9% → Verdünnung auf 10 mg/ml mit NaCl 0,9%	Aufbewahrung der Originallösung bei Raumtemperatur	Ch.-B.: S01768

<i>Moxifloxacin</i>	Moxifloxacin der Marke SIGMA-ALDRICH® PHR 1542 – 1 g; Firma <i>Merck</i> <i>KGaA</i> , Darmstadt, Dtl.	10 mg Pulver gelöst in 1 ml Aqua dest. – nicht löslich in NaCl 0,9%	gefroren bei - 20°C	Ch.-B.: 11785897 Lot.: LRAA7396
<i>Teicoplanin</i>	TARGOCID® I.M./I.V. 400 mg; Trockensubstanz zur Herstellung einer Injektionslösung der Firma <i>SANOFI</i> , Frankfurt, Dtl.	100 mg Pulver gelöst in 1 ml Aqua dest. → Verdünnung auf 10 mg/ml in NaCl 0,9%	gefroren bei - 20°C	Ch.-B.: A3741

Tabelle 5: Substanzen, die bei der Vorbereitung und der Durchführung der Versuche Verwendung fanden; Abkürzungen: Ch.-B.: Chargenbezeichnung, Ethanol p. a.: Ethanol pro analysi, Lot.: Lotnummer, NaCl 0,9%: Natriumchlorid 0,9% (w/v).

Substanz	Produkt	Firma	Chargen-/ Bestell-/ Artikelnummer
Agar-Grundsubstanz	<i>Columbia Agar Base</i>	<i>OXOID Ltd.</i> , Wade Road, Basingstoke, Hants, UK	-
Ethanol p. a.	Ethanol „Baker analyzed“ (1 L)	<i>J. T. Baker</i> ; Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande	Lot: 1433005002
NaCl-Lösung 0,9%	Sodium Chloride, Molecular Biology Grade	<i>Calbiochem</i> ® U.S./Canada	Ch.-B.: D00166767
Nähr-Bouillon	Standard- Nährbouillon	<i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Dtl.	-
Poractant alfa 80 mg/ml - porcines Surfactant (pH-Wert 5,5 - 6,5)	<i>Curosurf</i> ® 80 mg/ml	<i>Chiesi GmbH</i> , Hamburg, Dtl.	Ch.-B.: 53289/1042404 Ch.-B.: 079672 Ch.-B.: 10296363
Schafblut	Schafblut, defibriniert (100 ml)	<i>Thermo Scientific Oxoid</i> , Basingstoke, Hampshire, England	-

Tabelle 6: Technische Hilfsmittel, die bei der Vorbereitung und der Durchführung der Versuche Verwendung fanden.

Technisches Hilfsmittel	Produkt	Firma
Autoklav	<i>Systemec V95</i>	<i>Systemec GmbH</i> ; Labor-System- technik, Wettengel, Dtl.
Inkubator	<i>IN 260^{PLUS}</i>	der Firma <i>memmert GmbH &</i> <i>CoKG</i> , Schwabach, Dtl.
Koloniezählgerät	<i>schuett colonyQuant</i>	<i>schuett-biotec GmbH</i> , Göttingen, Dtl.

Petrischalen	92 x 16 mm mit Nocken; Bestellnummer: 82.1473.001	Firma <i>Sarstedt</i> , Nümbrecht, Dtl.
Photometer	<i>JENWAY 6315 Spectrophotometer</i>	<i>Bibby Scientific</i> ; Stone, Staffordshire, UK
Pulsating Bubble Surfactometer	<i>Pulsating Bubble Surfactometer</i> ®	<i>Electronetics Corporation</i> , Amherst, New York, USA
Schüttelinkubator	<i>Thermoshake Typ TH05/THL5</i>	<i>C. Gerhardt GmbH & CoKG</i> , Bonn, Dtl.
Statistiksoftware	<i>GraphPad Prism</i> , Version 6.07	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Zentrifuge	<i>Jouan BR4i</i> mit einem S40 Rotor	<i>Thermo ELECTRON CORPORATION</i> , Waltham, Massachusetts, USA

3.1.2 VERSUCHSVORBEREITUNGEN

3.1.2.1 BLUTAGAR

Für alle Bakterienhemmhofversuche sowie für das Ausplattieren bzw. den Gussagar der Verdünnungsreihen wurde Schafblutagar verwendet. Für die Zubereitung des Blutagars wurden zunächst 39 g der pulvrigen Grundsubstanz *Columbia Agar Base* (s. Tabelle 5) in einem Liter Aqua dest. (*Aqua destillata*; dt.: destilliertes Wasser) aufgelöst und autoklaviert (s. Tabelle 6). Dem sterilisierten Agar wurde 5% (v/v) defibriniertes Schafblut (s. Tabelle 5) hinzugegeben. Um eine Hämolyse zu vermeiden, wurde das Schafblut dem flüssigen Agar erst bei Hand-Temperatur hinzugefügt. Daraufhin wurden Petrischalen (s. Tabelle 6) mit je 15 ml Blutagar befüllt und mit einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert. Nach dem Auskühlen der Platten bei Raumtemperatur wurden sie über Nacht bei 4°C gelagert.

Für die selbstgegossenen Agarplatten wurden tägliche Qualitätskontrollen durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl der an selbigem Tag verwendeten Bakteriensuspension (I) in einer 10⁻⁶-Verdünnung (wie sie für die interne Kontrolle der vitalen Bakterienkonzentration hergestellt wurde; s. Punkt 3.1.2.4) auf je zwei Agarplatten ausplattiert. Es erfolgte die Verwendung der 10⁻⁶-Verdünnung, da in diesem Fall Einzelkolonien entstanden, die eine morphologische Beurteilung ermöglichten. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Wachstum, Größe, Farbe und Hämolysereaktion geprüft und anhand dessen die Qualität des Agars beurteilt.

3.1.2.2 BAKTERIENAUSWAHL

Für die *in vitro* Versuche wurden Bakterien gewählt, die für pulmonale Infektionen bei Früh- bzw. Neugeborenen typisch sind. Die Bakterienhemmhofversuche erfolgten mit *E. coli*, *GBS* sowie *S.*

aureus (86). Für die Experimente mit *GBS* wurden zwei Gruppen unterschiedlicher Dichte verwendet. Abhängig von der Präsenz bzw. Absenz einer Polysaccharidkapsel werden diese in „low density“ (*LD*) bzw. „high density“ (*HD*) *GBS* unterteilt. Aufgrund der Polysaccharidkapsel unterscheiden sich die Bakterien in ihrer Virulenz, wobei *GBS-LD* eine höhere Resistenz gegenüber der Phagozytose durch Leukozyten aufweisen und eine langsamere und schwächere Immunantwort hervorrufen (86, 101, 102). Beide Untergruppen gehören dem *GBS* Bakterienstamm *Ia Colindale* an, welcher von der Universität Umeå, Schweden, zur Verfügung gestellt wurde. Die *S. aureus*- (*ATCC 25923*) sowie *E. coli*- (*ATCC 25922*) Bakterienproben stammen aus der *American Type Culture Collection (ATCC)*, Rockville, USA (86) (zusammengefasst in Tabelle 3). Die Auswahl der AB richtete sich nach der Sensibilität der verwendeten Bakterien.

3.1.2.3 HERSTELLUNG DER BAKTERIENSUSPENSIONEN

Alle Bakterien waren in E-Cups als 1 ml-Bakteriensuspension bei -20°C tiefgefroren gelagert. Zu Beginn wurde eine 1 ml-Bakteriensuspension einer 11,5 ml sterilen Standard-Nährbouillon (s. Tabelle 5) zugegeben und im Inkubator (s. Tabelle 6) stehend bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Danach wurden 7,5 ml dieser Bakterienlösung in 50 ml sterile Bouillon (37°C) gegeben. Die Nährbouillon wurde im Vorfeld durch Lösung von 25 g in einem Liter Aqua dest. hergestellt und autoklaviert. Die Bakterienkulturen wurden in einem Schüttelinkubator (s. Tabelle 6) bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute für 60 min (*E. coli*) bzw. 150 min (*S. aureus*) inkubiert. Suspensionen mit *GBS-LD* sowie *-HD* wurden ohne Agitation inkubiert. Nach Pelletierung der Bakterien in der Zentrifuge (s. Tabelle 6) für 10 min bei 24°C mit 3300 Umdrehungen pro Minute erfolgte eine zweifache Waschung der Bakterien mit steriler Natriumchloridlösung 0,9% (w/v) (isotone Kochsalzlösung; NaCl 0,9%; s. Tabelle 5). Nach Resuspendierung der Bakterienpellets in NaCl 0,9% wurde mittels Spektrophotometer (s. Tabelle 6) eine konzentrierte Bakterienlösung (I) mit einer optischen Dichte von 1,53 generiert (Wellenlänge 595 nm). Eine zweite Bakterienlösung (II), welche die Hälfte der Bakterienmenge von (I) enthalten sollte, wurde durch eine 1:1-Mischung der Bakterienlösung (I) und NaCl 0,9% gewonnen.

3.1.2.4 INTERNE KONTROLLE DER VITALEN BAKTERIENKONZENTRATION

Nach Fertigstellung der Suspensionen (I) und (II) wurde zur internen Kontrolle die vitale Bakterienkonzentration für beide Suspensionen bestimmt. Zunächst wurde in insgesamt 14 Reagenzgläser (2 Reihen á 7 Gläser) eine isotone NaCl-Lösung gegeben. Die ersten Röhrchen erhielten jeweils 900 µl, jedes weitere (zwei - sieben) 4,5 ml. Zu den 900 µl NaCl 0,9% wurden jeweils 100 µl der Suspensionen (I) bzw. (II) gegeben. Aus der ersten Verdünnung wurden 500 µl entnommen und den 4,5 ml NaCl 0,9% des folgenden Röhrchens zugeführt (10^{-2}) usw., bis zur letzten Verdünnung (10^{-7}). Lediglich aus den letzten drei Verdünnungen (10^{-5} - 10^{-7}) wurden am

Ende 100 µl auf den Blutagar bzw. die Petrischale transferiert. Abhängig von ihrem Hämolyseverhalten wurden die Bakterien entweder auf Schafblutagar-Nährböden mittels selbst geformter Glas-Pasteurpipette gleichmäßig ausplattiert (*S. aureus* – keine β-Hämolyse; s. Abb. 6) oder im Schafblut-Gussagar inkubiert (*E. coli*, *GBS-HD* und *-LD* – β-hämolysierend). Für den Gussagar wurden 100 µl der verdünnten Bakteriensuspensionen in eine leere Petrischale pipettiert und 15 ml Schafblutagar hinzugegeben, bevor dieser bei Raumtemperatur aushärtete. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung angefertigt.



Abbildung 6: Vorgang des Ausplattierens der Bakteriensuspension auf ausgekühltem Schafblutagar mittels selbst geformter Glas-Pasteurpipette. Nach zentraler Applikation der Bakteriensuspension wurde die Lösung mithilfe der Glas-Pasteurpipette gleichmäßig auf der Oberfläche des Schafblutagars verteilt.

Es folgte eine 24-stündige Inkubation aller Proben bei 37°C in Ruhe. Am Folgetag wurden die KBE pro Petrischale durch eine manuelle Auszählung bestimmt. Es wurde der Mittelwert aus den Doppelbestimmungen für jede Verdünnung ermittelt und die Anzahl der KBE pro ml berechnet. Hierfür diente in der Regel der Mittelwert der ausplattierten 10⁻⁶-Verdünnung.

3.1.2.5 ANTIBIOTIKA

3.1.2.5.1 CHARAKTERISTISCHE EIGENSCHAFTEN

Im Folgenden werden fünf AB charakterisiert, die im Rahmen der *in vitro* Versuche verwendet wurden (s. Tabelle 4). Tabelle 7 zeigt, in welchen Kombinationen die unterschiedlichen Bakterienstämme und AB untersucht wurden.

Tabelle 7: Verwendete Bakterien-Antibiotika-Kombinationen in den *in vitro* Hemmhofversuchen.

Bakterien	Antibiotika
<i>Escherichia coli</i>	Cefotaxim, Gentamicin, Azithromycin
<i>High density Gruppe-B- Streptokokken</i>	Teicoplanin, Moxifloxacin, Azithromycin
<i>Low density Gruppe-B- Streptokokken -LD</i>	Teicoplanin, Moxifloxacin, Azithromycin
<i>Staphylokokkus aureus</i>	Teicoplanin, Moxifloxacin, Azithromycin

Azithromycin ist ein Makrolid-AB, das durch die Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen die bakterielle Proteinsynthese hemmt (101). Makrolide wirken überwiegend bakteriostatisch, in höherer Konzentration ggf. auch bakterizid. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften ist Azithromycin gut gewebeängig und verteilt sich mit einem Verteilungsvolumen von ca. 25 l/kg Körpergewicht (KG) intra- und extrazellulär. Daher weist es eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegen intrazelluläre Erreger auf. Der Einsatz erfolgt bei Infektionen mit atypischen Erregern wie Mykoplasmen, Legionellen und Chlamydien aber auch Streptokokken, Gonokokken und intestinalen Erregern wie Shigellen und ggf. Salmonellen (102). Obwohl eine *E. coli*-Infektion primär keine Indikation für eine Makrolidbehandlung darstellt, konnte im Rahmen der *EHEC*-Epidemie im Jahr 2011 durch Azithromycin die Anzahl der *E. coli*-Dauerausscheider erfolgreich reduziert werden (103). Azithromycin hat eine Halbwertszeit von > 14 Stunden. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) liegt laut *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) für *E. coli* zwischen 1 mg/l und 8 mg/l (Zielkonzentration 4 mg/l), für *S. aureus* zwischen 0,25 mg/l und 2 mg/l (Zielkonzentration 1 mg/l) und für *GBS* zwischen 0,03 mg/l und 0,25 mg/l (Zielkonzentration 0,125 mg/l). Die MHK beschreibt die niedrigste AB-Konzentration, die gerade ausreicht, um das *in vitro* Wachstum eines definierten Bakterienstammes zu hemmen (104). Die MHK von ein und demselben AB variiert zwischen verschiedenen Bakterienstämmen teils enorm. Die hier und im Folgenden aufgeführten Daten beziehen sich auf die Hemmung sensibler Wildtyp-Bakterienstämme.

Cefotaxim ist ein Cephalosporin der Gruppe 3a und gehört somit der Substanzklasse der Beta-Lactam-AB an. Durch die Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese wirken Beta-Lactam-AB bakterizid (105). Die Verteilung von Cefotaxim erfolgt mit einem Verteilungsvolumen von ca. 0,2-0,4 l/kg KG aufgrund der ausgeprägten Hydrophilie überwiegend extrazellulär. Die Wirksamkeit richtet sich gegen ein breites Keimspektrum, insbesondere aber gegen Gram-negative Bakterien. Doch auch gegen Staphylokokken und Streptokokken ist Cefotaxim wirksam. Eine Resistenz besteht bei *ESBL-Enterobacteriaceae* („Extended-Spektrum“-Beta-Lactamasen), der mit Beta-Lactamase-Inhibitoren entgegengewirkt werden kann. Die Halbwertszeit liegt etwa bei 2 Stunden (102). Die MHK von Cefotaxim für *E. coli* liegt nach aktuellen Informationen von EUCAST zwischen 0,03 mg/l und 0,125 mg/l (Zielkonzentration 0,06 mg/l) (104).

Gentamicin ist ein AB aus der Gruppe der Aminoglykoside. Durch Bindung der Ribosomen an der 30S-Untereinheit hemmen sie die bakterielle Proteinbiosynthese und wirken so bakterizid (106). Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften sind Aminoglykoside schlecht membrangängig und haben daher eine überwiegend extrazelluläre Verteilung zur Folge. Für einen optimalen Therapieerfolg sollte die Serum- bzw. Gewebekonzentration die MHK des jeweiligen Erregers um mindestens das Zehnfache übersteigen. Die MHK für *E. coli* liegt laut EUCAST zwischen 0,25 mg/l und 1 mg/l (Zielkonzentration 0,5 mg/l) (104). Das Verteilungsvolumen beträgt ca. 0,25 l/kg KG mit individuellen Schwankungen zwischen 0,1-0,8 l/kg KG. Gentamicin ist gegen ein breites

Spektrum an Bakterien aus dem Gram-negativen Bereich wirksam, v. a. gegen Keime aus der Familie der *Enterobacteriaceae* (102). Aufgrund des synergistischen Effekts werden Aminoglykoside in Kombination mit anderen AB, i. d. R. Beta-Lactam-AB, auch gegen Gram-positive Keime eingesetzt (102, 106). Die Bioaktivität von Aminoglykosiden ist stark vom pH-Wert abhängig. In saurer und anaerober Umgebung oder in Anwesenheit von ungebundenen Kationen wird die Aktivität negativ beeinflusst (97, 102). Die Halbwertszeit von Gentamicin liegt bei ca. 2 Stunden. Aminoglykoside können schwere nephro- und ototoxische Nebenwirkungen verursachen.

Moxifloxacin ist ein AB aus der 4. Gruppe der Fluorchinolone. Durch die Hemmung der DNA-Gyrase und Topoisomerase IV (107) erstreckt sich die bakterizide Wirkung insbesondere über ein breites Gram-negatives Erregerspektrum. Moxifloxacin weist zudem eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber den Gram-positiven Staphylokokken und Streptokokken auf. Da es sich aufgrund seiner Lipophilie mit einem Verteilungsvolumen von etwa 2-4 l/kg KG sowohl extra- als auch intrazellulär ausbreitet, ist es u. a. Mittel der Wahl bei Infektionen mit Legionellen, Chlamydien und Mykoplasmen. Außerdem werden durch Moxifloxacin Gram-positive und Gram-negative Anaerobier abgedeckt. *E. coli* sowie *Enterobacteriaceae* sind häufig resistent (102). Die Halbwertszeit für Moxifloxacin beträgt > 10 Stunden und die MHK liegt für *S. aureus* zwischen 0,016 mg/l und 0,25 mg/l (Zielkonzentration 0,03 - 0,06 mg/l) und für *GBS* zwischen 0,06 mg/l und 0,25 mg/l (Zielkonzentration 0,125 mg/l) (104). Die Plasmaproteinbindung beträgt bei Fluorchinolonen meist < 40% (102).

Teicoplanin ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der Glykopeptid-AB, welches durch die Bindung eines bakteriellen Zellwandpeptids die Zellwandsynthese hemmt (102, 108). Teicoplanin hat eine bakterizide und teils bakteriostatische Wirkung auf Aerobier und Anaerobier ausschließlich im Gram-positiven Bereich. Darunter fallen neben Staphylokokken und Streptokokken auch Enterokokken, Corynebakterien und *Clostridium difficile*. Es weist zudem eine gute Wirksamkeit gegen Methicillin-resistente Staphylokokken-Stämme und *Enterococcus faecium* auf. Teicoplanin ist aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften schlecht membrangängig und wirkt daher überwiegend im Extrazellularraum. Das Verteilungsvolumen beträgt etwa 1 l/kg KG, starke individuelle Schwankungen sind jedoch möglich. Die Plasmaproteinbindung liegt bei 90% und die Plasmahalbwertszeit ist mit 70-100 Stunden sehr hoch (102). Laut Informationen der EUCAST-Datenbank liegt die MHK für *GBS* zwischen 0,06 mg/l und 0,25 mg/l (Zielkonzentration 0,125 mg/l) und für *S. aureus* zwischen 0,25 mg/l und 2 mg/l (Zielkonzentration 0,5 mg/l) (104). Der Einsatz von Glykopeptiden ist überwiegend bei Infektionen mit resistenten Keimen indiziert (102).

3.1.2.5.2 VERDÜNNUNG DER ANTIBIOTIKAPROBEN

Für die *in vitro* Bakterienhemmhofversuche wurden zwei AB-Verdünnungsreihen mit je sechs Konzentrationen hergestellt. Die eine Verdünnungsreihe (Proben 1-6) enthielt AB und PA, die andere enthielt nur AB (Proben 7-12; Kontrollreihe):

Schritt 1: Mittels isotoner Kochsalzlösung wurden die verschiedenen AB von ihrer Originalkonzentration (s. Tabelle 4) zunächst auf 10 mg/ml und das porcine Surfactant PA (s. Tabelle 5) von 80 mg/ml auf 20 mg/ml verdünnt.

Schritt 2 (s. Abb. 7): Durch weitere Verdünnungen mit NaCl 0,9% wurden sechs AB-Ansätze unterschiedlicher Konzentration hergestellt (1'-6' als Grundlage für die AB-Proben 1-12).

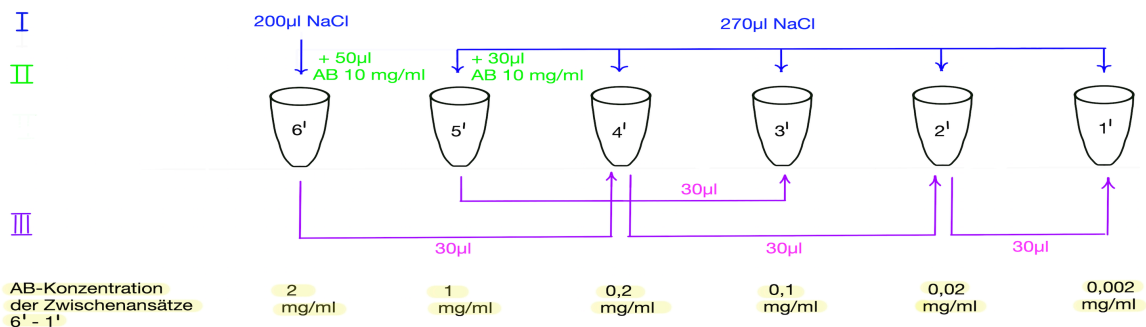


Abbildung 7: Schematische Darstellung, wie die Antibiotika-Zwischenansätze 1'-6' hergestellt wurden. Diese dienen als Grundlage für die Herstellung der Antibiotikaproben 1-12: (I) Ein E-Cup (6') wurde mit 200 µl und fünf E-Cups (1'-5') mit 270 µl Natriumchlorid 0,9% befüllt. (II) Zu 6' wurden daraufhin 50 µl und zu 5' 30 µl AB 10 mg/ml hinzugegeben, sodass eine Antibiotikum (AB)-Konzentration von 2 mg/ml in 6' bzw. 1 mg/ml in 5' entstand. (III) Es erfolgten weitere Verdünnungen aus den Proben 6' und 5', indem aus diesen jeweils 30 µl in die Ansätze 4' (aus 6') bzw. 3' (aus 5') gegeben wurden. Der Ansatz 2' entstand durch die Hinzugabe von 30 µl aus dem Ansatz 4' und der Ansatz 1' entstand zuletzt durch 30 µl aus 2'. Für die Ansätze 1'-6' ergaben sich somit die unter der Abbildung dargestellten, gelb markierten AB-Konzentrationen.

Schritt 3 (s. Abb. 8): Es folgte die Herstellung der AB-Proben 1-12 für die Hemmhofversuche.

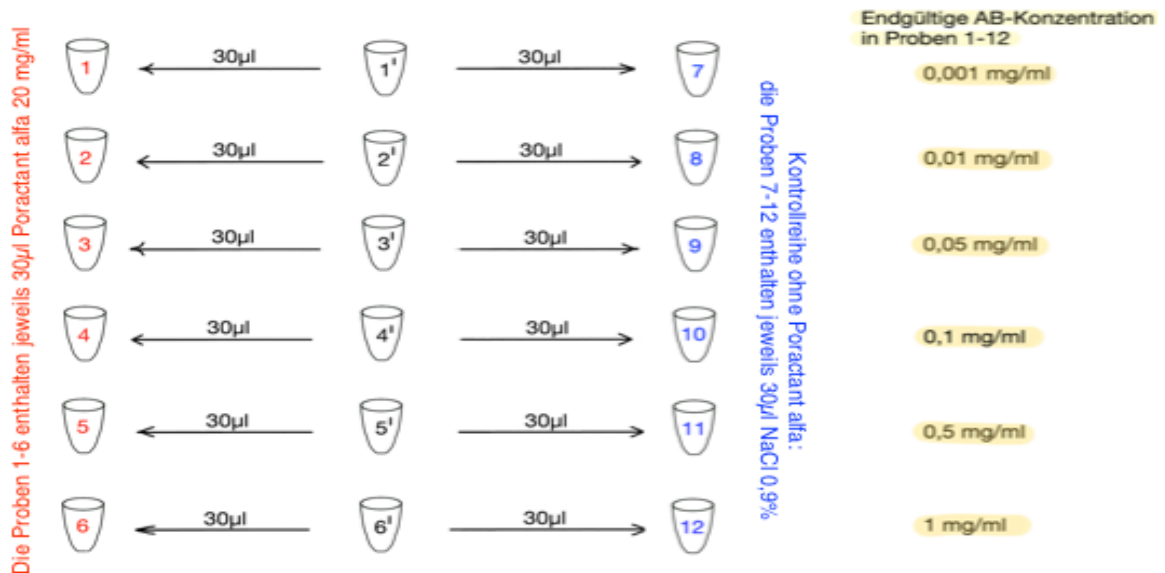


Abbildung 8: Schematisch dargestellt ist die Herstellung der Antibiotikaproben 1-12, welche für die *in vitro* Bakterienhemmhofversuche verwendet wurden: Während die E-Cups 1-6 jeweils mit 30 µl Poractant alfa (PA) 20 mg/ml befüllt wurden, erhielten die Proben 7-12 (Kontrollreihe) die entsprechende Menge Natriumchlorid 0,9%. Im Folgenden wurden in je ein E-Cup mit PA und ein E-Cup ohne PA 30 µl aus einer in Schritt 2 hergestellten Antibiotikum-Verdünnung (1'-6') pipettiert. Die endgültige PA-Konzentration in den Proben 1-6 betrug folglich 10 mg/ml während die Proben 7-12 kein PA enthielten.

Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich zwei weitere Proben (13 und 14) mit deutlich erhöhten AB- bzw. maximal möglichen PA-Konzentrationen hergestellt. Im Vergleich zu Versuchen mit den

Proben 1-12 sollte ermittelt werden, ob bei deutlich gesteigerten Arzneimittelkonzentrationen (sowohl AB als auch PA) größere Bakterienhemmhöfe entstehen. Probe Nr. 13 enthielt 10 mg/ml AB und kein Surfactant. Diese AB-Konzentration wurde gewählt, da bei höheren AB-Konzentrationen lokal mit unphysiologisch hohen AB-Konzentrationen zu rechnen gewesen wäre. Für die Probe Nr. 14 wurde PA in seiner ursprünglichen Konzentration (80 mg/ml) mit einem geringen Anteil AB 10 mg/ml vermischt. Das AB wurde zu einem Anteil von 1:10 zu PA hinzugegeben (\rightarrow 72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB). Hiermit wurde der Effekt einer höchstmöglichen PA-Konzentration in Kombination mit AB ermittelt.

3.1.3 VERSUCHSABLAUF

Jeder Bakterienwachstumsversuch bestand aus zwei Reihen mit identischem Versuchsprinzip. Deren Unterschied bestand in der Menge der Bakteriensuspension, die auf der Agaroberfläche verteilt wurde. Dieser Flüssigkeitsfilm dient *in vitro* zur Imitation der alveolären Hypophase. Er stellt eine bakterienhaltige wässrige Phase dar, auf der PA (plus das jeweilige AB) spreiten kann. Für die erste Versuchsreihe wurden 100 μ l der konzentrierten Bakterienlösung (I) mittig auf eine Agarplatte pipettiert und mittels Glas-Pasteurpipette (s. Abb. 6) gleichmäßig verteilt. Für die zweite Versuchsreihe wurden 200 μ l der verdünnten Bakterienlösung (II) auf jede Agarplatte gegeben und verteilt, sodass in diesem Versuchsablauf im Vergleich zu den Versuchen mit 100 μ l ein höheres Volumen der Hypophase vorlag.

Unmittelbar (max. fünf Minuten) nach Ausplattierung der Bakteriensuspension wurden je 10 μ l einer AB- bzw. AB/PA-Probe (Proben 1-14) mittig, zur Doppelbestimmung auf je zwei Agarplatten pipettiert.

Azithromycin stellte in unseren Versuchen eine Ausnahme dar. Die Stammlösung soll laut Herstellerangaben in 100% Ethanol (ETOH) p. a. (pro analysi, dt.: für analytische Zwecke geeignet; s. Tabelle 5) gelöst werden (s. Tabelle 4). Da ETOH selbst Bakterienwachstum hemmen könnte, wurden zum Ausschluss einer ETOH-bedingten Wachstumshemmung Versuchsreihen mit ETOH durchgeführt. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung mit 100% ETOH und 10% (v/v) ETOH (verdünnt mit NaCl 0,9%) angefertigt. Hierfür wurden anstelle einer AB- bzw. AB/PA-Probe 10 μ l ETOH 100% bzw. 10% (v/v) auf die Bakteriensuspension pipettiert.

Nach dem Pipettieren der AB-, AB/PA- bzw. ETOH-Proben wurden die Platten in Ruhe bei 37°C für 24 Stunden inkubiert.

3.1.4 VERSUCHSAUSWERTUNG

Am nächsten Tag folgte die Auswertung der Bakterienhemmhofversuche per Computeranalyse mithilfe des *schuett colonyQuant*-Systems (s. Tabelle 6 und Abb. 9), das aus einem automatischen Koloniezählgerät und einer zugehörigen Analyse-Software besteht. Mit seiner CCD-Firewire-

Farbkamera kann *schuett colonyQuant* zum einen bis zu 1000 einzelne Bakterienkolonien erfassen und Kolonien verschiedener Bakterienarten auf einer Agarplatte unterscheiden. Zum anderen besteht Herstellerangaben zur Folge mit diesem Programm die Möglichkeit Hemmhofflächen zu bestimmen. Aufgrund von Farbunterschieden bei stellenweise reduziertem Bakterienwachstum kann mithilfe des Programms auf einem flächigen Bakterienrasen Bakterienwachstum von Wachstumshemmhöfen unterschieden werden (s. Abb. 10). Somit kann die Grenzzone eines Wachstumshemmhofs definiert und die Fläche durch das Computerprogramm ermittelt werden. Als Hemmhof galten Bereiche, die nach der 24-stündigen Inkubationszeit im Vergleich zum flächigen Bakterienrasen kein oder ein vermindertes Bakterienwachstum aufwiesen. Im Rahmen unserer Versuche war eine absolute Bakterienhemmung nicht definierend für einen Hemmhof. Für optimale Bedingungen wurden vor Beginn einer jeden Versuchsauswertung eine Reihe von standardisierten Einstellungen am *schuett colonyQuant* PC-Programm getroffen. Während der Kamerazoom vor jeder Versuchsauswertung identisch eingestellt wurde, differierte die Anpassung der restlichen Parameter (Bildsättigung, -helligkeit und -kontrast) abhängig vom verwendeten Bakterienstamm standardisiert. Diese Parameter trugen im Rahmen der verschiedenen Versuche mit unterschiedlichen Bakterienrasen zur bestmöglichen Erkennbarkeit von Farbunterschieden bei. Für die Bestimmung der Größenverhältnisse wurden vor jeder Versuchsauswertung 50 mm kalibriert und die Einheit in mm² festgelegt. Nach Komplettierung der Einstellungen wurde je eine Petrischale in der Probenkammer des *schuett colonyQuant* platziert, fotografiert und die Grenzzone des ggf. mittig entstandenen Bakterienhemmhofs mithilfe des Computerprogramms markiert (s. Abb. 10 weiße Linie). Die Fläche des Hemmhofs wurde durch die Analyse-Software errechnet.



Abbildung 9: Koloniezählgerät *schuett colonyQuant* von der Firma *schuett-biotec GmbH*, Göttingen. Die Agarplatte wird in der Probenkammer des Geräts platziert und bei Dunkelheit (mit geschlossener Klappe) mit der integrierten hochauflösenden Farbkamera von oben fotografiert.

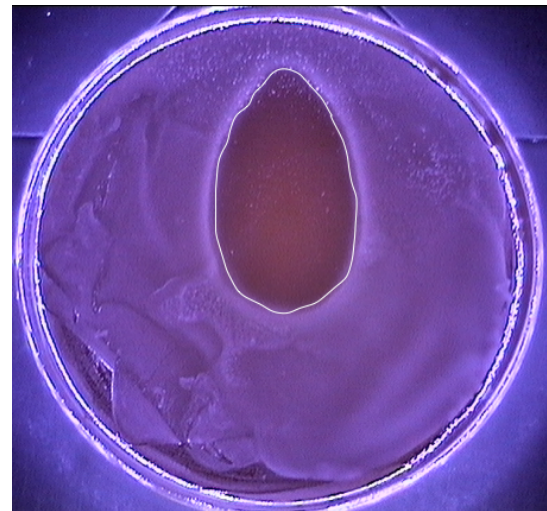


Abbildung 10: Petrischale mit Bakterienwachstum und Hemmhof auf Blutagar von oben. Der deutliche Farbunterschied macht eine Differenzierung zwischen Bakterienwachstum (*E. coli*-Bakterienrasen auf Blutagar; weißlich/lila Fläche) und dem Wachstumshemmhof (dunkelrote Fläche) gut möglich. Die Grenzzone ist durch eine weiße Linie markiert. Der Wachstumshemmhof entstand durch eine zentrale Applikation von 10 µl Cefotaxim 0,1 mg/ml + Poractant alfa 10 mg/ml.

3.2 PULSATING BUBBLE SURFACTOMETER - FUNKTIONSPRINZIP

Das Pulsating Bubble Surfactometer (PBS; s. Tabelle 6) ist ein Forschungsinstrument, womit die OFS an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche einer Gasblase gemessen werden kann. So kann es unter anderem zu *in vitro* Untersuchungen von Surfactant genutzt werden. Das Funktionsprinzip des PBS zielt darauf ab, eine Alveole während der In- und Expiration an einem *in vitro* Modell zu imitieren. Dies gelingt durch die zyklische Expansion und Kompression einer Gasblase.

3.2.1 MESSVORGANG

Um eine optimale Betriebstemperatur sicherzustellen, wurde das PBS-Gerät zunächst vorgeheizt. Um evtl. Probenrückstände von früheren Messungen zu entfernen erfolgte nach der Vorbereitungszeit ein ausgiebiges Spülen der Messkammer mit Aqua dest. Das Wasserniveau in der Messkammer wurde dann unter visueller Kontrolle durch ein Okular auf das Level „Null“ erhöht. Zwei Pfeile rechts und links dienten hierbei als Orientierung (s. Abb. 11). Im Folgenden wurde das PBS-Gerät so gegen den atmosphärischen Druck kalibriert und im Anschluss die Messkammer bis zum Maximum mit Wasser (37°C) gefüllt (s. Abb. 12).

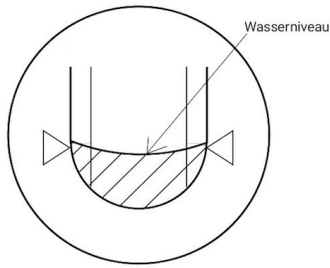


Abbildung 11: Sicht durch das Okular am Pulsating Bubble Surfactometer: Wasserniveau während der Kalibrierung in der Messkammer.

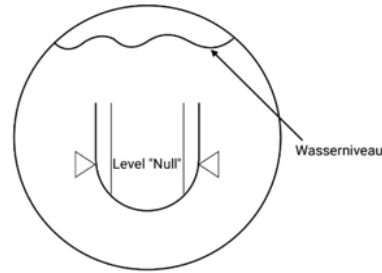


Abbildung 12: Sicht durch das Okular am Pulsating Bubble Surfactometer: Wasserniveau während der Versuchsdurchführung in der Messkammer.

Die mit 40 μl Probenflüssigkeit gefüllte Küvette wurde auf dem Messplatz platziert und in das Wasserbad gesenkt. Um Messfehler zu vermeiden, sollte die Küvette stets luftblasenfrei befüllt sein. Da der Schlot der Küvette mit der Atmosphäre verbunden war, wurde durch Ansaugen der Probenflüssigkeit Luft angesaugt, sodass eine von surfactanthaltiger Probenflüssigkeit umgebene Luftblase entstand. Diese wurde unter mikroskopisch visueller Kontrolle auf ein vorgegebenes minimales Volumen eingestellt (s. Abb. 13).

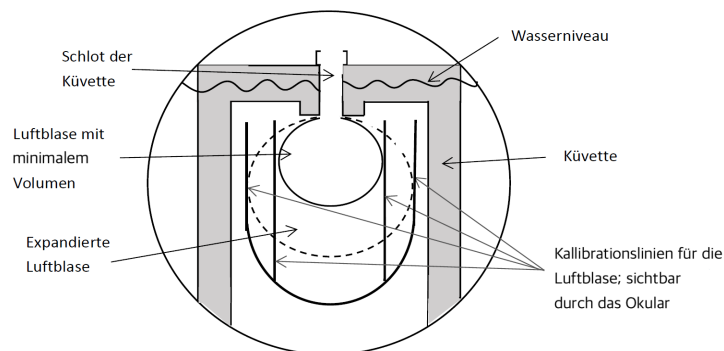


Abbildung 13: Sicht durch das Okular am Pulsating Bubble Surfactometer. Schematische Darstellung der Pulsationsphase: Nach Generierung einer Luftblase mit minimalem Blasenvolumen wird die Blase durch das Heraus- und Hineinpumpen von Probenflüssigkeit mit 20 Pulsationen/Minute zyklisch um 50% erweitert und komprimiert. Bei minimalem und maximalem Blasenradius (r) wird der transmurale Blasendruck (Δp) gemessen und die Oberflächenspannung (γ) mithilfe des *Gesetzes von Laplace* ($\Delta p = 2\gamma/r$ (Pa)) berechnet.

Nach einer 40-sekündigen Adsorptionsphase, in der sich oberflächenaktive Substanzen aus der surfactanthaltigen Probenflüssigkeit an die Oberfläche der Luftblase anlagern konnten, begann eine Kolbenpumpe Probenflüssigkeit aus der Küvette heraus- und hineinzupumpen. Die Luftblase wurde auf diese Weise mit 20 Pulsationen pro Minute über fünf Minuten zyklisch auf eine maximale Größe erweitert und wieder auf ihre Ausgangsgröße komprimiert (s. Abb. 13). Ihre Oberfläche vergrößerte bzw. reduzierte sich dabei jeweils um 50%. Der transmurale Blasendruck (Δp), d. h. die Druckdifferenz zwischen Atmosphäre und Probenflüssigkeit, wurde kontinuierlich gemessen. Bei bekanntem Blasenradius (r) wurde zur Errechnung der OFS (γ) das *Gesetz von Laplace* ($\Delta p = 2\gamma/r$ (Pa)) genutzt (s. Punkt 1.1.3) und mittels Computersoftware berechnet. Für γ wurden die Werte bei minimalem und maximalem Blasenvolumen aufgezeichnet. Diese Werte entsprechen der minimalen bzw. der maximalen OFS.

Bei etwaigen Problemen, wie z. B. dem „Abreißen“ der Luftblase vom Küvettenschlot wurde die Testung abgebrochen und ein neuer Versuch durchgeführt.

3.2.2 PROBENMATERIAL

Das im PBS untersuchte Probenmaterial richtete sich nach den in den Bakterienhemmhofversuchen verwendeten PA-AB-Kombinationen. PA wurde mit je einem AB in verschiedenen Konzentrationen vermischt (s. Tabelle 8). Für alle Messungen am PBS wurde eine PA-Konzentration von 3 mg/ml verwendet. Diese Konzentration stützt sich auf den Erfahrungswert der Arbeitsgruppe unseres Labors und auf technische Limitationen des Geräts. Die PA-Konzentration von 3 mg/ml entstand durch eine Verdünnung von PA 80 mg/ml mittels NaCl 0,9%. Vor Versuchsbeginn wurden die in ein E-Cup pipettierten Probenansätze (PA + AB) bei 37°C 30 Minuten im Schüttelinkubator inkubiert.

Um im Vorfeld die einwandfreie Qualität von PA sicherzustellen wurde mit jedem neuen Versuchsansatz zunächst das im Versuch verwendete PA (3 mg/ml) ohne AB funktional überprüft. Es folgte die Untersuchung der einzelnen PA-AB-Kombinationen. Begonnen wurde mit einer Suspension, die 1% ((w/w); \pm 0,03 mg/ml) AB enthielt, gefolgt von einer PA-AB-Lösung, die 10% ((w/w); \pm 0,3 mg/ml) AB enthielt. Die Prozentangaben der AB-Konzentrationen beziehen sich dabei stets auf die Konzentration von PA 3 mg/ml. In den folgenden Messungen wurden AB-Konzentrationen bis zu 100% ((w/w); \pm 3 mg/ml) eingesetzt.

Da Azithromycin ausschließlich in ETOH gelöst werden soll, waren neben den Versuchen mit Azithromycin zum Ausschluss einer ETOH-bedingten Surfactantinaktivierung auch PBS-Versuche mit ETOH und PA notwendig. Die Menge von ETOH entsprach in diesen Versuchen der ETOH-Menge in den Versuchen mit Azithromycin.

Tabelle 8: Diese Tabelle zeigt verschiedene Antibiotika- bzw. Ethanolkonzentrationen, die zu Poractant alfa 3 mg/ml zugegeben wurden. Mit diesen Kombinationen sollte durch Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer eine mögliche Inaktivierung von Poractant alfa durch verschiedene Konzentrationen getestet werden.

<u>Konzentration</u>	1%	5%	10%	20%	100%
<u>Substanz</u>	(w/w)	(w/w)	(w/w)	(w/w)	(w/w)
<i>Azithromycin</i>	+	+	+	-	-
<i>Ethanol $\hat{=}$ der Menge in den Azithromycin-Versuchen</i>	+	+	+	-	-
<i>Cefotaxim</i>	+	-	+	+	-
<i>Gentamicin</i>	+	-	+	+	+
<i>Moxifloxacin</i>	+	-	+	+	+
<i>Teicoplanin</i>	+	+	+	-	-

3.3 STATISTISCHE ANALYSE

Die Ergebnisse der Bakterienhemmhofversuche sowie der OFS-Messungen am PBS wurden mithilfe der *GraphPad Prism* Software Version 6.07 (s. Tabelle 6) statistisch analysiert. In den Ergebnis-Graphiken (s. Abb. 15 - 45) entspricht jeder Punkt dem Mittelwert aus fünf Versuchswiederholungen unabhängiger Experimente und der Standardabweichung (s. z. B. Abb. 14(A)). Für die statistische Auswertung der Bakterienhemmhofversuche (Hemmhofgrößen in mm² in Abhängigkeit von der AB-Konzentration) wurde für jeden unabhängigen Versuch (n=5) die Fläche unter der Kurve (*engl.: area under the curve*; AUC) berechnet und diese Werte mittels gepaartem t-Test analysiert (s. Abb. 14(B)). Gegenübergestellt wurden bei stets identischem Bakterienstamm und AB zunächst die Versuchsergebnisse mit gleicher Hypophase (100 µl oder 200 µl) jedoch unterschiedlichem AB-Gemisch (AB/PA vs. AB ohne PA). Darauf folgend wurden die Versuche mit identischem AB-Gemisch (AB/PA oder AB ohne PA) aber unterschiedlicher Hypophase, d. h. 100 µl vs. 200 µl mit selbigem Testverfahren untersucht.

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse von (n=5) Versuchen mit und ohne PA bzw. 100 µl und 200 µl mittels zweifaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test miteinander verglichen. So konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Versuchen mit identischen AB-Konzentrationen ermittelt werden (s. Abb. 14(C)).

Des Weiteren wurden die durchschnittlichen Hemmhofgrößen von Versuchen mit einer AB-Konzentration von 1 mg/ml und unterschiedlichen PA-Konzentrationen (72 mg/ml, 10 mg/ml und ohne PA) miteinander verglichen. Die statistische Auswertung hierfür erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test, wobei die Werte der Proben mit 72 mg/ml PA als Kontrollgruppe dienten (s. Abb. 14(D)).

Zuletzt erfolgte ein Vergleich von Versuchsergebnissen mittels gepaartem t-Test, die durch 10 mg/ml und 1 mg/ml AB ohne PA induziert wurden (s. Abb. 14(E)).

Die Daten der *in vitro* OFS-Messungen am PBS wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test statistisch analysiert. Hier dienten die Werte der reinen PA 3 mg/ml-Proben als Kontrolle. Verglichen wurden die minimalen OFS punktuell nach 10,6 s, 60 s sowie 300 s und die maximalen OFS nach 60 s und 300 s Pulsationsdauer.

Als signifikant gilt bei allen statistischen Analysen ein $p < 0,05$ (ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$ - signifikant, **: $p < 0,01$ – hoch signifikant, ***: $p < 0,001$ – höchst signifikant). In den Abbildungen 15 - 39 werden die Ergebnisse der Bakterienhemmhofversuche und die statistischen Resultate graphisch zusammengefasst. Um die in den Abbildungen dargestellten statistischen Resultate zuordnen zu können, werden die statistischen Methoden exemplarisch und detailliert in Abbildung 14 erklärt.

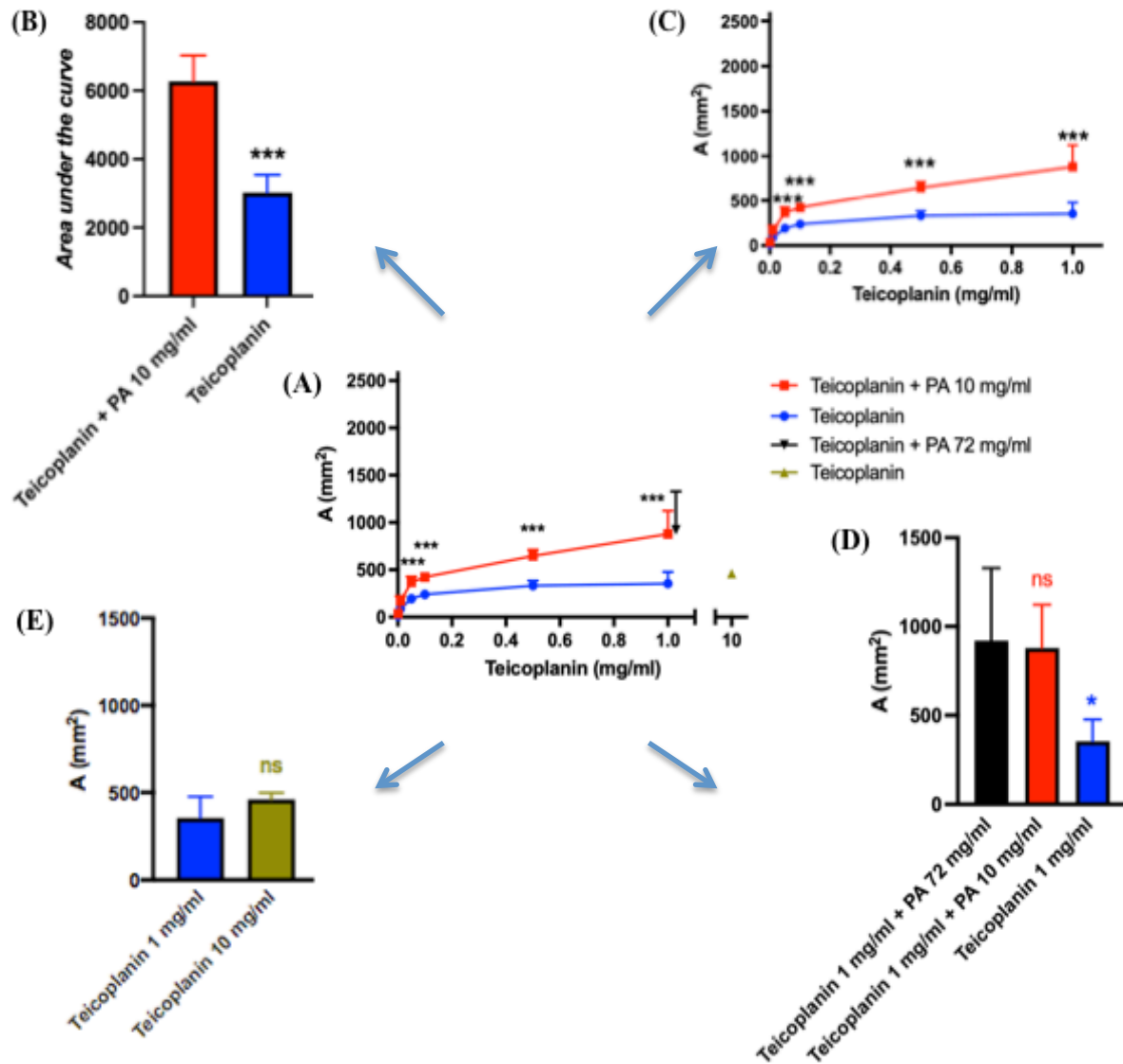


Abbildung 14: In dieser Abbildung sind exemplarisch die verschiedenen statistischen Analysen dargestellt, die im Rahmen der Hemmhofversuche durchgeführt wurden und im Ergebnisteil stets in einem Graphen zusammengefasst sind. (A) zeigt eine graphische Darstellung von Bakterienhemmhof-Versuchsergebnissen, wie sie im Ergebnisteil dargestellt sind. Die hier abgebildeten Daten entstanden durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen mit (A_{rot}) und ohne (A_{blau}) Poractant alfa (PA) auf einem Hypophasenvolumen von 100 μ l, das *high density Gruppe-B-Streptokokken* enthielt. Ein Punkt entspricht jeweils dem Mittelwert aus fünf Versuchswiederholungen ($n=5$) unabhängiger Experimente und der Standardabweichung. $A_{schwarz}$ bzw. $A_{grün}$ entstanden durch erhöhte PA bzw. Antibiotikakonzentrationen. (B) Es wurden die Flächen unter $n=5$ Kurven (engl.: *Area under the curve* = AUC) der Einzelversuche berechnet, die Mittelwerte per Säulendiagramm (mit Standardabweichung) dargestellt und mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert (***: $p < 0,001$). (C) Die Ergebnisse A_{rot} und A_{blau} wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test miteinander verglichen. Hiermit wurden statistisch signifikante Unterschiede bei Versuchen mit identischer Antibiotikakonzentration ermittelt (***: $p < 0,001$). (D) stellt die Ergebnisse von Versuchen mit 1 mg/ml Antibiotikum und unterschiedlichen PA-Konzentrationen und deren statistischen Unterschiede dar. Hier erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Als Kontrollgruppe diente Teicoplanin 1 mg/ml + PA 72 mg/ml (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$). Teilabbildung (E) zeigt Versuchsergebnisse, die durch 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml Antibiotikum ohne PA induziert und mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert wurden (ns: nicht signifikant).

4 ERGEBNISSE

4.1 IN VITRO BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE

Die Resultate der *in vitro* Bakterienhemmhofversuche sind in folgenden Unterpunkten graphisch dargestellt. Ein Kapitelunterpunkt umfasst dabei alle Ergebnisse, die mit einem Bakterienstamm durchgeführt wurden. Zunächst werden Versuche mit identischem Hypophasenvolumen (HV) aber unterschiedlichen AB-Gemischen (AB/PA vs. AB ohne PA) gegenübergestellt. Im Weiteren werden dann Versuche mit unterschiedlichen HV (100 μ l vs. 200 μ l) bei gleichem AB-Gemisch verglichen. Im Rahmen der durchgeführten Bakterienhemmhofversuche ist zu beobachten, dass eine steigende AB-Konzentration zu einer Größenzunahme der Hemmhöfe (mm^2) führt. Ein $p < 0,0001$ in der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigt, dass die AB-Konzentration einen hochsignifikanten Einfluss auf die Größe der Hemmhöfe hat. Die im Rahmen der Azithromycin-Versuche durchgeführten Bakterienhemmhofversuche mit reinem ETOH zeigten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit in keinem Fall eine bakterielle Wachstumshemmung. Somit kann eine Bakterienhemmung allein durch ETOH im Rahmen dieser Versuche ausgeschlossen werden.

4.1.1 ESCHERICHIA COLI

Cefotaxim

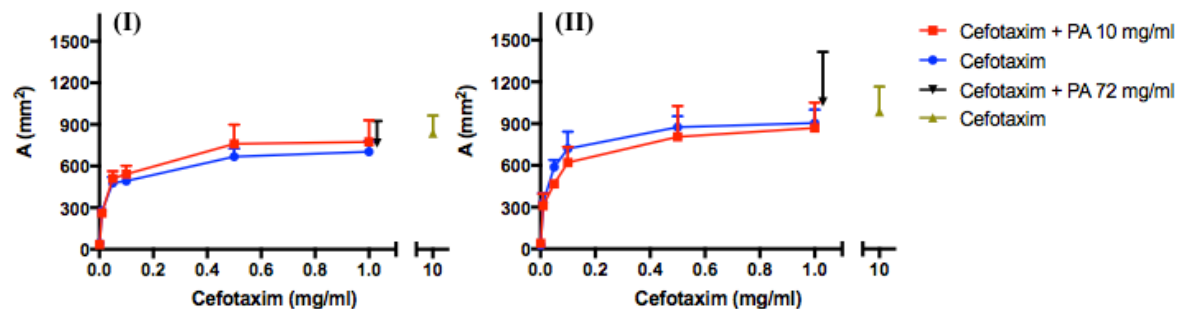


Abbildung 15: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Cefotaxim-Konzentrationen entstandenen Hemmhofflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen. A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alpha (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μ l, AUC_{rot} (6874) vs. AUC_{blau} (6157); $p=0,11$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μ l, AUC_{rot} (7476) vs. AUC_{blau} (8162); $p=0,46$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; AUC=Area under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve).

Bei einer Hypophase von 100 μ l zeigt ein Vergleich der Mittelwerte, dass durch die Zugabe von PA (A_{rot}) die Inhibitionszonen des Bakterienwachstums leicht größer ausfallen als bei Versuchen, die nur mit AB (A_{blau}) durchgeführt wurden (s. Abb. 15 (I)). Im Gegensatz dazu sind die Hemmhöfe nach Verdopplung des HV auf 200 μ l in den Versuchen ohne PA im Mittel größer (s. Abb. 15 (II)). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich weder in (I) noch in (II). Auch die Steigerung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) führt im Vergleich zu Versuchen mit 10 mg/ml oder ohne PA bei identischer AB-Konzentration (1 mg/ml) zu keinen statistisch signifikant größeren Hemmhöfen. Die Erhöhung der Cefotaxim-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) hat im

Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml AB ohne PA ebenso weder bei 100 μ l noch bei 200 μ l Hypophase signifikant größere Inhibitionszonen zur Folge.

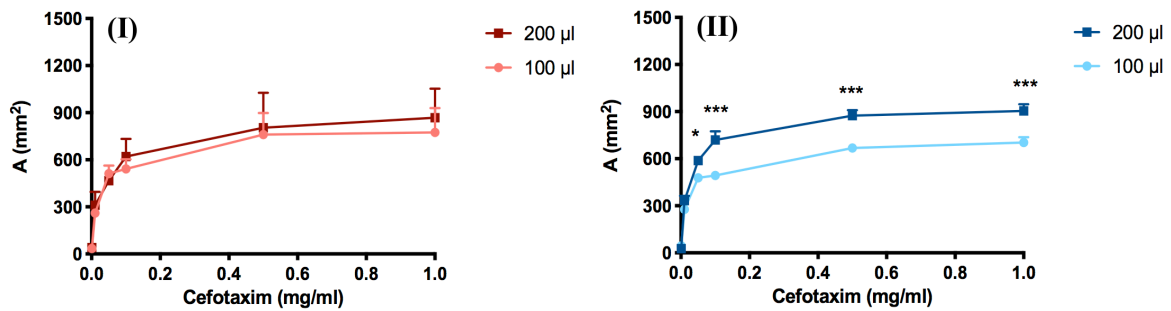


Abbildung 16: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Cefotaxim-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μ l vs. 200 μ l). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Cefotaxim-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6874) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7476); $p=0,50$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6157) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (8162); $p=0,003$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Beim Vergleich der Versuche mit unterschiedlichen HV (100 μ l vs. 200 μ l) finden sich in beiden Fällen (AB/PA und AB ohne PA) größere Hemmhöfe in Versuchen mit 200 μ l Hypophase. Während die Versuche mit PA (s. Abb. 16 (I)) keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen, besteht zwischen den AUC der Versuche ohne PA ein signifikanter Größenunterschied (s. Abb. 16 (II)). Hier zeigt die zweifaktorielle Varianzanalyse im Einzelpunktvergleich bei einer AB-Konzentration von 0,05 mg/ml und allen höheren AB-Konzentrationen signifikante Unterschiede.

Gentamicin

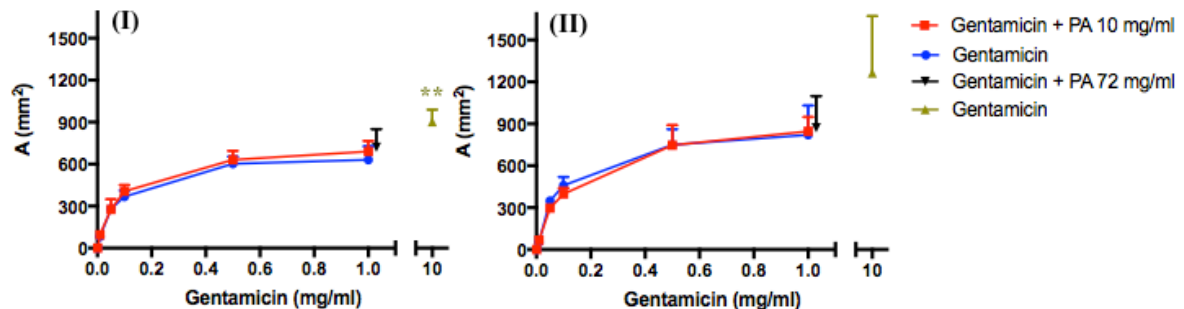


Abbildung 17: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Gentamicin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μ l, AUC_{rot} (5629) vs. AUC_{blau} (5261); $p=0,08$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μ l, AUC_{rot} (6522) vs. AUC_{blau} (6628); $p=0,74$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die grünen Sternchen beschreiben einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. **: $p < 0,01$.

In den Abb. 17 (I) und (II) fällt auf, dass die zu vergleichenden Hemmhofgrößen in beiden Versuchsreihen sehr ähnlich ausfallen. Bei einer Hypophase von 100 μ l sind die Inhibitionszonen größer, wenn PA hinzugegeben wird (A_{rot}). Bei den 200 μ l-Versuchen fallen die Hemmhöfe, die nur durch Gentamicin induziert wurden (A_{blau}) geringfügig größer aus. In der statistischen Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede

ermittelt werden. Wird bei einer AB-Konzentration von 1 mg/ml die PA-Konzentration auf 72 mg/ml erhöht (A_{schwarz}), führt auch dies im Vergleich zu Versuchen mit identischer AB- jedoch niedrigeren PA-Konzentrationen (10 mg/ml bzw. ohne PA) zu keiner signifikanten Vergrößerung der Bakterienhemmhöfe. Durch eine Erhöhung der Gentamicin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) nehmen die Inhibitionszonen im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml Gentamicin ohne PA zu. Bei einer Hypophase von 100 μl ist der Unterschied statistisch signifikant.

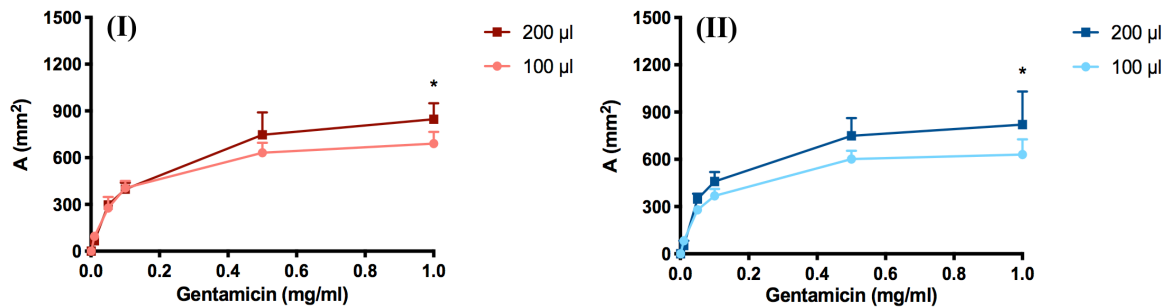


Abbildung 18: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Gentamicin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Gentamicin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5629) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6522): $p=0,17$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5261) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6628): $p=0,05$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. *: $p < 0,05$.

Im Rahmen der Gentamicin-Versuche fallen bei identischem AB-Gemisch die Hemmhöfe bei einer Hypophase von 200 μl größer aus als die bei 100 μl . Bei den Versuchen ohne PA zeigt sich im Vergleich der AUC eine statistisch grenzwertige Signifikanz (s. Abb. 18 (II)). Die AUC-Ergebnisse der Versuche mit PA hingegen sind nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 18 (I)). Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigt in beiden Fällen nur bei einer Gentamicin-Konzentration von 1 mg/ml einen signifikanten Größenunterschied.

Azithromycin

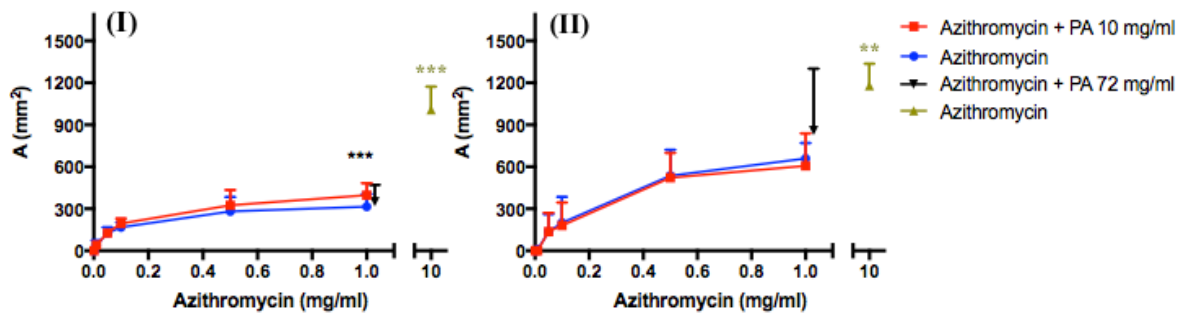


Abbildung 19: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (2965) vs. AUC_{blau} (2497): $p=0,001$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (4330) vs. AUC_{blau} (4578): $p=0,60$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Dieser wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Auch bei diesen *E. coli*-Versuchen fallen die Hemmhöfe, die mit PA entstanden (A_{rot}) bei 100 μl HV größer (s. Abb. 19 (I)) und bei 200 μl HV geringfügig kleiner aus (s. Abb. 19 (II)). Ein signifikanter Unterschied zwischen den AUC besteht nur bei den 100 μl -Versuchen. Der größte Unterschied besteht jeweils bei einer AB-Konzentration von 1 mg/ml, der bei 100 μl statistisch signifikant ist. Auch wenn in den Versuchen mit 200 μl Hypophase die Hemmhöfe mit 72 mg/ml PA (A_{schwarz}) im Durchschnitt etwas größer ausfallen als die mit gleicher AB-Konzentration aber geringeren PA-Konzentrationen (10 mg/ml bzw. kein PA), ist dieser Unterschied nicht signifikant. Eine Erhöhung der Azithromycin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) führt hingegen sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen als in Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin ohne PA.

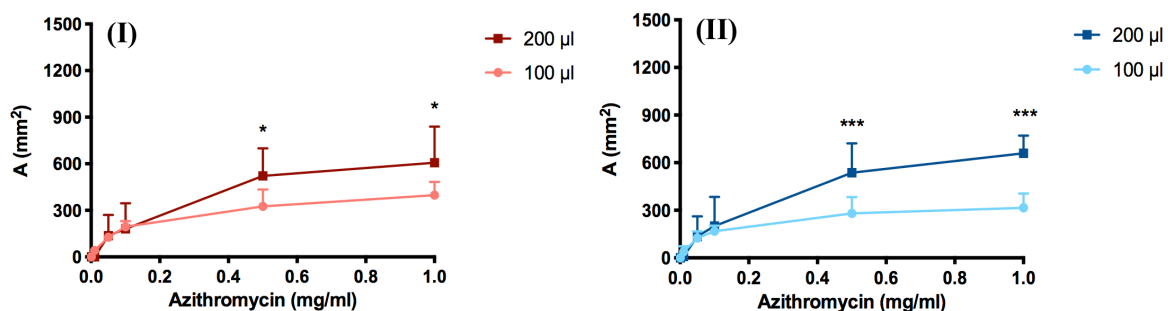


Abbildung 20: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *E. coli*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Azithromycin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (2965) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (4330): $p=0,14$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (2497) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (4578): $p=0,02$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Im Vergleich der 100 μl - und 200 μl -Versuche wird erneut deutlich, dass die Hemmhöfe bei Versuchen mit einem höheren HV größer ausfallen. Während der Unterschied zwischen den AUC bei den Versuchen mit PA nicht signifikant ist (s. Abb. 20 (I)), entstehen bei den Versuchen ohne

PA signifikant größere Hemmhöfe durch 200 μ l (s. Abb. 20 (II)). In den Einzelpunktvergleichen konnten in beiden Versuchsreihen signifikante Größenunterschiede bei 0,5 mg/ml und 1 mg/ml Azithromycin festgestellt werden.

4.1.2 GRUPPE-B-STREPTOKOKKEN (HIGH DENSITY)

Teicoplanin

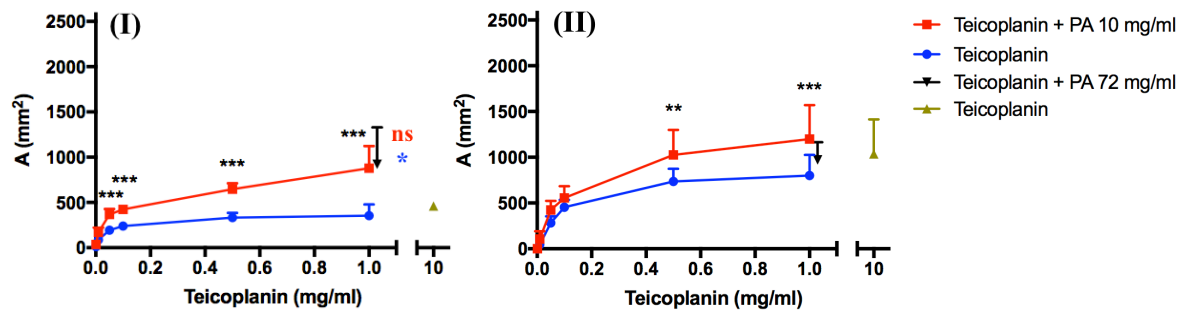


Abbildung 21: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *high density* Gruppe-B-Streptokokken-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μ l, AUC_{rot} (6270) vs. AUC_{blau} (3025): $p < 0,001$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μ l, AUC_{rot} (9079) vs. AUC_{blau} (6473): $p=0,02$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Das blaue Sternchen in (I) markiert den signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} mit 1 mg/ml AB besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. ns: nicht signifikant *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Ergebnisse der *GBS-HD*-Bakterienhemmhofversuche mit Teicoplanin zeigen, dass durch die Zugabe von PA (A_{rot}) sowohl bei 100 μ l (s. Abb. 21 (I)) als auch bei 200 μ l (s. Abb. 21 (II)) signifikant größere Hemmhöfe entstehen. Die Abb. 22 zeigt zwei Versuchsergebnisse, die im Rahmen der Versuchsauswertungen mithilfe des Koloniezählgeräts *schuett colonyQuant* entstanden. Die entsprechende graphische Darstellung ist in Abb. 21 (I) zu sehen.

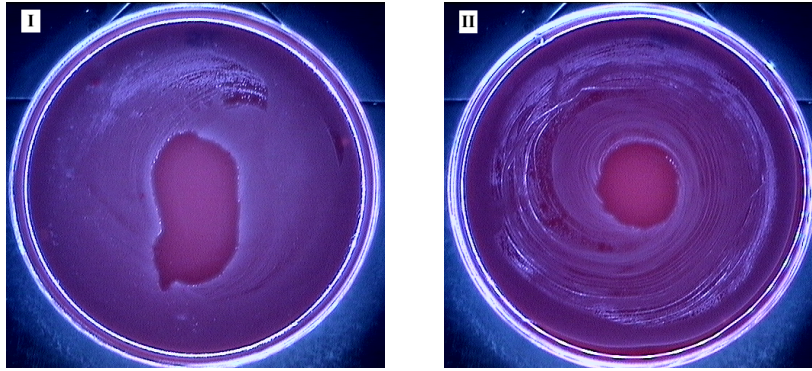


Abbildung 22: Zwei Bilder, die im Rahmen der Versuchsauswertungen der Bakterienhemmhofversuche mithilfe des Koloniezählgeräts *schuett colonyQuant* entstanden. Zu sehen ist jeweils ein Bakterienhemmhof (zentrale rote Fläche) in einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen (violett-weiß) auf Schafblutagar, der innerhalb einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37°C durch Teicoplanin entstand. Das Volumen der Hypophase betrug in beiden Versuchen 100 µl. Die deutlichen Farbunterschiede ermöglichen eine Differenzierung zwischen Bakterienwachstum und der zentraler Hemmhöfchenfläche. Die größere, etwas unförmige Hemmhöfchenfläche in Abbildung 22 (I) entstand durch eine zentrale Applikation von 10 µl Teicoplanin 0,5 mg/ml + Poractant alfa 10 mg/ml. Der runde Hemmhof in Abbildung 22 (II) entstand hingegen durch Teicoplanin 0,5 mg/ml ohne den Zusatz von Poractant alfa.

In der Einzelpunktanalyse wird ersichtlich, dass in beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede bei AB-Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml bestehen. Bei 100 µl-Versuchen sind zudem die Ergebnisse bei 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml signifikant unterschiedlich. Wird die PA-Konzentration bei einem HV von 100 µl und 1 mg/ml Teicoplanin auf 72 mg/ml erhöht (A_{schwarz}), führt dies im Vergleich zu Versuchen mit identischer AB-Konzentration aber ohne PA zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen. Zu Versuchen mit 1 mg/ml AB und 10 mg/ml PA besteht kaum ein Unterschied. Bei 200 µl und 1 mg/ml Teicoplanin werden die Hemmhöfe mit 72 mg/ml etwas kleiner als mit 10 mg/ml PA und nicht signifikant größer als die Hemmhöfe ohne PA. Durch die Erhöhung der Teicoplanin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) entstehen sowohl bei 100 µl als auch bei 200 µl nur unbedeutend größere Hemmhöfe als bei Versuchen mit 1 mg/ml AB ohne PA. Die Hemmhöfe mit 10 mg/ml PA sind trotz niedrigerer AB-Konzentrationen teils größer.

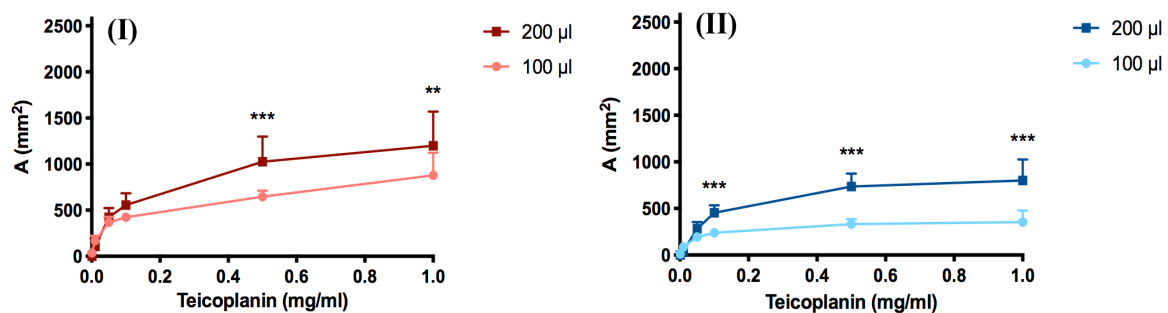


Abbildung 23: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen induzierten Hemmhöfchenflächen (A (mm^2)) auf einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 µl vs. 200 µl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Teicoplanin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6270) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (9079): $p=0,02$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (3025) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6473): $p < 0,001$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Beim Vergleich 100 µl vs. 200 µl wird ersichtlich, dass sowohl bei AB/PA- (s. Abb. 23 (I)) als auch bei reinen AB-Versuchen (s. Abb. 23 (II)) ein erhöhtes HV (200 µl) zu größeren Hemmhöfen führt. Die Unterschiede sind jeweils statistisch signifikant. In beiden Vergleichsreihen zeigen sich

signifikante Unterschiede in den Einzelpunktvergleichen bei 0,5 mg/ml und 1 mg/ml, bei Versuchen ohne PA zusätzlich bei 0,1 mg/ml Teicoplanin.

Moxifloxacin

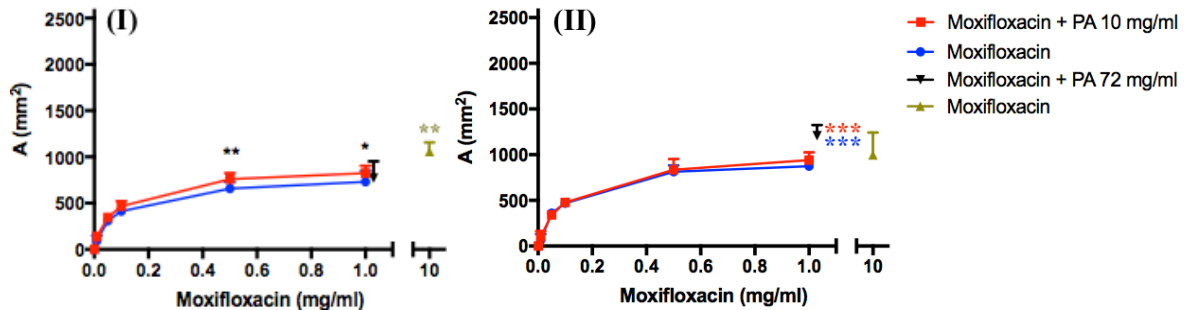


Abbildung 24: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (6720) vs. AUC_{blau} (5876): $p=0,01$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (7365) vs. AUC_{blau} (7081): $p=0,42$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die roten bzw. blauen Sternchen markieren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} bzw. A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Die grünen Sternchen beschreiben einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Auch *GBS-HD*-Versuche mit Moxifloxacin zeigen, dass die Zugabe von PA (A_{rot}) im Durchschnitt zu einer Größenzunahme der Hemmhöfe führt. Statistisch signifikant sind die Unterschiede zwischen den AUC aber nur bei Versuchen mit 100 μl HV (s. Abb. 24 (I)). Hier ergeben zudem die Einzelpunktvergleiche statistisch signifikante Unterschiede bei 0,5 mg/ml und 1 mg/ml AB. Die Hemmhofgrößen in den 200 μl -Versuchen fallen sehr ähnlich aus (s. Abb. 24 (II)) ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zu zeigen. Hier führt die Steigerung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) bei 1 mg/ml Moxifloxacin zu signifikant größeren Hemmhöfen, sowohl im Vergleich zu Versuchen ohne PA als auch mit 10 mg/ml PA (bei identischer AB-Konzentration). Dies ist bei Versuchen mit 100 μl Hypophase nicht zu beobachten. Hier hat hingegen die Steigerung der Moxifloxacin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml ohne PA eine signifikante Größenzunahme der Inhibitionszonen zur Folge. So jedoch nicht bei Versuchen mit 200 μl Hypophase.

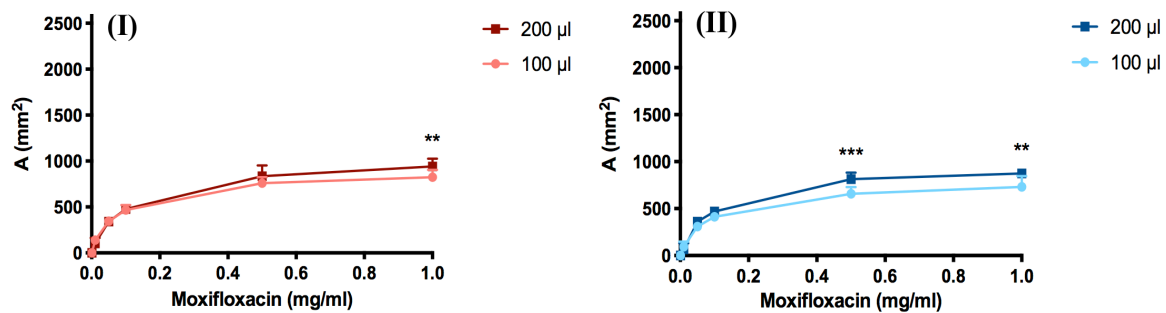


Abbildung 25: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Moxifloxacin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6720) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7365): $p=0,07$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5876) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7081): $p=0,02$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Dieser Vergleich der Versuche macht deutlich, dass die Hemmhöfe unabhängig vom AB-Gemisch in Versuchen mit 200 μl Hypophase durchschnittlich größer sind als in Versuchen mit 100 μl (s. Abb. 25 (I) und (II)). Im Gegensatz zu den Versuchen mit PA ist bei den Versuchen ohne PA der Unterschied zwischen den AUC statistisch signifikant. Es konnten jeweils signifikante Unterschiede in Einzelpunktvergleichen ermittelt werden (bei 1 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml AB).

Azithromycin

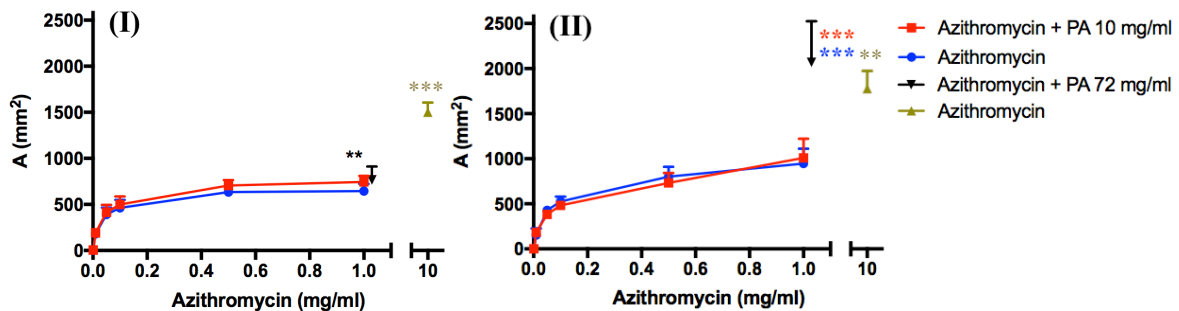


Abbildung 26: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (6396) vs. AUC_{blau} (5734): $p=0,07$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (7116) vs. AUC_{blau} (7383): $p=0,73$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Dieser wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die roten bzw. blauen Sternchen markieren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} bzw. A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

In dieser Versuchsreihe entstehen bei Versuchen mit (A_{rot}) und ohne PA (A_{blau}) ähnlich große Hemmhöfe (s. Abb. 26 (I) und (II)). Die Unterschiede der AUC sind weder bei 100 μl noch bei 200 μl HV signifikant. Bei einer Hypophase von 100 μl zeigen die Mittelwerte im Punkt-zu-Punkt-Vergleich bei 1 mg/ml AB einen signifikanten Unterschied. Bei Versuchen mit 200 μl und 1 mg/ml AB führt die Erhöhung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) zu deutlich größeren Hemmflächen. Die Unterschiede sind verglichen zu den anderen Versuchen mit 1 mg/ml

Azithromycin statistisch signifikant. Auch die Erhöhung der Azithromycin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) führt sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin ohne PA. Bei einem HV von 200 μl entstehen durch 72 mg/ml PA trotz der weitaus niedrigeren AB-Konzentration (1 mg/ml) größere Bakterienhemmhöfe als in den Versuchen mit 10 mg/ml Azithromycin (ohne PA). Bei Versuchen mit 100 μl HV kann dies nicht beobachtet werden.

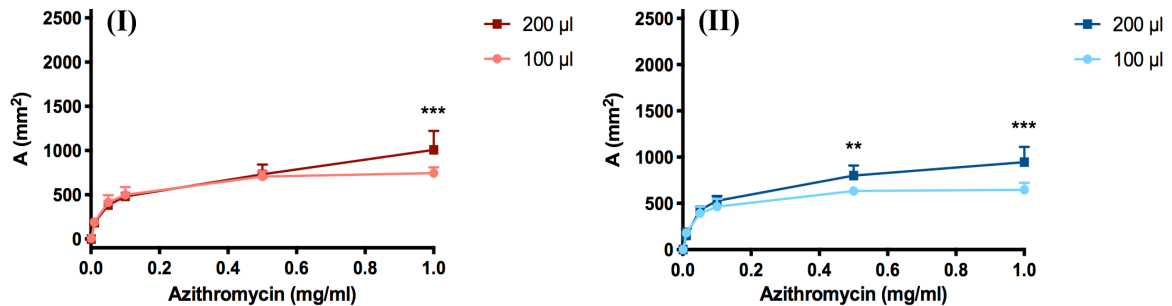


Abbildung 27: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen induzierten Hemmhöhen (A (mm^2)) auf einem *high density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Azithromycin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6396) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7116): $p=0,15$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5734) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7383): $p=0,02$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Auch in dieser Versuchsreihe werden die Hemmhöfe sowohl bei den Versuchen mit PA (s. Abb. 27 (I)) als auch bei den Versuchen ohne PA (s. Abb. 27 (II)) durch ein Volumen von 200 μl durchschnittlich größer. Es besteht jedoch lediglich bei Versuchen ohne PA ein signifikanter Unterschied zwischen den AUC. In beiden Versuchsreihen zeigen sich in den Einzelpunktvergleichen signifikante Unterschiede bei einer AB-Konzentration von 1 mg/ml. Bei Versuchen mit purem AB besteht zudem noch ein signifikanter Unterschied bei 0,5 mg/ml.

4.1.3 GRUPPE-B-STREPTOKOKKEN (LOW DENSITY)

Teicoplanin

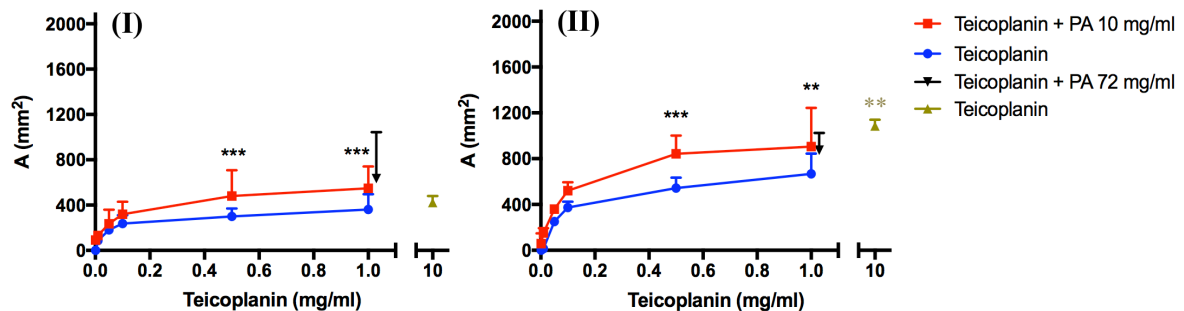


Abbildung 28: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *low density* Gruppe-B-Streptokokken-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (4395) vs. AUC_{blau} (2884): $p=0,03$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (7430) vs. AUC_{blau} (5069): $p=0,008$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die grünen Sternchen beschreiben einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Auf *GBS-LD*-Bakterienrasen entstehen durch Teicoplanin in Kombination mit PA (A_{rot}) sowohl bei 100 μl (s. Abb. 28 (I)) als auch bei 200 μl Hypophase (s. Abb. 28 (II)) durchschnittlich größere Hemmhöfe als durch Teicoplanin alleine (A_{blau}). Die Größenunterschiede der AUC werden jeweils als signifikant gewertet. Auch die Einzelpunktvergleiche ergeben in beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede bei 0,5 mg/ml und 1 mg/ml AB. Die Erhöhung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) führt bei 1 mg/ml Teicoplanin im Vergleich zu Versuchen mit gleicher AB-Konzentration aber nur 10 mg/ml PA bzw. ohne PA zu keiner signifikanten Vergrößerung der Bakterienhemmflächen. Die Steigerung der AB-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) hat bei 200 μl im Vergleich zu den Versuchen mit 1 mg/ml Teicoplanin eine signifikante Vergrößerung der Hemmhöfe zur Folge. Bei 100 μl besteht zwischen Versuchen mit 10 mg/ml und 1 mg/ml Teicoplanin (jeweils ohne PA) kaum ein Unterschied, wohingegen bei den Versuchen mit PA trotz niedrigerer AB-Konzentrationen teils größere Bakterienhemmhöfe als mit 10 mg/ml AB entstehen.

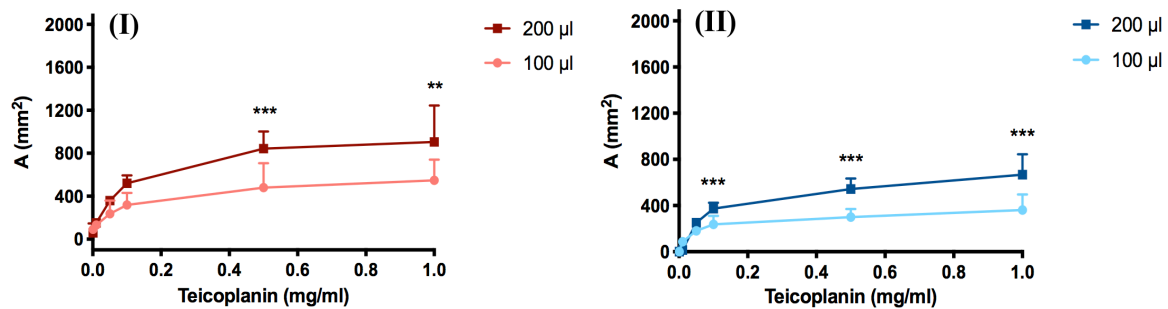


Abbildung 29: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *low density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Teicoplanin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (4395) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7430): $p=0,02$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (2884) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (5069): $p=0,001$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Auch hier wird deutlich, dass bei einer Hypophase von 200 μl größere Inhibitionszonen entstehen als bei 100 μl (s. Abb. 29 (I) und (II)). Sowohl bei Versuchen mit als auch ohne PA bestehen signifikante Unterschiede zwischen den AUC. In beiden Versuchsreihen sind die Hemmhöfe der 200 μl -Versuche bei AB-Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml signifikant größer. Bei Versuchen ohne PA besteht zudem eine Signifikanz bei 0,1 mg/ml AB.

Moxifloxacin

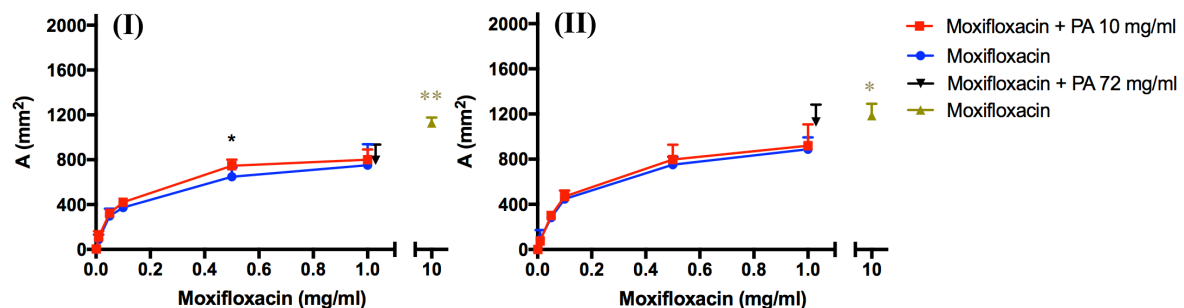


Abbildung 30: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *low density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (6481) vs. AUC_{blau} (5794): $p=0,12$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (7097) vs. AUC_{blau} (6761): $p=0,57$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Das schwarze Sternchen markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Dieser wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die kombinierte Applikation von Moxifloxacin und PA (A_{rot}) sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV eine leichte Zunahme der durchschnittlichen Hemmhofgrößen zur Folge hat (s. Abb. 30 (I) und (II)). Dieser Effekt ist jedoch insbesondere bei 200 μl sehr gering und zeigt keine statistischen Signifikanzen. Die Einzelpunktvergleiche ergeben lediglich bei 100 μl und einer AB-Konzentration von 0,5 mg/ml einen signifikanten Unterschied. Bei 1 mg/ml Moxifloxacin führt die Steigerung von PA auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) nur bei den 200 μl -Versuchen zu einer dezenten Vergrößerung der Inhibitionszonen im Vergleich zu Versuchen mit

niedrigeren PA-Konzentrationen (10 mg/ml oder kein PA). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Die Steigerung von Moxifloxacin auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) hingegen hat sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV durchschnittlich signifikant größere Bakterienhemmhöfe zur Folge als mit einer AB-Konzentration von 1 mg/ml ohne PA. Bei 200 μl HV entstehen in Versuchen mit 10 mg/ml Moxifloxacin ohne PA und in Versuchen mit 1 mg/ml Moxifloxacin plus 72 mg/ml PA ungefähr gleich große Bakterienhemmhöfe.

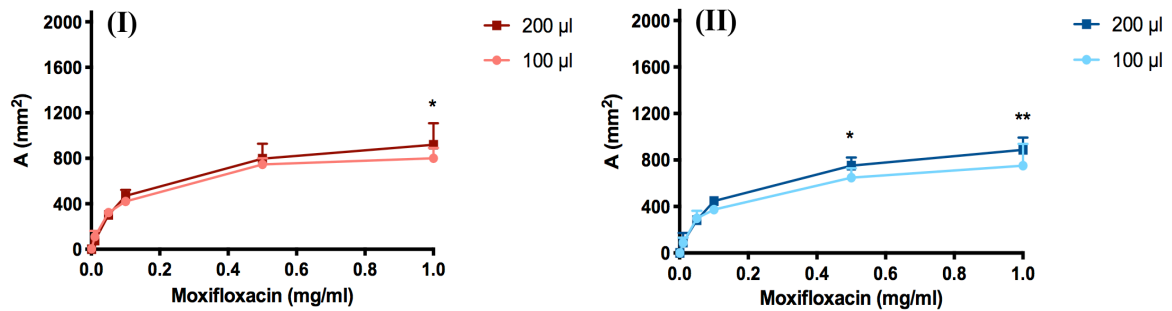


Abbildung 31: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen induzierten Hemmhöhen (A (mm^2)) auf einem *low density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Moxifloxacin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6481) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7097): $p=0,21$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5794) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6761): $p=0,007$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Im Vergleich von Versuchen mit unterschiedlichen HV werden die Hemmhöfe im Rahmen der 200 μl -Versuche durchschnittlich größer (s. Abb. 31 (I) und (II)). Allerdings zeigen nur Versuche ohne PA im statistischen Vergleich einen signifikanten Unterschied zwischen den AUC. Im Einzelpunktvergleich zeigen diese Ergebnisse bei einer Moxifloxacin-Konzentration von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml eine statistische Signifikanz. Mit PA besteht bei 1 mg/ml AB ein signifikanter Unterschied.

Azithromycin

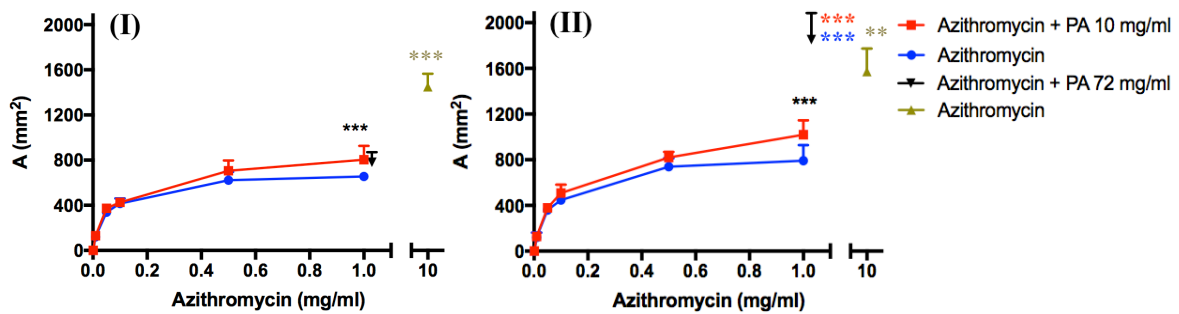


Abbildung 32: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *low density* Gruppe-B-Streptokokken-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (6342) vs. AUC_{blau} (5557): $p=0,006$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (7580) vs. AUC_{blau} (6500): $p=0,02$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=$ Area under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die roten bzw. blauen Sternchen markieren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} bzw. A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Ergebnisse der *GBS-LD*-Versuche mit Azithromycin zeigen, dass das Bakterienwachstum durch die Zugabe von PA (A_{rot}) vermehrt gehemmt wird (s. Abb. 32 (I) und (II)). Die Unterschiede der AUC sind sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV statistisch signifikant. Im Punkt-zu-Punkt-Vergleich bei identischer AB-Konzentration wird deutlich, dass bei einer Konzentration von 1 mg/ml in beiden Versuchsreihen ein signifikanter Unterschied in den durchschnittlichen Hemmhofgrößen besteht. Der Unterschied zwischen den Hemmhöfen mit und ohne PA ist bei dieser Konzentration am größten. In Versuchen mit 200 μl Hypophase führt bei 1 mg/ml Azithromycin die Erhöhung von PA auf 72 mg/ml zu einer deutlichen Größenzunahme der Bakterienhemmhöfe (A_{schwarz}). In der statistischen Auswertung zeigen sich bei 1 mg/ml Azithromycin signifikante Unterschiede zwischen den Versuchen mit 72 mg/ml PA und 10 mg/ml bzw. ohne PA. Bei Versuchen mit 100 μl HV kann dies nicht beobachtet werden. Die Steigerung der AB-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) hat in beiden Versuchsreihen eine statistisch signifikante Größenzunahme der Hemmhöfe im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin (ohne PA) zur Folge. Wie in den *GBS-HD*-Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin fällt auf, dass bei Versuchen mit 200 μl Hypophase die Steigerung von PA auf 72 mg/ml trotz der geringeren AB-Konzentration zu größeren Bakterienhemmhöfen führt als eine Azithromycin-Konzentration von 10 mg/ml ohne PA. Erneut kann dies bei Versuchen mit 100 μl HV nicht beobachtet werden.

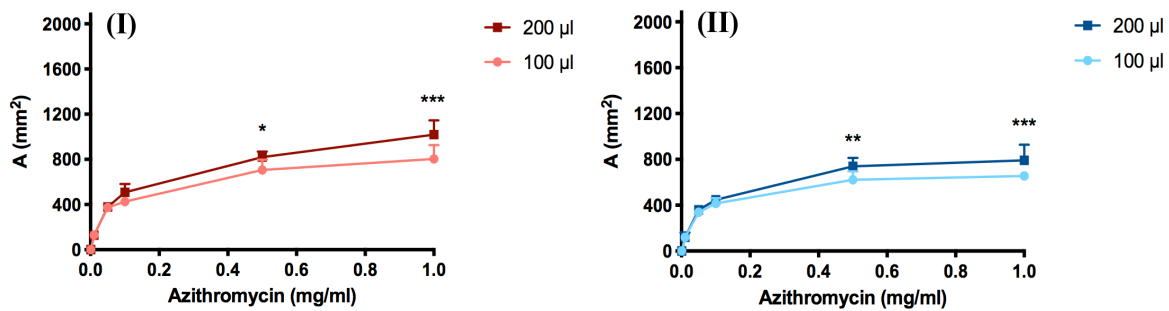


Abbildung 33: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *low density Gruppe-B-Streptokokken*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Azithromycin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (6342) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (7580): $p=0,003$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5557) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6500): $p=0,05$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

In diesem Vergleich (100 μl vs. 200 μl) zeigen die Versuchsergebnisse wieder größere Hemmhöfe bei Versuchen mit einem erhöhten HV. Während bei Versuchen mit PA ein signifikanter Unterschied zwischen den AUC besteht (s. Abb. 33 (I)), ist die statistische Signifikanz bei Versuchen ohne PA grenzwertig (s. Abb. 33 (II)). Die Einzelpunktvergleiche ergeben in beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede in ihren Ergebnissen bei einer AB-Konzentration von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml.

4.1.4 STAPHYLOKOKKUS AUREUS

Teicoplanin

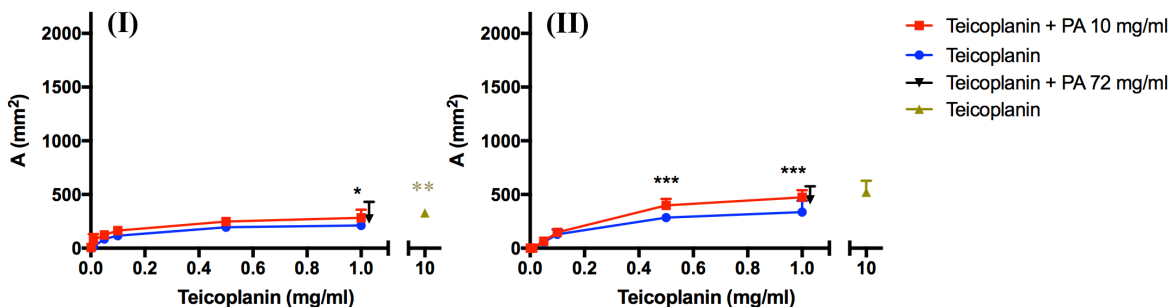


Abbildung 34: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (2275) vs. AUC_{blau} (1707): $p=0,03$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (3340) vs. AUC_{blau} (2443): $p=0,008$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Die grünen Sternchen beschreiben einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Versuche mit *S. aureus* zeigen, dass durch den Einsatz von Teicoplanin die durchschnittlichen Hemmhofgrößen in den Versuchen mit PA (A_{rot}) größer ausfallen als die der Kontrollgruppe ohne PA (A_{blau}). Durch die statistische Auswertung wird deutlich, dass sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV signifikant größere Hemmflächen durch PA entstehen (s. Abb. 34 (I) und (II)). Die

Punkt-zu-Punkt-Vergleiche ergeben in beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede bei 1 mg/ml AB. Bei den 200 µl-Versuchen unterscheiden sich zusätzlich die Ergebnisse bei 0,5 mg/ml Teicoplanin signifikant. Die Erhöhung der AB-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) führt im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml AB ohne PA lediglich in den Versuchen mit einer Hypophase von 100 µl zu signifikant größeren Inhibitionszonen. Die Erhöhung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) hat im Vergleich zu den anderen Versuchen mit 1 mg/ml Teicoplanin in keiner Versuchsreihe signifikant größere Bakterienhemmhöfe zur Folge.

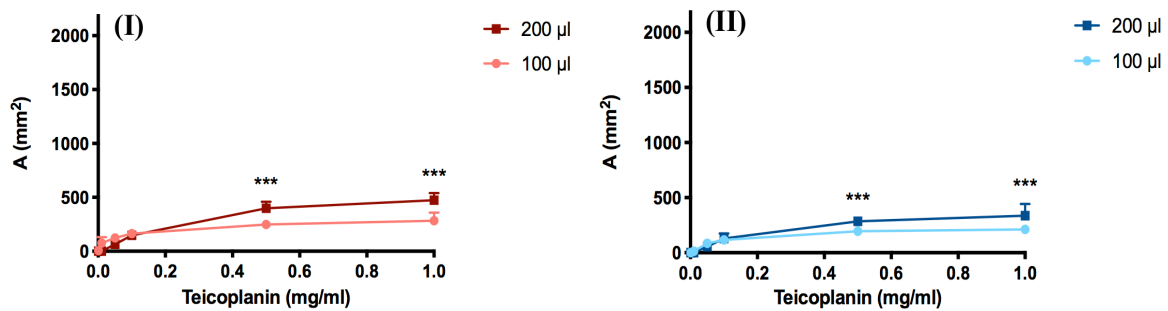


Abbildung 35: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Teicoplanin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 µl vs. 200 µl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Teicoplanin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (2275) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (3340); $p=0,02$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (1707) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (2443); $p=0,004$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. ***: $p < 0,001$.

Auch hier führt die Verdopplung des HV auf 200 µl sowohl bei Versuchen mit als auch bei Versuchen ohne PA zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen (s. Abb. 35 (I) und (II)). Durch die Einzelpunktvergleiche können jeweils bei AB-Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml signifikante Größenunterschiede erfasst werden.

Moxifloxacin

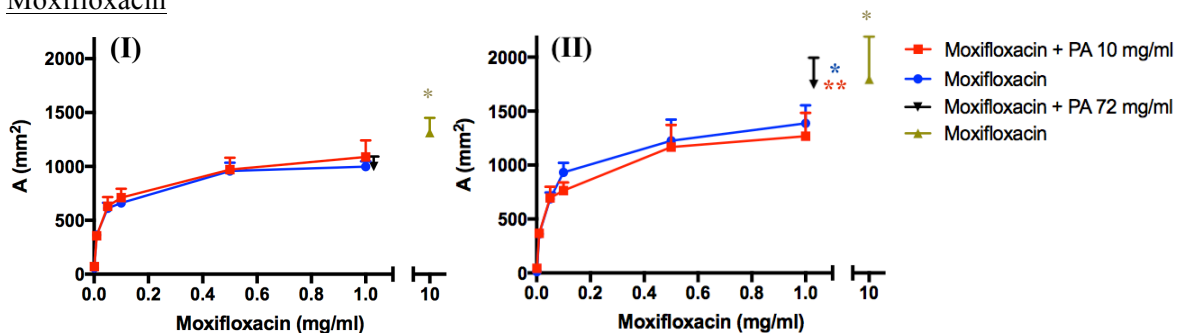


Abbildung 36: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 µl, AUC_{rot} (9066) vs. AUC_{blau} (8664); $p=0,23$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 µl, AUC_{rot} (10542) vs. AUC_{blau} (11477); $p=0,12$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die roten bzw. das blaue Sternchen markieren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} bzw. A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierter Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Bei der Verwendung von *S. aureus* und Moxifloxacin fällt auf, dass bei einer Hypophase von 200 μl die Hemmhöfe ohne PA (A_{blau}) größer ausfallen als die der Versuche mit PA (A_{rot} ; s. Abb. 36 (II)). Bei 100 μl HV entstehen sehr ähnliche Hemmhofgrößen, wobei die mit PA im Durchschnitt unwesentlich größer sind (s. Abb. 36 (I)). Zwischen den AUC bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Werden im Rahmen der 200 μl -Versuche alle Versuchsergebnisse mit 1 mg/ml AB verglichen, zeigt sich, dass durch die Erhöhung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) im Vergleich zu Versuchen mit nur 10 mg/ml bzw. ohne PA signifikant größere Bakterienhemmhöfe entstehen (s. Abb. 36 (II)). Bei 100 μl HV kann dies nicht beobachtet werden. Hingegen führt die Steigerung der Moxifloxacin-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) sowohl bei 100 μl als auch bei 200 μl HV durchschnittlich zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen als in Versuchen mit 1 mg/ml Moxifloxacin ohne PA.

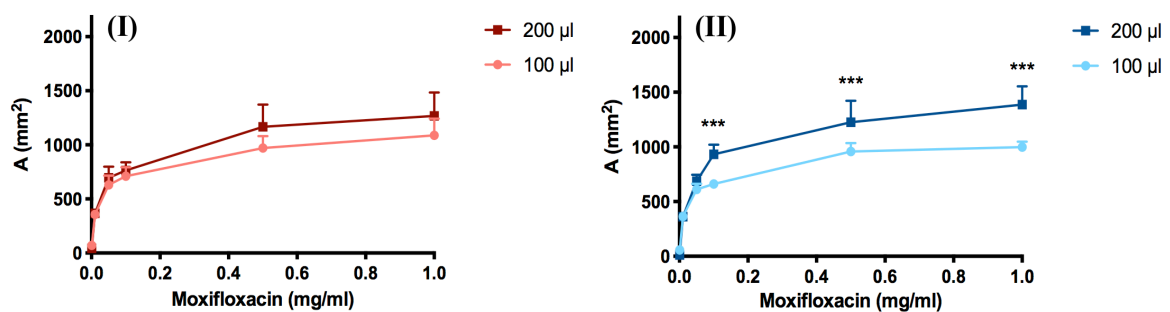


Abbildung 37: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Moxifloxacin-Konzentrationen induzierten Hemmhöfen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Moxifloxacin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (9066) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (10542); $p=0,15$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (8664) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (11477); $p=0,008$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area\ under\ the\ curve$ (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede bei identischer AB-Konzentration. Sie wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. ***: $p < 0,001$.

Obwohl die Bakterieninhibitionszonen durch ein erhöhtes HV (200 μl) sowohl bei Versuchen mit als auch bei Versuchen ohne PA zunehmen (s. Abb. 37 (I) und (II)), sind die Unterschiede der AUC nur bei Versuchen ohne PA signifikant. Auch die Einzelpunktvergleiche zeigen lediglich bei der Verwendung von purem Moxifloxacin signifikante Unterschiede. Dies konnte bei AB-Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml beobachtet werden.

Azithromycin

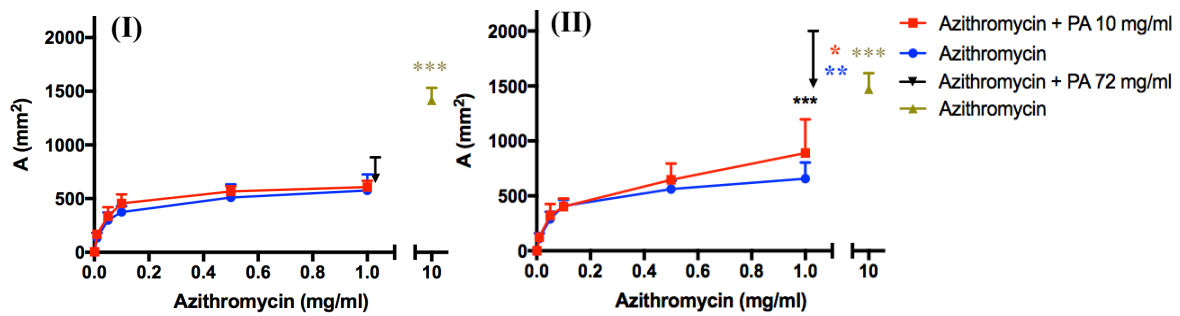


Abbildung 38: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen entstandenen Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; A_{rot} wurde induziert durch Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) 10 mg/ml, A_{blau} durch AB ohne PA. $A_{\text{grün}}$ (10 mg/ml AB) und A_{schwarz} (72 mg/ml PA + 1 mg/ml AB) spiegeln Kontrollversuche wider, die durch deutlich erhöhte AB- bzw. maximal mögliche PA-Konzentrationen entstanden. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) das Hypophasenvolumen (HV) beträgt in allen Versuchen 100 μl , AUC_{rot} (5286) vs. AUC_{blau} (4756); $p=0,25$; (II) das HV beträgt in allen Versuchen 200 μl , AUC_{rot} (6211) vs. AUC_{blau} (5252); $p=0,12$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die schwarzen Sternchen markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen A_{rot} und A_{blau} bei identischer AB-Konzentration. Dieser wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. Das rote bzw. die blauen Sternchen markieren die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen A_{schwarz} und A_{rot} bzw. A_{blau} mit je 1 mg/ml AB. Diese statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test. Die grünen Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen $A_{\text{grün}}$ und A_{blau} mit 1 mg/ml AB. Sie wurden mittels gepaartem t-Test statistisch analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

In den *S. aureus*-Versuchen mit Azithromycin entstehen bei gleicher Hypophase durch die Zugabe von PA größere Bakterienhemmhöfe (A_{rot}). Es ergeben sich diesbezüglich jedoch weder in den Versuchen mit 100 μl (s. Abb. 38 (I)) noch mit 200 μl HV (s. Abb. 38 (II)) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den AUC. Wie in den Azithromycin-Versuchen mit *GBS-HD* und *GBS-LD* führt die Zugabe von PA bei einem Volumen von 200 μl insbesondere bei 1 mg/ml AB zu größeren Hemmhöfen. Dieser Größenunterschied ist bei geringeren AB-Konzentrationen bzw. einer niedrigeren Hypophase nicht zu erkennen. Das spiegelt sich auch in den Einzelpunktvergleichen wider. So ist der Unterschied der Hemmhofgrößen nur bei einer AB-Konzentration von 1 mg/ml bei Versuchen mit 200 μl HV signifikant. Bei Versuchen mit 100 μl hingegen sind die Durchschnittswerte bei 1 mg/ml AB fast gleich groß. Des Weiteren ist zu beobachten, dass bei einem HV von 200 μl und einer AB-Konzentration von 1 mg/ml auch in diesem Fall die Erhöhung von PA auf 72 mg/ml (A_{schwarz}) zu deutlich größeren Bakterienhemmhöfen führt. Die statistische Auswertung zeigt signifikant kleinere Hemmhöfe, wenn bei gleicher Azithromycin-Konzentration nur 10 mg/ml bzw. kein PA zum Einsatz kam. In beiden Versuchsreihen hat die Steigerung der AB-Konzentration auf 10 mg/ml ($A_{\text{grün}}$) im Vergleich zu einer AB-Konzentration von 1 mg/ml ohne PA eine signifikante Größenzunahme der Hemmhöfe zur Folge. Bei einem HV von 200 μl entstehen wie bei den Azithromycin-Versuchen mit *GBS* größere Hemmhöfe in Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin und 72 mg/ml PA als in Versuchen mit 10 mg/ml AB ohne PA. Dies kann bei einem HV von 100 μl erneut nicht beobachtet werden.

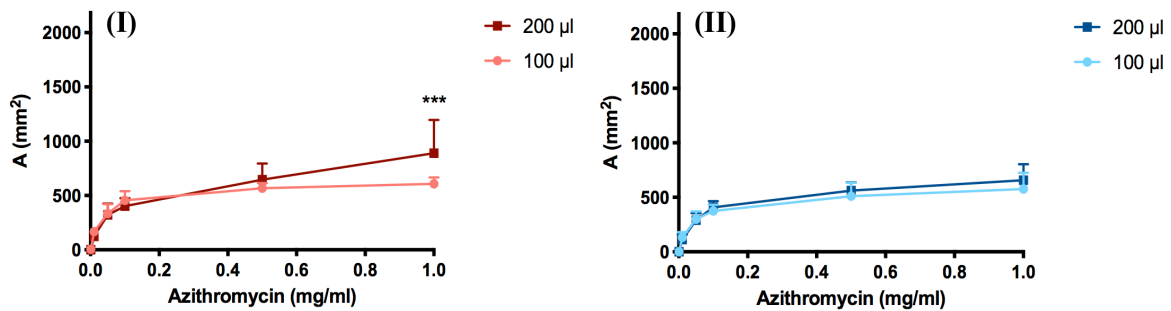


Abbildung 39: Graphisch dargestellt sind die durch unterschiedliche Azithromycin-Konzentrationen induzierten Hemmflächen (A (mm^2)) auf einem *S. aureus*-Bakterienrasen; im Vergleich stehen Versuche mit identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) bzw. AB ohne PA) jedoch unterschiedlichen Hypophasenvolumina (100 μl vs. 200 μl). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. (I) alle Azithromycin-Proben enthalten PA 10 mg/ml, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (5286) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (6211): $p=0,16$; (II) keine der AB-Proben enthält PA, $AUC_{100 \mu\text{l}}$ (4756) vs. $AUC_{200 \mu\text{l}}$ (5252): $p=0,28$; der statistische Vergleich der AUCs (aus $n=5$ Einzelversuchen) erfolgte mittels gepaartem t-Test; $AUC=Area$ under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve). Die Sternchen markieren einen statistisch signifikanten Unterschied bei identischer AB-Konzentration. Er wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test ermittelt. ***: $p < 0,001$.

Auch in diesem Fall zeigt ein Vergleich der Versuchsergebnisse (100 μl vs. 200 μl) im Mittel größere Hemmhöfe bei Versuchen mit 200 μl HV. Weder die Versuche mit (s. Abb. 39 (I)) noch die Versuche ohne PA (s. Abb. 39 (II)) zeigen aber statistisch signifikante Unterschiede zwischen den AUC. Im Rahmen der Einzelpunktvergleiche werden lediglich die Hemmhofgrößen bei den PA-Versuchen mit einer AB-Konzentration von 1 mg/ml als signifikant unterschiedlich gewertet.

4.2 IN VITRO OBERFLÄCHENSPIGELMESSUNGEN AM PBS

Um den Einfluss der AB auf die Oberflächenaktivität von PA zu untersuchen, wurden die minimale (y_{\min} ; kleiner Blasenradius) und maximale (y_{\max} ; um 50% expandierte Blasenoberfläche) OFS über eine fünfminütige Pulsationsdauer am PBS bestimmt. Da die OFS-reduzierende Funktion von PA insbesondere während der Expiration (*in vitro* bei kleinem Blasen volumen) von großer Bedeutung ist und sich seine Wirkung erst in den Sekunden bis Minuten nach seiner Applikation voll entfaltet, wird insbesondere auf die minimale OFS nach einer gewissen Pulsationsdauer eingegangen. Die Daten von y_{\min} und y_{\max} werden über eine fünfminütige Pulsationsdauer zunächst graphisch dargestellt, gefolgt von einer tabellarischen Zusammenfassung der Mittelwerte aus den fünf Messwiederholungen unabhängiger Experimente, deren Standardabweichungen und der statistischen Auswertung. Hervorgehoben werden dabei jeweils die gemessenen y_{\min} -Werte nach 10,6 s, 60 s und 300 s sowie die y_{\max} -Werte nach 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase (s. Punkt 3.2.1) und beschreiben die OFS einer zu diesem Zeitpunkt noch statischen Blase (y_{stat}). Dies waren die ersten Messwerte, die vom PBS aufgezeichnet wurden. Den Messungen der PA/AB-Proben ging als Kontrolle zunächst die Messung von reinem PA 3 mg/ml voraus ($n=5$; s. Abb. 40-45). Sie zeigen während der dynamischen Untersuchung bei einer Kompression der Blase um 50% stets einen steilen Abfall der minimalen OFS (y_{\min}) innerhalb der ersten 30 Sekunden. Nach rascher Abflachung der Kurve erreicht y_{\min} in allen Kontrollversuchen nach ca. einer Minute einen konstanten Wert unter 3 mN/m. Dies spricht für eine gute Funktion des verwendeten PA. Nach der maximalen Expansion

wurde die maximale OFS (y_{\max}) gemessen, welche über die gesamte Pulsationsdauer einen konstanten Wert etwas unterhalb 35 mN/m beträgt.

Ein häufig beobachtetes Phänomen während den PBS-Messungen war der Verlust der sphärischen Blasenform und in Folge ein „Abreißen“ der Luftblase vom Küvettenschlot wenn die OFS bei sehr guter Surfactantqualität zu gering wurde.

4.2.1 AZITHROMYCIN

Der Einfluss von Azithromycin auf die Oberflächenaktivität von PA 3 mg/ml wurde durch die Beimengung von 1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w) AB untersucht. Es fällt auf, dass bei zunehmender AB-Konzentration bereits die initiale y_{\min} höher ist als bei PA 3 mg/ml (s. Abb. 40 (I)). Während die Kurve mit 1% (w/w) Azithromycin wie bei purem PA im Verlauf der Pulsation rasch abfällt und nach etwa einer Minute konstante Werte unter 3 mN/m erreicht, flachen die Kurven mit 5% (w/w) und 10% (w/w) Azithromycin rascher ab und erreichen selbst nach fünf Minuten keine y_{\min} -Werte < 5 mN/m. Der statistische Vergleich der y_{\min} -Werte von purem PA und PA mit 10% (w/w) Azithromycin ergeben sowohl zu Beginn der Messungen (10,6 s) als auch nach einer Pulsationsdauer von 60 s und 300 s signifikante Unterschiede (s. Tabelle 9). Während Azithromycin 1% (w/w) zu keiner Zeit einen Einfluss auf die Oberflächenaktivität von PA zu haben scheint, weist Azithromycin 5% (w/w) nach 60 Sekunden statistisch signifikant höhere y_{\min} -Werte gegenüber reinem PA auf. Innerhalb der verbleibenden Pulsationsdauer sinkt y_{\min} durchschnittlich jedoch unter 10 mN/m und ist nach 300 s nicht mehr signifikant höher als y_{\min} bei PA 3 mg/ml ohne AB. Die maximalen OFS (y_{\max}) aller Proben mit Azithromycin waren über die gesamte Messdauer bei relativ konstanten Werten höher als bei reinem PA (s. Abb. 40 (II)). Die statistische Auswertung zeigt auch nach einer fünfminütigen Pulsationsdauer noch signifikante Unterschiede zwischen PA 3 mg/ml und PA + Azithromycin 1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w) (s. Tabelle 9).

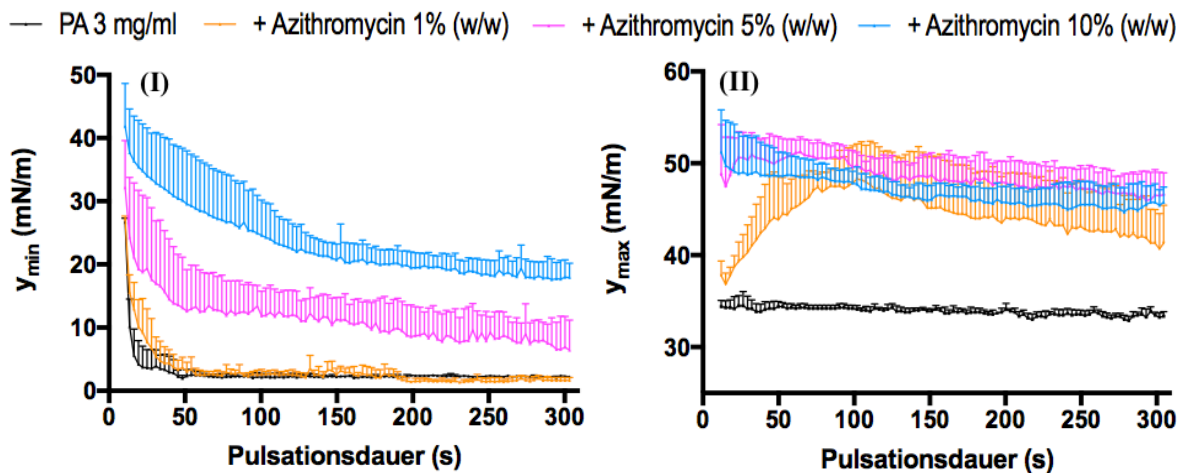


Abbildung 40: *In vitro* Oberflächenspannungsmessungen einer Gasblase am Pulsating Bubble Surfactometer unter dem Einfluss von Poractant alfa (PA) 3 mg/ml mit/ohne Azithromycin. Untersucht wurde der Einfluss von Azithromycin in unterschiedlichen Konzentrationen (1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w)) auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von PA. Gemessen wurden die minimalen und die maximalen Oberflächenspannungen (y_{\min} (I) und y_{\max} (II)) einer um 50% zyklisch expandierten (II) und wieder komprimierten (I) Blase über einen Zeitraum von 300 s. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente. Die schwarzen Kurven stellen dabei die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit purem PA 3 mg/ml dar.

Tabelle 9: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorierter Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Azithromycin-Proben wurden jeweils mit den Werten der puren PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Die Prozentangaben der Azithromycin-Konzentrationen beziehen sich stets auf die PA-Konzentration 3 mg/ml. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{\min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\triangle y_{\min}$ einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{\max}) wurden nach 60 s und 300 s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsations- dauer (s)	PA	PA 3 mg/ml + Azithromycin (%)		
		3 mg/ml M//SD	1% (w/w) M//SD	5% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	27,18//0,45	32,14//7,46	41,84//6,8
			ns	ns	***
y_{\min}	60	2,46//0,61	2,52//0,75	12,54//6,59	28,46//8,0
			ns	*	***
	300	2,3//0,0	1,66//0,46	6,88//4,87	17,98//2,75
			ns	ns	***
y_{\max}	60	34,2//0,35	45,22//3,38	51,12//1,43	48,62//2,12
			***	***	***
	300	33,46//0,33	41,32//3,64	46,5//2,82	45,74//2,02
			***	***	***

Da 10 mg Azithromycin mit 1 ml 100% ETOH suspendiert wird, wurden im Rahmen der OFS-Tests mit Azithromycin Kontrollversuche mit PA und ETOH durchgeführt. Die ETOH-Volumenmenge war dabei äquivalent zur ETOH-Menge in den Versuchen mit 1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w) Azithromycin. Die Proben mit ETOH zeigen sehr ähnliche y_{\min} -Kurveverläufe wie die reine PA-Probe (s. Abb. 41 (I)). Nach einer Pulsationsdauer von 5 Minuten zeigt sich bei PA-Proben mit einer ETOH-Menge entsprechend den Versuchen mit 5% (w/w)

Azithromycin eine signifikant niedrigere minimale OFS im Vergleich zu purem PA 3 mg/ml. y_{\min} ist in diesem Fall durchschnittlich nur noch halb so hoch (s. Tabelle 10). Die maximale OFS hingegen ist bei Proben mit ETOH höher als bei purem PA, wobei die Proben mit einer ETOH-Menge entsprechend den Versuchen mit 5% (w/w) Azithromycin die höchsten Werte aufweisen (s. Abb. 41 (II)). Nach einer Pulsationsdauer von 300 s ist y_{\max} bei diesen Versuchen signifikant höher als bei purem PA. Zwischen y_{\max} der anderen PA Proben mit und ohne ETOH konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Tabelle 10).

— PA 3 mg/ml — + ETOH \triangleq Azithromycin 1% (w/w) — + ETOH \triangleq Azithromycin 5% (w/w)
 — + ETOH \triangleq Azithromycin 10% (w/w)

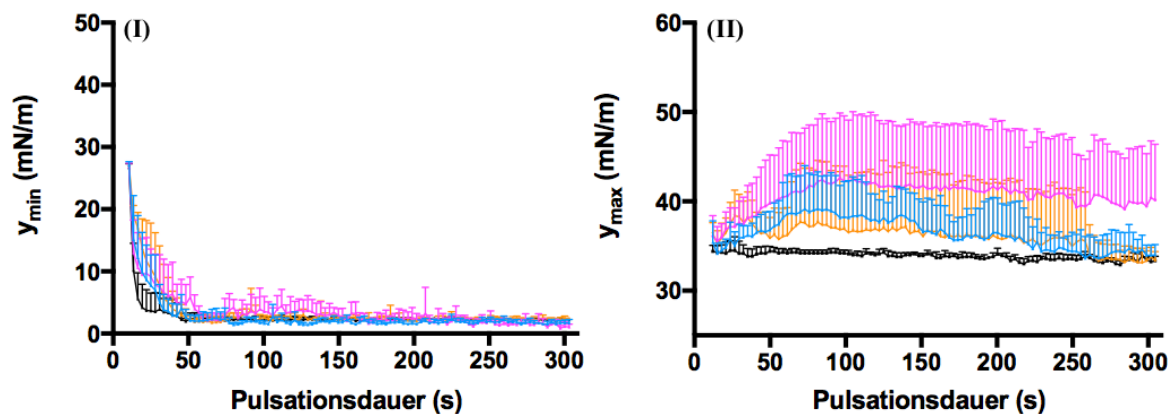


Abbildung 41: *In vitro* Oberflächenspannungsmessungen einer Gasblase am Pulsating Bubble Surfactometer unter dem Einfluss von Poractant alfa (PA) 3 mg/ml mit/ohne 100% Ethanol (ETOH). Untersucht wurde der Einfluss von ETOH in unterschiedlichen Konzentrationen auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von PA. Die ETOH-Volumenmenge entsprach dabei der ETOH-Menge in den Versuchen mit Azithromycin 1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w). Gemessen wurden die minimalen und maximalen Oberflächenspannungen (y_{\min} (I) und y_{\max} (II)) einer um 50% zyklisch expandierten (II) und wieder komprimierten (I) Blase über einen Zeitraum von 300 s. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente. Die schwarzen Kurven stellen dabei die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit purem PA 3 mg/ml dar.

Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorierter Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Ethanol (ETOH)-Proben wurden jeweils mit den Werten der puren PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{\min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\triangleq y_{\min}$ einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{\max}) wurden nach 60 s und 300 s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsations- dauer (s)	PA 3 mg/ml + ETOH p. a. Das ETOH-Volumen entspricht			
		PA 3 mg/ml	der Menge in den Versuchen mit Azithromycin (%)		
		M//SD	1% (w/w) M//SD	5% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	27,04//0,22	26,78//0,6	27,1//0,56
			ns	ns	ns
y_{\min}	60	2,46//0,61	1,9//0,8	2,28//0,99	2,12//1,39
			ns	ns	ns
	300	2,3//0,0	2,46//0,36	1,14//0,7	1,74//0,46
			ns	**	ns
y_{\max}	60	34,2//0,35	36,18//3,14	40,58//6,13	38,6//4,32
			ns	ns	ns

300	33,46//0,33	33,34//1,12	39,44//5,91	33,98//1,12
		ns	*	ns

4.2.2 CEFOTAXIM

Eine mögliche Inaktivierung von PA (3 mg/ml) durch Cefotaxim wurde durch die Zugabe von 1% (w/w), 10% (w/w) und 20% (w/w) des AB untersucht. Lediglich bei PA-Proben mit 20% (w/w) Cefotaxim bleibt im Verlauf der fünfminütigen Pulsationsdauer eine höhere y_{\min} bestehen als in Versuchen mit purem PA 3 mg/ml (s. Abb. 42 (I)). Vor Beginn der Blasenpulsation (10,6 s) ist y_{\min} in allen getesteten Proben annähernd identisch (26,7-27,1 mN/m). Während die minimale OFS bei 1% (w/w) und 10% (w/w) AB rasch abfällt und innerhalb der ersten Minute, ähnlich wie bei purem PA, Werte unter 3 mN/m erreicht, flacht die Kurve der 20% (w/w) Cefotaxim-Suspension ab und erreicht nach 300 s Pulsationsdauer einen Mittelwert von 9 mN/m. Durch die statistische Auswertung wird diese Beobachtung bestätigt. Der y_{\min} -Vergleich von PA-Proben ohne AB und Proben mit 20% (w/w) Cefotaxim ergibt sowohl nach 60 s als auch nach 300 s Pulsationsdauer signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 11). Ebenso wie bei y_{\min} sind die Werte von y_{\max} der Proben mit 1% (w/w) und 10% (w/w) Cefotaxim den Werten des reinen PA über die gesamte Pulsationsdauer sehr ähnlich (s. Abb. 42 (II)) und zeigen im statistischen Vergleich keine signifikanten Unterschiede. y_{\max} von Proben mit 20% (w/w) Cefotaxim war jedoch höher als bei PA-Proben ohne Cefotaxim. Die maximalen OFS werden in der statistischen Auswertung auch nach 300 s noch als signifikant unterschiedlich gewertet (s. Tabelle 11).

— PA 3 mg/ml — + Cefotaxim 1% (w/w) — + Cefotaxim 10% (w/w) — + Cefotaxim 20% (w/w)

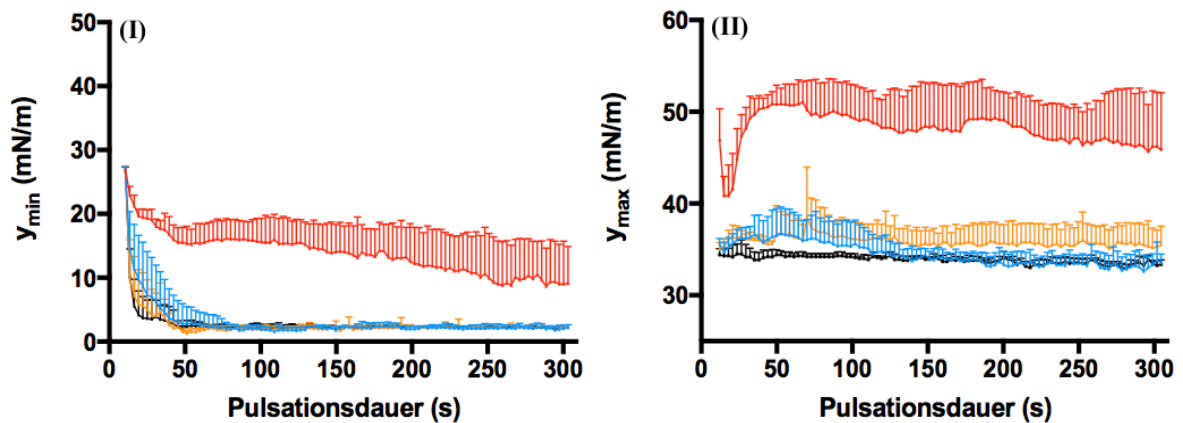


Abbildung 42: *In vitro* Oberflächenspannungsmessungen einer Gasblase am Pulsating Bubble Surfactometer unter dem Einfluss von Poractant alfa (PA) 3 mg/ml mit/ohne Cefotaxim. Untersucht wurde der Einfluss von Cefotaxim in unterschiedlichen Konzentrationen (1% (w/w), 10% (w/w) und 20% (w/w)) auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von PA. Gemessen wurden die minimalen und maximalen Oberflächenspannungen (y_{\min} (I) und y_{\max} (II)) einer um 50% zyklisch expandierten (II) und wieder komprimierten (I) Blase über einen Zeitraum von 300 s. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente. Die schwarzen Kurven stellen dabei die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit purem PA 3 mg/ml dar.

Tabelle 11: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Cefotaxim-Proben wurden jeweils mit den Werten der reinen PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Die Prozentangaben der Cefotaxim-Konzentrationen beziehen sich stets auf die PA-Konzentration 3 mg/ml. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\hat{=}$ y_{min} einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{max}) wurden nach 60 s und 300 s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsations- dauer (s)	PA 3 mg/ml M//SD	PA 3 mg/ml + Cefotaxim (%)		
			1% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD	20% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	26,86//0,63	27,1//0,3	27,04//0,22
			ns	ns	ns
y_{min}	60	2,46//0,61	1,74//0,36	2,66//1,95	15,36//3,1
			ns	ns	***
	300	2,3//0,0	2,3//0,0	2,06//0,54	9,0//6,74
			ns	ns	*
y_{max}	60	34,2//0,35	36,28//1,85	36,5//2,56	50,7//2,32
			ns	ns	***
	300	33,46//0,33	35,14//2,19	33,34//1,2	46,18//6,12
			ns	ns	***

4.2.3 GENTAMICIN

Neben den reinen PA-Kontrollproben (3 mg/ml) wurde PA mit 1% (w/w), 10% (w/w), 20% (w/w) und 100% (w/w) Gentamicin untersucht. Auf den ersten Blick verlaufen die einzelnen y_{min} -Kurven über den Zeitraum von fünf Minuten sehr ähnlich (s. Abb. 43 (I)). Bei genauerer Analyse sind jedoch teils statistisch signifikante Unterschiede zu beobachten (s. Tabelle 12). Zu Beginn der Messungen (10,6 s) wird y_{min} durch 10% (w/w) und 100% (w/w) Gentamicin leicht verringert, was im Vergleich zu PA ohne Gentamicin zu signifikant niedrigeren y_{min} -Werten führt (s. Tabelle 12). Innerhalb der ersten Minute kommt es jedoch bei fast allen Proben zur Reduktion von $y_{min} < 3$ mN/m, sodass der statistische Vergleich der Messwerte nach spätestens 300 s keine signifikanten Unterschiede mehr zeigt (s. Abb. 43 (I) und Tabelle 12). Lediglich bei Proben mit 1% (w/w) Gentamicin erfolgt die Reduktion von y_{min} etwas langsamer. Ein Wert unter 3 mN/m besteht hier erst nach ca. zwei Minuten. Der Vergleich der y_{min} nach 60 s Pulsationsdauer zeigt daher einen signifikanten Unterschied zu PA 3 mg/ml ohne AB. Bei Betrachtung von y_{max} (s. Abb. 43 (II)) wird deutlich, dass der Mittelwert bei Proben mit 1% (w/w) Gentamicin anfangs über dem Mittelwert der reinen PA-Probe liegt. Innerhalb der ersten zwei Minuten der dynamischen Untersuchung sinkt der Wert jedoch auf eine ähnliche y_{max} wie bei PA 3 mg/ml. Es besteht zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied. Die Mittelwerte der maximalen OFS von Proben mit 10% (w/w), 20% (w/w) und 100% (w/w) Gentamicin liegen hingegen stets um ca. 2,5-5 mN/m unter den Mittelwerten der Kontrollprobe, wobei der Mittelwert der Proben mit 100% (w/w) AB zeitweise

am niedrigsten ist. Die nach 60 s gemessenen und statistisch verglichenen Werte zeigen, dass PA-Proben mit 10% (w/w) und 20% (w/w) insbesondere aber mit 100% (w/w) Gentamicin verglichen mit purem PA signifikant niedrigere maximale OFS erreichen (s. Tabelle 12). Am Ende der Pulsationsdauer bestehen lediglich noch bei PA-Proben mit 10% (w/w) und 20% (w/w) Gentamicin signifikant niedrigere y_{\max} -Werte im Vergleich zu PA-Proben ohne Gentamicin (s. Tabelle 12).

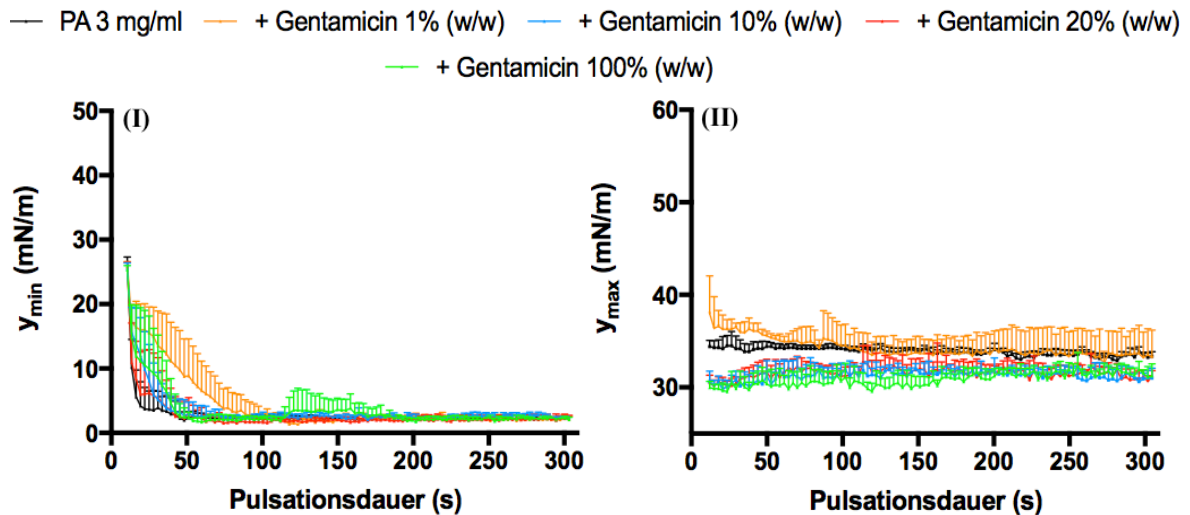


Abbildung 43: *In vitro* Oberflächenspannungsmessungen einer Gasblase am Pulsating Bubble Surfactometer unter dem Einfluss von Poractant alfa (PA) 3 mg/ml mit/ohne Gentamicin. Untersucht wurde der Einfluss von Gentamicin in unterschiedlichen Konzentrationen (1% (w/w), 10% (w/w), 20% (w/w) und 100% (w/w)) auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von PA. Gemessen wurden die minimalen und maximalen Oberflächenspannungen (y_{\min} (I) und y_{\max} (II)) einer um 50% zyklisch expandierten (II) und wieder komprimierten (I) Blase über einen Zeitraum von 300 s. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. Die schwarzen Kurven stellen dabei die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit purem PA 3 mg/ml dar.

Tabelle 12: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Gentamicin-Proben wurden jeweils mit den Werten der puren PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Die Prozentangaben der Gentamicin-Konzentrationen beziehen sich stets auf die PA-Konzentration 3 mg/ml. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{\min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\hat{=} y_{\min}$ einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{\max}) wurden nach 60 s und 300 s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsationsdauer (s)	PA 3 mg/ml + Gentamicin (%)				
		PA 3 mg/ml M//SD	1% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD	20% (w/w) M//SD	100% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	26,24//0,36	25,54//0,87	25,78//0,69	25,32//0,67
			ns	*	ns	*
y_{\min}	60	2,46//0,61	6,58//4,57	2,6//1,69	2,3//1,66	1,68//0,63
			*	ns	ns	ns
	300	2,3//0,0	2,3//0,57	2,54//0,22	2,22//0,66	2,3//0,28
			ns	ns	ns	ns
y_{\max}	60	34,2//0,35	34,92//0,61	31,12//1,86	31,62//1,42	30,48//0,82
			ns	**	**	***
	300	33,46//0,33	33,22//2,75	30,9//0,65	31,12//0,69	31,52//0,39
			ns	*	*	ns

Tabelle 13: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorierter Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Moxifloxacin-Proben wurden jeweils mit den Werten der reinen PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Die Prozentangaben der Moxifloxacin-Konzentrationen beziehen sich stets auf die PA-Konzentration 3 mg/ml. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus n=5 Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant, **: p < 0,01. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{\min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\hat{=}$ y_{\min} einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{\max}) wurden nach 60s und 300s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsations-dauer (s)	PA	PA 3 mg/ml + Moxifloxacin (%)			
		3 mg/ml M//SD	1% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD	20% (w/w) M//SD	100% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	26,34//0,82	27,0//0,63	26,32//0,59	26,0//0,28
			ns	ns	ns	ns
y_{\min}	60	2,46//0,61	3,52//2,98	2,38//0,18	4,88//3,61	4,52//3,69
			ns	ns	ns	ns
	300	2,3//0,0	2,58//0,99	2,54//0,36	2,3//0,0	2,06//0,67
y_{\max}	60	34,2//0,35	41,22//6,93	33,68//0,39	32,62//1,54	32,08//1,31
			**	ns	ns	ns
	300	33,46//0,33	37,44//7,69	31,96//0,47	30,48//1,62	33,02//1,04
			ns	ns	ns	ns

4.2.5 TEICOPLANIN

Der Einfluss auf die OFS-reduzierenden Eigenschaften von PA wurde mit 1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w) Teicoplanin untersucht. Während die initiale y_{\min} bei reinem PA 3 mg/ml und PA mit 1% (w/w) Teicoplanin sehr ähnlich ist, steigt sie bei zunehmender AB-Konzentration an (s. Abb. 45 (I)). Während der fünfminütigen Pulsationsdauer fällt y_{\min} bei PA-Proben mit 1% (w/w) Teicoplanin bereits langsamer ab als bei purem PA und erreicht erst nach über drei Minuten vergleichbare Werte. Proben mit Teicoplanin-Konzentrationen von 5% (w/w) bzw. 10% (w/w) hingegen erreichen selbst nach fünf Minuten nur deutlich höhere y_{\min} -Mittelwerte (s. Tabelle 14). So besteht zwischen den y_{\min} von PA 3 mg/ml und PA, das mit 1% (w/w) Teicoplanin versetzt ist, zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied. Bei PA-Proben mit 5% (w/w) und 10% (w/w) Teicoplanin hingegen bestehen von Beginn an signifikant größere y_{\min} als in Versuchen mit purem PA. y_{\max} von PA ohne AB und PA mit 1% (w/w) Teicoplanin haben wie bei y_{\min} ähnliche Werte und sind über die fünfminütige Messdauer annähernd konstant (s. Abb. 45 (II)). y_{\max} von PA mit 5% (w/w) und 10% (w/w) Teicoplanin liegen jedoch weit über den Werten von PA 3 mg/ml. Obwohl y_{\max} im Rahmen dieser Versuche über die Pulsationsdauer von fünf Minuten hinweg leicht sinken, bestehen nach 60 s und 300 s signifikante Unterschiede zu den Versuchen mit PA 3 mg/ml (s. Tabelle 14).

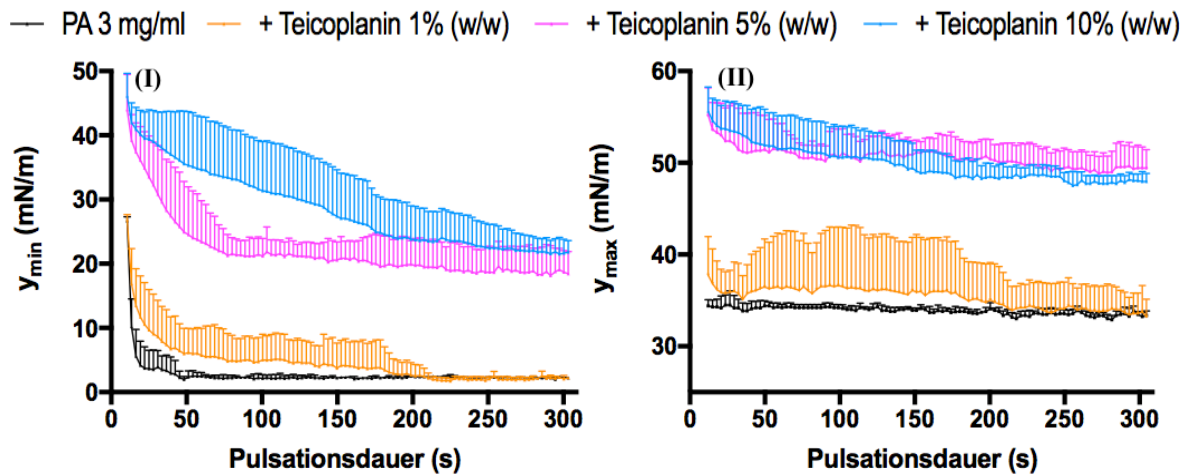


Abbildung 45: *In vitro* Oberflächenspannungsmessungen einer Gasblase am Pulsating Bubble Surfactometer unter dem Einfluss von Poractant alfa (PA) 3 mg/ml mit/ohne Teicoplanin. Untersucht wurde der Einfluss von Teicoplanin in unterschiedlichen Konzentrationen (1% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w)) auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von PA. Gemessen wurden die minimalen und maximalen Oberflächenspannungen (y_{\min} (I) und y_{\max} (II)) einer um 50% zyklisch expandierten (II) und wieder komprimierten (I) Blase über einen Zeitraum von 300 s. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente. Die schwarzen Kurven stellen dabei die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit purem PA 3 mg/ml dar.

Tabelle 14: Ergebnisse der statistischen Analyse der *in vitro* Oberflächenspannungsmessungen am Pulsating Bubble Surfactometer, die mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt wurden. Die Werte der Poractant alfa (PA)/Teicoplanin-Proben wurden jeweils mit den Werten der puren PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen. Die Prozentangaben der Teicoplanin-Konzentrationen beziehen sich stets auf die PA-Konzentration 3 mg/ml. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) aus $n=5$ Messwiederholungen unabhängiger Experimente sowie die statistischen Signifikanzen: ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$. Der Vergleich der minimalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{\min}) erfolgte jeweils nach 10,6 s, 60 s und 300 s. Die Werte nach 10,6 s entsprechen dabei den OFS am Ende der Adsorptionsphase vor der ersten Blasenexpansion ($\triangleq y_{\min}$ einer statischen Blase = y_{stat}). Die maximalen OFS (y_{\max}) wurden stets nach 60 s und 300 s verglichen.

OFS (mN/m)	Pulsations- dauer (s)	PA	PA 3 mg/ml + Teicoplanin (%)		
		3 mg/ml M//SD	1% (w/w) M//SD	5% (w/w) M//SD	10% (w/w) M//SD
y_{stat}	10,6	26,7//0,62	26,84//0,83	43,98//5,5	46,12//3,54
			ns	***	***
y_{\min}	60	2,46//0,61	5,74//4,18	23,38//6,43	34,64//8,25
			ns	***	***
	300	2,3//0,0	2,06//0,54	18,68//3,37	21,64//2,16
			ns	***	***
y_{\max}	60	34,2//0,35	36,28//5,98	51,44//2,85	51,54//3,59
			ns	***	***
	300	33,46//0,33	33,56//2,24	49,44//2,5	48,06//0,72
			ns	***	***

4.3 ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Im Rahmen der Bakterienhemmhofversuche konnte festgestellt werden, dass eine Steigerung der AB-Konzentration zwischen 0,001 mg/ml und 1 mg/ml zu einer Größenzunahme der Bakterieninhibitionszonen führt. Bei Betrachtung der Einzelpunktvergleiche fällt hingegen auf, dass geringe AB-Konzentrationen (0,001 mg/ml und 0,01 mg/ml) keine signifikanten Unterschiede zur Folge haben. Die Signifikanz der Unterschiede nimmt mit steigender AB-Konzentration tendenziell zu. Ebenso konnte beobachtet werden, dass ein erhöhtes HV von 200 μ l im Vergleich zu 100 μ l in allen Versuchen, mit und ohne PA, ausnahmslos zu größeren Hemmhöfen führt. Durch die statistische Analyse (100 μ l vs. 200 μ l) wird deutlich, dass bei den Versuchen ohne PA häufiger signifikante Größenunterschiede zwischen den Hemmhöfen bestehen als bei Versuchen mit AB/PA (s. Tabelle 15 und 16). Bei der Gegenüberstellung von 100 μ l vs. 200 μ l im Rahmen der Versuche ohne PA sind die Unterschiede der Hemmhofgrößen bei der Verwendung von Teicoplanin auf *GBS-HD*- und *GBS-LD*-Bakterienrasen ($p_{HD} < 0,001$, $p_{LD}=0,001$) gefolgt von *E. coli*-Versuchen mit Cefotaxim ($p=0,003$) am deutlichsten. Durch die zusätzliche Applikation von PA entstehen bei dem Vergleich 100 μ l vs. 200 μ l die größten Hemmhofunterschiede in Versuchen mit Azithromycin auf *GBS-LD*-Bakterienrasen ($p=0,003$) und in allen Versuchen mit Teicoplanin ($p_{HD}=0,02$, $p_{LD}=0,02$, $p_{S. aureus}=0,02$). Bei identischer Hypophase (AB/PA vs. AB ohne PA) zeigt ein Großteil der Versuche, dass eine zusätzliche Applikation von PA die Bakterienhemmung positiv beeinflussen kann. So sind die Hemmhöfe bei einem HV von 100 μ l in allen Versuchen mit PA größer als in den Kontrollversuchen ohne PA. Der *GBS-HD*-Versuch mit Teicoplanin zeigt hier mit einem p-Wert $< 0,001$ den größten Effekt, gefolgt von den Azithromycin-Versuchen auf *E. coli*-Bakterienrasen ($p=0,001$) und auf *GBS-LD*-Bakterienrasen ($p=0,006$). Bei den Versuchen mit 200 μ l Hypophase wird der größte Effekt bezüglich der PA-Wirkung bei Versuchen mit Teicoplanin auf *S. aureus*- ($p=0,008$) und *GBS-LD*-Bakterienrasen ($p=0,008$) deutlich. Bei Versuchen mit 200 μ l HV entstehen in einigen Versuchen aber auch kleinere Hemmhöfe, wenn zum AB zusätzlich PA appliziert wird. Hierzu zählen alle 200 μ l-Versuche (AB/PA vs. AB ohne PA) auf *E. coli*-Bakterienrasen, die *GBS-HD*-Versuche mit Azithromycin sowie die *S. aureus*-Versuche mit Moxifloxacin. Die Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen sind allerdings zu gering, um sich als statistisch signifikant zu erweisen. Bei Betrachtung der Ergebnisse mit Teicoplanin wird deutlich, dass alle Versuche mit diesem AB sowohl bei der Gegenüberstellung von AB/PA vs. AB als auch von 100 μ l vs. 200 μ l im t-Test signifikante Unterschiede in ihren AUC aufweisen. Während im Rahmen der Azithromycin-Versuche bei niedrigeren AB-Konzentrationen (AB/PA vs. reines AB) generell sehr ähnliche Hemmhofgrößen entstehen, nimmt die Bakterienhemmung bei einer Azithromycin-Konzentration von 1 mg/ml in Versuchen mit PA durchschnittlich stärker zu als in Versuchen ohne PA. Folglich ergeben sich bei dieser AB-Konzentration häufiger statistisch signifikante Unterschiede in den Einzelpunktvergleichen. Ausgenommen hiervon sind die Azithromycin-Versuche mit *E. coli* bei 200 μ l HV (s. Abb. 19 (II)) sowie die 100 μ l-Versuche mit

S. aureus (s. Abb. 38 (I)). Auch die *GBS-HD*-Versuche mit 200 µl HV weisen bei 1 mg/ml Azithromycin ähnliche Hemmhofgrößen auf. In allen Graphen der 200 µl-Azithromycin-Versuche ist zudem deutlich erkennbar, dass bei einer Azithromycin-Konzentration von 1 mg/ml die Erhöhung der PA-Konzentration auf 72 mg/ml einen deutlichen Effekt auf die Größenzunahme der Bakterienhemmhöfe hat (s. Abb. 19 (II), 26 (II), 32 (II) und 38 (II)). Auch bei den Versuchen mit Moxifloxacin wird dies ersichtlich (s. Abb. 24 (II) und 36 (II)), nicht jedoch bei Versuchen mit hydrophilen AB (mit Ausnahme der *GBS-HD*-Versuche mit Teicoplanin, 100 µl; s. Abb. 21 (I)). Des Weiteren fällt auf, dass eine Steigerung der Azithromycin-Konzentration auf 10 mg/ml im Vergleich zu Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin (je ohne PA) in allen Versuchen zu einer deutlichen Größenzunahme der Bakterienhemmhöfe führt. Erneut ist dies auch bei den Versuchen mit Moxifloxacin zu erkennen, tendenziell weniger ausgeprägt jedoch wieder in den Versuchen mit hydrophilen AB. In den 200 µl Azithromycin-Versuchen mit *GBS-HD*, *GBS-LD* und *S. aureus* fallen die Hemmhöfe von Versuchen mit 10 mg/ml AB trotz der weitaus höheren AB-Konzentration aber kleiner aus als die Inhibitionszonen von Versuchen mit 1 mg/ml Azithromycin + 72 mg/ml PA. Dies ist ebenso bei 100 µl Teicoplanin-Versuchen auf *GBS*-Bakterienrasen zu beobachten.

Im Rahmen der *in vitro* OFS-Messungen am PBS konnten sehr unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden. Da y_{\min} nach einer fünfminütigen Pulsationsdauer im Rahmen unserer Betrachtungen am bedeutendsten sind, werden diese Ergebnisse im Folgenden noch einmal zusammengefasst (s. Tabelle 17): Azithromycin und Teicoplanin führen bei steigender AB-Konzentration zu einer deutlichen Funktionseinschränkung von PA. Während eine Azithromycin-Konzentration von 1% (w/w) kaum einen Einfluss auf die Aktivität von PA nimmt, ist y_{\min} bei PA-Proben mit 5% (w/w) Azithromycin höher als bei purem PA. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen PA 3 mg/ml und PA-Proben mit Azithromycin zeigt sich nach fünf Minuten jedoch erst bei einer AB-Konzentration von 10% (w/w). Bei Teicoplanin hingegen ist bereits bei einer AB-Konzentration von 1% (w/w) eine Verschlechterung der PA-Aktivität zu beobachten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den y_{\min} -Werten von PA 3 mg/ml und PA/Teicoplanin-Proben bestehen bei AB-Konzentrationen von 5% (w/w) und 10% (w/w). Cefotaxim hat bei Konzentrationen von 1% (w/w) und 10% (w/w) keinen negativen Einfluss auf PA 3 mg/ml. Die Zugabe von 20% (w/w) Cefotaxim hingegen führt nach fünf Minuten im Vergleich zu purem PA zu einer signifikanten Steigerung von y_{\min} . Gentamicin und Moxifloxacin haben selbst bei einer Konzentration von 100% (w/w) einen so geringen Einfluss auf die Funktion von PA, dass nach einer Pulsationsdauer von fünf Minuten in allen Versuchen eine y_{\min} unter 3 mN/m und somit kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Versuchsergebnissen von purem PA besteht.

Tabelle 15: Statistik-Tabelle der Bakterienhemmhofversuche. Es erfolgte der Vergleich von Versuchsergebnissen, die durch unterschiedliche Antibiotikumgemische induziert wurden: Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) vs. AB ohne PA (Kontrollgruppe) bei identischer Hypophase. Die Versuche wurden mit einem Hypophasenvolumen (HV) von 100 µl oder 200 µl durchgeführt. Die Konzentration von PA betrug 10 mg/ml, die AB-Konzentrationen betragen 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 oder 1 mg/ml. Die Einzelpunktvergleiche von n=5 Versuchen aus unabhängigen Experimenten mit PA vs. ohne PA bei identischer AB-Konzentration erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test; der statistische Vergleich der (n=5) AUC (engl.: area under the curve; dt.: Fläche unter der Kurve) erfolgte mittels gepaartem t-Test. Bei den gelb hinterlegten Versuchen entstanden durchschnittlich größere Bakterienhemmhöfe ohne die Beimengung von PA (s. Abbildungen 15 (II), 17 (II), 19 (II), 26 (II) und 36 (II)). Die Unterschiede waren jedoch in keinem Fall statistisch signifikant. Bei allen anderen Versuchen entstanden größere Hemmhöfe durch die kombinierte Applikation des AB mit PA. ns: nicht signifikant, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001. *E. coli*: *Escherichia coli*, *GBS-HD*: high density Gruppe-B-Streptokokken, *GBS-LD*: low density Gruppe-B-Streptokokken, *S. aureus*: *Staphylokokkus aureus*.

Antibiotikum+ Poractant alfa vs. Antibiotikum ohne Poractant alfa									
Bakterien- spezies	Antibiotikum	HV in µl	AUC	Antibiotikumkonzentration in mg/ml					
				0,001	0,01	0,05	0,1	0,5	1
<i>E. coli</i>	Cefotaxim	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Gentamicin	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Azithromycin	100	**	ns	ns	ns	ns	ns	***
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>GBS-HD</i>	Teicoplanin	100	***	ns	ns	***	***	***	***
		200	*	ns	ns	ns	ns	**	***
	Moxifloxacin	100	*	ns	ns	ns	ns	**	*
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Azithromycin	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>GBS-LD</i>	Teicoplanin	100	*	ns	ns	ns	ns	***	***
		200	**	ns	ns	ns	ns	***	**
	Moxifloxacin	100	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Azithromycin	100	**	ns	ns	ns	ns	ns	***
		200	*	ns	ns	ns	ns	ns	***
<i>S. aureus</i>	Teicoplanin	100	*	ns	ns	ns	ns	ns	*
		200	**	ns	ns	ns	ns	***	***
	Moxifloxacin	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Azithromycin	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		200	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***

Tabelle 16: Statistik-Tabelle der Bakterienhemmhofversuche. Es erfolgte der Vergleich von Versuchsergebnissen mit unterschiedlicher Hypophase: 100 µl vs. 200 µl Hypophasenvolumen (HV) bei identischem Antibiotikumgemisch (Antibiotikum (AB) + Poractant alfa (PA) oder AB ohne PA). Die Konzentration von PA betrug 10 mg/ml, die AB-Konzentration betrug 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 oder 1 mg/ml. Die Einzelpunktvergleiche von n=5 Versuchen aus unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichem HV bei identischer AB-Konzentration erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Šidák's Post-hoc-Test; der statistische Vergleich der (n=5) AUC (engl.: area under the curve; dt.: Fläche unter der Kurve) erfolgte mittels gepaartem t-Test. ns: nicht signifikant, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001. *E. coli*: *Escherichia coli*, *GBS-HD*: *high density Gruppe-B-Streptokokken*, *GBS-LD*: *low density Gruppe-B-Streptokokken*, *S. aureus*: *Staphylokokkus aureus*.

100 µl vs. 200 µl Hypophasenvolumen									
Bakterien-spezies	Antibiotikum	Antibiotikum-gemisch	AUC	Antibiotikumkonzentration in mg/ml					
				0,001	0,01	0,05	0,1	0,5	1
<i>E. coli</i>	Cefotaxim	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		AB	**	ns	ns	*	***	***	***
	Gentamicin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
		AB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
	Azithromycin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	*	*
		AB	*	ns	ns	ns	ns	***	***
<i>GBS-HD</i>	Teicoplanin	AB/PA	*	ns	ns	ns	ns	***	**
		AB	***	ns	ns	ns	***	***	***
	Moxifloxacin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
		AB	*	ns	ns	ns	ns	***	**
	Azithromycin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
		AB	*	ns	ns	ns	ns	**	***
<i>GBS-LD</i>	Teicoplanin	AB/PA	*	ns	ns	ns	ns	***	**
		AB	**	ns	ns	ns	***	***	***
	Moxifloxacin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
		AB	**	ns	ns	ns	ns	*	**
	Azithromycin	AB/PA	**	ns	ns	ns	ns	*	***
		AB	ns	ns	ns	ns	ns	**	***
<i>S. aureus</i>	Teicoplanin	AB/PA	*	ns	ns	ns	ns	***	***
		AB	**	ns	ns	ns	ns	***	***
	Moxifloxacin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		AB	**	ns	ns	ns	***	***	***
	Azithromycin	AB/PA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
		AB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabelle 17: In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung aller am Pulsating Bubble Surfactometer durchgeführten Oberflächenspannungsmessungen nach 300 s Pulsationsdauer zusammengefasst. Die Versuchsergebnisse (n=5 aus unabhängigen Experimenten) der Poractant alfa (PA)/Antibiotikum (AB)-Proben bzw. PA/Ethanol (ETOH)-Proben wurden jeweils mit den Versuchsergebnissen der reinen PA 3 mg/ml-Proben (Kontrollmessungen) verglichen und mittels einfaktorierter Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test statistisch analysiert. Die Prozentangaben stehen im Bezug zur PA-Konzentration 3 mg/ml. Es sind jeweils die statistischen Unterschiede zwischen den minimalen (y_{min}) bzw. den maximalen Oberflächenspannungen (OFS; y_{max}) dargestellt. Bei den gelb hinterlegten Ergebnissen wurde die OFS durch die Hinzugabe von AB bzw. ETOH im Vergleich zu purem PA 3 mg/ml statistisch signifikant herabgesetzt. Bei allen anderen Versuchen, bei denen eine statistische Signifikanz besteht, nahm die OFS durch die Zugabe von AB bzw. ETOH im Vergleich zu PA 3 mg/ml zu. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

PA 3 mg/ml + Antibiotikum bzw. ETOH	OFS (y) nach 300 s	Antibiotikumkonzentration (%)				
		1% (w/w)	5% (w/w)	10% (w/w)	20% (w/w)	100% (w/w)
Azithromycin	y_{min}	ns	ns	***	-	-
	y_{max}	***	***	***	-	-
ETOH	y_{min}	ns	**	ns	-	-
	y_{max}	ns	*	ns	-	-
Cefotaxim	y_{min}	ns	-	ns	*	-
	y_{max}	ns	-	ns	***	-
Gentamicin	y_{min}	ns	-	ns	ns	ns
	y_{max}	ns	-	*	*	ns
Moxifloxacin	y_{min}	ns	-	ns	ns	ns
	y_{max}	ns	-	ns	ns	ns
Teicoplanin	y_{min}	ns	***	***	-	-
	y_{max}	ns	***	***	-	-

5 DISKUSSION

Bereits in der Vergangenheit wurden zur kombinierten intratrachealen AB-Surfactant-Applikation Studien durchgeführt (88, 95, 98-100, 109). Sie unterliegen der Hypothese, dass der Zusatz von Surfactant zu einer besseren Verteilung des AB in der Lunge führen kann. Diese Art der Medikamentenapplikation könnte im Rahmen von pulmonalen Infektionen zukünftig eine alternative und effektive Methode in der lokalen antimikrobiellen bzw. antiinflammatorischen Therapie darstellen. Da die Lunge aufgrund ihrer großen Oberfläche eine enorme Absorptionsfläche bietet, könnte die intratracheale Applikation von Surfactant in Kombination mit geeigneten Arzneimitteln auch eine neuartige Option für systemische Therapien darstellen. Bei Neugeborenen, die im Rahmen eines Surfactantmangels eine bzw. wiederholte Surfactantsubstitutionen benötigen wäre eine additive intratracheale AB- bzw. Arzneimittelapplikation bei Bedarf möglich. Dies stellt jedoch eine invasive Methode dar. Forschungsgruppen, die sich mit der Applikation von Surfactant als Aerosol beschäftigen und an einer Verbesserung der intrapulmonalen Deposition der Aerosole arbeiten, existieren bereits (110, 111). Sollte in Zukunft eine effektive Applikation von Surfactant als Aerosol gelingen, könnte z. B. eine kombinierte inhalative Applikation verschiedener Pharmaka mit Surfactant als Trägersubstanz eine weniger invasive Behandlungsmethode darstellen (45).

Im Rahmen unseres Forschungsprojekts wurde ein *in vitro* Modell gewählt, mit dessen Hilfe die funktionelle Interaktion neuartiger Kombinationen bestehend aus dem exogenen porcinen Surfactant PA und verschiedenen AB erforscht werden sollte. Wir untersuchten als eine der ersten Arbeitsgruppen, ob durch die Kombination von AB und PA die Größe von Bakterienhemmhöfen beeinflusst werden kann. Um einen Einfluss auf die biophysikalische Funktion von PA durch einzelne AB zu untersuchen, wurden *in vitro* OFS-Messungen am PBS durchgeführt.

5.1 INAKTIVIERUNG VON PORACTANT ALFA DURCH ANTIBIOTIKA

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von exogenem pulmonalem Surfactant durch AB möglich ist (99, 112). Für unsere OFS-Messungen am PBS wurde PA mit je einem AB in unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert. Zum Vergleich dieser Versuchsergebnisse diente PA 3 mg/ml.

Die Kombination von Cefotaxim mit PA zeigte einen Effekt auf die OFS einer Luftblase. Die Oberflächenaktivität wurde durch eine AB-Konzentration von 20% (w/w) verglichen mit den PA-Kontrollen negativ beeinflusst (s. Abb. 42). Der Grund für den Funktionsverlust ist bislang nicht geklärt. Cefotaxim ist ein Beta-Lactam-AB aus der Gruppe der Cephalosporine (Gruppe 3a). Untersuchungen aus dem Jahr 1989 zeigten, dass Cephalosporine zum einen an Lipide binden und sich zum anderen in PL-Doppelschichten eingliedern können (113). Daher kann über eine Interaktion von Cefotaxim mit PA auf diese Weise spekuliert werden. Auch eine Ionisierung von Cefotaxim könnte eine mögliche Ursache für die Interaktion mit PA sein. Cefotaxim-Moleküle

liegen in einer wässrigen Lösung als Zwitterionen vor und geben in sauren Lösungen H^+ -Ionen ab. PA stellt mit einem pH-Wert zwischen 5,5 und 6,5 eine saure Lösung dar (114). Folglich liegen Cefotaxim-Moleküle nach der Zugabe von PA als Kationen vor. Der Einfluss ionischer und nichtionischer Polymere auf die Aktivität exogener Surfactantpräparate wurde schon früher untersucht (13). Sowohl anionische als auch kationische Polymere verbesserten in geringen Konzentrationen *in vitro* die Oberflächenaktivität von exogenem Surfactant (115, 116). Durch hohe Ionen-Konzentrationen kam es jedoch zum Funktionsverlust des Surfactants. Grund hierfür waren vermutlich elektrostatische Interaktionen, die das Ladungsgleichgewicht zwischen den Surfactantbestandteilen störten. Die Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass es stark auf das Konzentrationsverhältnis zwischen geladenen Molekülen und PL ankommt (116, 117). Da die Funktionseinschränkung von PA in unseren Versuchen erst bei einer Cefotaxim-Konzentration von 20% (w/w) auftrat, könnte diese möglicherweise auf einer zu hohen Konzentration geladener Moleküle beruhen, während das Verhältnis zwischen geladenen Molekülen und PL bei niedrigeren Cefotaxim-Konzentrationen noch ausgeglichen war. Eine Untersuchung mit Amoxicillin, ebenso ein Beta-Lactam-AB, zeigte, dass die biophysikalische Eigenschaft eines natürlichen bovinen Surfactants in einer Konzentration von 1 mg/ml *in vitro* durch die Beimengung von 50 mg/ml Amoxicillin unbeeinflusst blieb. *In vivo* hingegen zeigte sich trotz einer erhöhten Surfactant-Konzentration (40 mg/ml) nach der Kombination mit Amoxicillin eine reduzierte Surfactant-Aktivität. Die Autoren spekulieren, dass dies ggf. aus der Bindung von Amoxicillin an SP-B und SP-C resultierte (99). Ob durch Cefotaxim eine ähnliche Interaktion stattfinden kann, ist nicht bekannt. Interessant ist, dass van't Veen et al. durch Ceftazidim, ebenso ein Cephalosporin der 3. Generation, trotz höherer AB-Konzentrationen als in den Versuchen dieser Arbeit (37,5 mg/ml Ceftazidim auf 1 mg/ml Surfactant) keine Surfactantinaktivierung feststellen konnten (99).

Azithromycin ist ein AB aus der Gruppe der Makrolide. Die Beimengung dieses AB führte in unseren Versuchen am PBS dosierungsabhängig zu einer Verschlechterung der biophysikalischen Eigenschaft von PA (s. Abb. 40). Bereits zuvor untersuchten Arbeitsgruppen den Einfluss von Azithromycin auf PL-Doppelschichten (z. B. DPPC). Dabei wurden die molekulare Anordnung, die Fluidität sowie die Membranpermeabilität der Lipidschichten bewertet (118). Unterhalb einer bestimmten Temperatur liegen PL in Form einer Gelphase vor, in welcher die Moleküle einen geordneten Zustand einnehmen. Diese Temperatur ist PL-spezifisch. Oberhalb dieser Übergangstemperatur nehmen die Lipidschichten einen flüssig-kristallartigen Zustand an und liegen ungeordneter vor (6). Während die Membranpermeabilität durch Azithromycin in diesen Untersuchungen unbeeinflusst blieb, konnte mittels Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden, dass die Gelphase der DPPC-Moleküle durch Azithromycin destruiert wurde (118). Dies könnte die Folge einer gesteigerten Fluidität an der hydrophoben/hydrophilen PL-Grenzfläche sein (118). Clarithromycin, ebenso ein Makrolid-AB, zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf DPPC-Monoschichten (119). Nach Beimengung von Clarithromycin konnten mithilfe von

mikroskopischen, spektroskopischen sowie reflektometrischen Untersuchungen Veränderungen in der molekularen Anordnung innerhalb der PL-Monoschicht nachgewiesen werden. Das AB hatte sowohl einen Einfluss auf die hydrophilen PL-Köpfe als auch auf die hydrophoben Alkylreste. Zudem kam es zur Eingliederung in die DPPC-Lipidschicht. Allerdings wurde durch Clarithromycin weder die Stabilität noch die Funktionalität der DPPC-Monoschicht beeinträchtigt. Als AB aus der gleichen Substanzklasse wäre es möglich, dass Azithromycin vergleichbare Effekte auf PA hat.

Da für die Herstellung der Azithromycin-Stammlösung 100% ETOH Verwendung fand, wurde auch der Einfluss von ETOH auf die OFS von PA untersucht. Die Ergebnisse geben keinen Anhalt für eine Verschlechterung der PA-Oberflächenaktivität durch ETOH (s. Abb. 41). Die Zugabe von ETOH zu PA 3 mg/ml in einer Menge entsprechend den Versuchen mit 5% (w/w) Azithromycin scheint tendenziell einen positiven Effekt auf die minimale OFS des porcinen Surfactants zu haben (s. Tabelle 10). Es ist bekannt, dass die OFS an der Grenzfläche zwischen Luft und ETOH (~ 22 mN/m bei 20°C) geringer ist als zwischen Luft und destilliertem Wasser (~ 72 mN/m bei 20°C) oder Luft und NaCl 0,9% (~ 82 mN/m bei 25°C) (120). Wird Alkohol zu Wasser oder einer isotonen Kochsalzlösung hinzugefügt, verringert sich die OFS der Flüssigkeit (121). Schon Ende der 1960er Jahre fand man an der Stanford University, Kalifornien, USA heraus, dass ETOH einen positiven Effekt auf die Surfactantfunktion hat (122). Die Ventilation exzidiertier Tierlungen mit einem erhöhten Tidalvolumen führte nach einiger Zeit zu einer verminderten Lungencompliance. Dies resultierte aus einer sekundären Surfactantinaktivierung, welche durch eine intratracheale Vernebelung von ETOH kompensiert werden konnte (122). Es ist bekannt, dass ETOH, abhängig von der Konzentration, einen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichten hat. ETOH-Moleküle tendieren zu einer Aggregation an Lipid-Wasser-Grenzflächen. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften können ETOH-Moleküle einfach in Lipid-Doppelschichten eindringen, was eine gesteigerte Permeabilität der Lipidschicht zur Folge hat (121, 123). Zudem ist eine Bindung zwischen ETOH und den Lipiden durch Wasserstoffbrückenbindungen möglich. Dies wiederum kann zu einer veränderten Anordnung der Moleküle innerhalb der Lipidschicht führen (121).

Teicoplanin führt mit steigenden Konzentrationen zu einem zunehmenden Funktionsverlust von PA. Bereits eine Beimengung von 5% (w/w) Teicoplanin führte zu einer deutlichen Funktionsverschlechterung von PA 3 mg/ml (s. Abb. 45). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine Arbeiten veröffentlicht im Rahmen derer der Einfluss von Teicoplanin auf Surfactant untersucht wurde. Eine im Jahr 2009 durchgeführte Studie beschreibt jedoch Interaktionen zwischen Oritavancin (ein Vancomycin-Derivat; wie Teicoplanin ein Glykopeptid-AB) und PL-Doppelschichten, u. a. bestehend aus PG und Phosphatidylethanolamin (124). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Oritavancin einen Einfluss auf das physikalisch-chemische Verhalten von PL-Doppelschichten haben könnte. Die Kombination *in vitro* führte u. a. zu einer Neuordnung von PL und einer veränderten Membranpermeabilität. Sowohl die Ausbildung von

Wasserstoffbrückenbindungen als auch die Veränderung der Oberflächenladungen zwischen den PL könnten dabei von Bedeutung sein. Dieselbe Studie zeigte allerdings, dass selbst hohe Konzentrationen von Vancomycin im Vergleich zu Oritavancin einen sehr geringen Einfluss auf die Membranpermeabilität und die Morphologie von PL-Doppelschichten haben. Ob und inwieweit Teicoplanin auf eine ähnliche Weise auf PL-Doppelschichten bzw. PA wirkt, wurde im Rahmen der genannten Arbeit nicht beleuchtet.

Sowohl Gentamicin als auch Moxifloxacin haben in unseren Messungen am PBS keinen relevant negativen Einfluss auf die OFS-reduzierenden Eigenschaften von PA (s. Abb. 43 und 44). Die Arbeitsgruppe rund um van't Veen et al. testete die Wirkung von Tobramycin (wie Gentamicin ein Aminoglykosid-AB) auf ein exogenes bovines Surfactantpräparat (99). Es wurde beobachtet, dass die Kombination von Tobramycin und Surfactant in Kochsalzlösung bei einem pH-Wert von 6,3 zu einer Ausflockung des Gemischs und folglich in Tierversuchen zu einer verminderten Surfactant-Funktion führte. Da bereits Ende der 80er Jahre beschrieben wurde, dass Aminoglykoside an negativ geladene PL binden (125), erfolgte die Lösung von AB und Surfactant erneut in einer basischen Lösung mit Natriumhydrogencarbonat (pH=8,3). Diese Kombination führte weder zu einer Ausflockung noch zu einer Aktivitätsminderung von PA. Diese Ergebnisse sprechen für die Vermutung, dass die Ladungen der PL und/oder des AB eine Rolle bei der Inaktivierung von Surfactant spielen könnten (99). Im Rahmen der von uns durchgeführten PBS-Versuche mit Gentamicin konnten keine Interaktionen dieser Art (z. B. Ausflockung) beobachtet werden. Eine Funktionseinschränkung von PA zeigte sich lediglich bei y_{\min} nach 60 Sekunden durch die Zugabe von 1% (w/w) Gentamicin. Über die fünfminütige Pulsationsdauer nahm die min. OFS aber einen Wert vergleichbar mit der Kontrolle (PA 3 mg/ml) an. Im Weiteren wurden Übereinstimmungen mit den Ergebnissen einer Studie gefunden, die den Einfluss von Gentamicin auf Monoschichten aus DPPC/Phosphatidylserinen (95:5) untersuchte (126). Diese Arbeitsgruppe erkannte, dass die Zugabe von Gentamicin eher zu einer Stabilisierung der PL-Schicht, zu einer effektiveren Adsorption der PL an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche und zu einer verbesserten Spreitung der PL auf der Oberfläche führte. Auch in unseren PBS-Versuchen wurden bei PA-Proben mit Gentamicin teils signifikant niedrigere OFS gemessen als bei PA ohne AB. In Zusammenschau unserer Versuche und bereits bekannten Studien kann angenommen werden, dass Gentamicin die Aktivität von PA nicht verschlechtert.

Hinsichtlich des Einflusses von Moxifloxacin auf PA gibt es bisher keine Untersuchungen. In der Vergangenheit wurde aber der Einfluss anderer Fluorchinolone auf PL untersucht. Levofloxacin beispielsweise hat wie Clarithromycin (ein Makrolid-AB) einen Effekt auf DPPC-Monoschichten (s. o. in diesem Kapitel), ohne deren Stabilität oder Funktionalität zu beeinträchtigen (119). Ebenso ist bekannt, dass Ciprofloxacin mit PL interagiert (127). Dies ist jedoch stark von den Eigenschaften der PL abhängig. Untersuchungen zeigten, dass Ciprofloxacin einen konzentrationsabhängigen Einfluss v. a. auf Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) hat

(Größenzunahme der DPPG-Liposome; Veränderung der Übergangtemperatur, bei der die PL einen flüssig-kristallartigen Zustand annehmen). DPPC hingegen blieb weitgehend unbeeinträchtigt. Dies könnte aus der Tatsache resultieren, dass Ciprofloxacin mit seinem positiv geladenen Piperazin-Ring vorzugsweise an negativ geladene Phosphatgruppen bindet, wie sie bei DPPG, nicht aber bei DPPC (Zwitterion) vorkommen (127). Trotz zusätzlich bestehender hydrophober Wechselwirkungen zwischen Ciprofloxacin und den PL-Doppelschichten und die durch Ciprofloxacin veränderte Anordnung der Acylgruppen in DPPC-Lipidschichten, scheint die Interaktion zwischen diesem AB und den PL überwiegend von der Ladung der PL abzuhängen (127). Falls Moxifloxacin einen zu Ciprofloxacin oder Levofloxacin vergleichbaren Einfluss auf PL hat, könnten zuvor beschriebene Mechanismen eine Theorie darstellen, weshalb das DPPC-reiche PA in unseren PBS-Versuchen selbst durch hohe Moxifloxacin-Konzentrationen kaum beeinflusst wird. Im Rahmen der PBS-Versuche mit Gentamicin und Moxifloxacin fällt auf, dass lediglich bei PA-Proben mit 1% (w/w) Gentamicin bzw. Moxifloxacin und nur nach 60 Sekunden statistisch signifikant höhere y_{\min} - bzw. y_{\max} -Werte gemessen wurden als bei PA-Proben ohne AB (s. Punkt 4.2.3 und 4.2.4). Bei diesen Versuchen fanden sich zum Teil hohe Standardabweichungen. Die genauen Hintergründe, weshalb die OFS-reduzierende Aktivität von PA gerade durch die Beimengung von 1% (w/w) Gentamicin bzw. Moxifloxacin negativer beeinflusst wurde als durch höhere AB-Konzentrationen konnte weder im Rahmen unserer Untersuchungen noch mithilfe der verfügbaren Literatur geklärt werden.

In den PBS-Versuchen standen die AB-Konzentrationen im Verhältnis zur PA-Menge 3 mg/ml, wobei eine maximale AB-Konzentration von 3 mg/ml (100% (w/w)) nicht überschritten wurde. Für eine adäquate antimikrobielle Therapie ist eine ausreichend hohe AB-Konzentration am Infektionsort notwendig, welche für jedes AB abhängig von der MHK individuell bestimmt wird (s. Punkt 3.1.2.5.1). In unseren Versuchen führt die Kombination von Azithromycin, Teicoplanin und Cefotaxim insbesondere bei steigenden Konzentrationen zu einer Funktionsminderung von PA. Ist zur Behandlung einer Infektion eine derart hohe AB-Konzentration notwendig, dass das exogene Surfactant durch die Beimengung des AB seine Funktion bereits vor der Applikation verliert, könnte dies einen limitierenden Faktor für eine Kombinationstherapie darstellen. Im Rahmen des Forschungsprojekts bleibt die Frage offen, ob eine Erhöhung der PA-Konzentration einer Inaktivierung durch bestimmte AB ggf. entgegenwirken könnte. Für andere Zusätze zu PA konnte dies gezeigt werden, z. B. in Untersuchungen mit Surfactant und Mekonium (128). Surfactant schien in höheren Konzentrationen weniger empfindlich gegenüber einer Mekonium-Inaktivierung zu sein als in geringeren Konzentrationen (129). Sollte der Verlust der Surfactantaktivität durch die Beimengung eines AB erst ab einer bestimmten AB-Konzentration einsetzen (s. z. B. Punkt 4.2.2), könnte untersucht werden, ob eine Kombinationstherapie mit diesem AB in geringen Konzentrationen ggf. trotzdem möglich wäre. Dies könnte z. B. im Rahmen von prophylaktischen Therapien oder als additive Therapie in Erwägung gezogen werden.

In einigen Fällen kann bereits die Veränderung von Details ausreichen, um Störfaktoren im Rahmen einer Kombinationstherapie zu umgehen. Ein Beispiel hierfür ist der zuvor beschriebene Versuch mit Surfactant und Tobramycin, bei welchem ein kombiniertes Lösen in NaHCO₃ anstatt in NaCl 0,9% zu guten Ergebnissen führte (99). Eine weitere Möglichkeit, die Inaktivierung von exogenem Surfactant durch andere Arzneimittel zu umgehen, könnte in der Verwendung von synthetischen Surfactant-Präparaten liegen. Sowohl *in vitro* als auch in Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass synthetische Surfactant-Präparate hinsichtlich einer Inaktivierung oftmals unempfindlicher sind als modifiziert natürliche Präparate (43, 64-66).

5.2 *IN VITRO* BAKTERIENHEMMHOFVERSUCHE – DIE LOKALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA MIT UND OHNE PORACTANT ALFA UNTER VERSCHIEDENEN EINFLUSSFAKTOREN

Mit der Entdeckung des Penicillins durch den schottischen Mediziner Alexander Flemming begann 1928 eine neue Ära der Medizin. Der Erfolg einer AB-Therapie ist u. a. von der richtigen Wahl des AB, dessen Dosierung und der Applikationsform abhängig. Auch wenn im Rahmen schwerer bakterieller Infektionen oft eine systemische AB-Therapie erforderlich ist, hat eine lokale AB-Therapie, wenn möglich, gewisse Vorteile (s. Punkt 1.4.2). Da über das Bronchialsystem ein vergleichsweise einfacher Zugangsweg zur Lunge besteht, könnten pulmonale Infektionen lokal (mit-) behandelt werden. Eine inhalative AB-Therapie ist derzeit in der Regel jedoch Patienten mit besonderen chronischen Lungenerkrankungen, wie der CF oder Non-CF-Bronchiektasie vorbehalten (92-94).

Im Rahmen unseres Forschungsprojekts wurde das Ausmaß der lokalen Bakterienhemmung unterschiedlicher Bakterienstämme durch insgesamt fünf AB aus verschiedenen Wirkstoffklassen mit und ohne Zugabe des exogenen Surfactants PA untersucht. Es wurde beobachtet, ob die lokale antimikrobielle Wirkung der AB durch die Beimengung von PA beeinflusst wird und inwieweit steigende AB-Konzentrationen bzw. variierende HV zusätzlich Einfluss auf die Versuchsergebnisse nehmen.

Es ist zu erwähnen, dass sich die Methodik unserer Bakterienhemmhofversuche (s. Punkt 3.1.3) grundlegend von Methodiken unterscheidet, die im Rahmen von EUCAST-standardisierten Empfindlichkeits- bzw. Resistenztestungen angewendet werden (Plättchentest) (130). Die zentrale Fragestellung unserer *in vitro* Untersuchungen war, ob sich PA und verschiedene AB in ihren biophysikalischen bzw. antimikrobiellen Eigenschaften beeinflussen. Frühere Untersuchungen zeigen, dass Surfactant aufgrund seiner einzigartigen biophysikalischen Eigenschaften (Spreitung auf einem wässrigen Flüssigkeitsfilm) sowohl für hydrophobe als auch für hydrophile Arzneimittel/Nanocarrier als Trägerstoff fungieren kann (15, 131, 132). Daher sollte untersucht werden, ob durch AB Bakterienhemmhöfe entstehen und ob deren Größe durch die Kombination mit PA beeinflusst wird. Es standen zu keiner Zeit mikrobiologische Empfindlichkeits- bzw.

Resistenztestungen nach EUCAST-Standard im Vordergrund. Wir orientierten uns bei der Wahl dieser Methodik an Voruntersuchungen aus dem Jahr 2017 (112).

Es besteht die Möglichkeit, dass Nebeneffekte unsere Versuchsergebnisse beeinflussten, die nicht verhindert oder im Rahmen der Auswertungen nicht berücksichtigt werden konnten:

Die Applikation von Surfactant auf eine wässrige Hypophase führt zu einer Reduktion der OFS an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche und folglich zu einer Spreitung des Surfactants (s. Punkt 1.2.2). Wie sich Surfactant durch die Reduktion der OFS jedoch konkret auf die Verteilungsfläche von Volumina auswirkt, wurde nicht untersucht. Zudem ist nicht bekannt, inwiefern die verschiedenen Bakterienstämme und AB Einfluss auf die Verteilungsfläche von Volumina, auf die Reduktion der OFS und auf die Spreitung von Surfactant nehmen.

Wie in Punkt 3.1.4 beschrieben, wurde die Auswertung unserer Versuchsergebnisse mithilfe des Bakterienkoloniezählgerätes *schuett colonyQuant* durchgeführt, das täglich kalibriert wurde und für jeden Versuch abhängig vom Bakterienstamm standardisiert eingestellt wurde. Bakterienwachstum ließ sich aufgrund von Farbunterschieden von Wachstumshemmhöfen unterscheiden. Die Ausmessung der Hemmhoffläche erfolgte, indem an der Grenzzone zwischen Bakterienrasen und Hemmhof manuell eine Linie gezogen wurde (s. Abb. 10). Daraus resultierende Ungenauigkeiten können nicht ausgeschlossen werden. Die Auswertung erfolgte jedoch standardisiert durch ein und dieselbe Person. Zudem stellten teils unscharfe Grenzzonen eine Schwierigkeit im Rahmen der Versuchsauswertungen dar. In diesem Fall wurde bereits vermindertes Bakterienwachstum als Inhibitionszone definiert. Die Linie wurde folglich stets an der Grenze zu flächigem Bakterienwachstum gezogen (s. Punkt 3.1.4). Dabei ist erneut zu erwähnen, dass wir die Versuchsauswertung ebenso wenig wie die Methodik nach dem standardisierten Vorgehen von EUCAST richteten (130, 133).

Da wir die Versuche nach einer 24-stündigen Inkubationszeit auswerteten, besteht die Möglichkeit, dass das Bakterienwachstum in diesem Zeitraum nach einer primären Hemmung am Rande des Hemmhofs wieder zunahm und wir nach 24 Stunden letztendlich nicht die maximal mögliche Bakterienhemmhoffläche auswerteten. Hierfür gab es im Rahmen der Versuchsbeobachtungen jedoch keinen begründeten Verdacht.

In den statistischen Analysen fanden wir zum Teil hohe Standardabweichungen wie in den graphischen Darstellungen der Bakterienhemmhofversuche zu sehen ist (s. Abb. 15 - 39).

5.2.1 POLARITÄT VON ANTIBIOTIKA UND SURFACTANT ALFA: LIPOPHILIE UND HYDROPHILIE

Abhängig von ihrer chemischen Beschaffenheit unterscheiden sich Arzneimittel in ihrer Polarität. Während hydrophile Arzneimittel gut wasserlöslich sind, besitzen lipophile Arzneimittel neben einer guten Gewebe- und Membrangängigkeit eine schlechte Wasserlöslichkeit. Für eine pulmonale Applikation erscheinen hydrophile Arzneimittel zunächst besser geeignet, da sich diese in der wässrigen Hypophase gut lösen könnten. Pulmonales Surfactant, welches sich an der Luft-

Flüssigkeits-Grenzfläche in den Alveolen befindet, ist jedoch lipophil. Da sich lipophile Arzneimittel innerhalb eines lipophilen Milieus gut lösen, scheint Surfactant ein optimales Medium für lipophile Medikamente darzustellen (15, 96). In einer Arbeit aus dem Jahr 2017 beschäftigte sich eine Arbeitsgruppe um Hidalgo et al. mit der Kombination von Surfactant und *Nanocarriern* (15) (zu Deutsch etwa Nanoträger; ein *Nanocarrier* entspricht einem Transportmittel für medizinische Wirkstoffe, dessen Größe im Nanobereich liegt). In Hinblick auf eine kombinierte intratracheale Applikation wurden Interaktionen zwischen Surfactant und *Nanocarriern* mit lipophilen bzw. hydrophilen Eigenschaften untersucht. Es wurde beschrieben, dass lipophile Moleküle mit Surfactant interagieren könnten, indem sie sich in Surfactant-Lipidmonoschichten einlagern (15). Eine Kombination von PA und einem lipophilen AB könnte vermutlich ebenso zu einer Eingliederung von AB-Molekülen in die PA-Lipidschicht führen. Hierfür spricht auch eine erst kürzlich publizierte wissenschaftliche Arbeit von García-Mouton et al., in der gezeigt wurde, dass eine Kombination von pulmonalem Surfactant mit lipophilen antimikrobiellen Peptiden zu einer Eingliederung der Peptide in die Surfactant-Lipidschicht führte und im Folgenden ein Transport der Peptide gemeinsam mit dem Surfactant entlang der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche in die Peripherie problemlos möglich war. Während dessen konnte kein negativer Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants festgestellt werden. Weiter zeigten die Untersuchungen, dass eine dynamische Expansion und Kompression (Imitation von In- und Expiration) zu einer Wiederfreisetzung der Peptide aus der Lipidschicht führte und diese folglich antimikrobiell wirken konnten (132). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Hinblick auf unsere Fragestellung (*Hat das porcine exogene Surfactant PA als möglicher Trägerstoff in vitro einen Effekt auf die lokale Ausbreitung verschiedener Antibiotika?*), scheint es durchaus möglich, dass die Polarität der AB und daraus resultierende Interaktionen mit PA eine tragende Rolle im Rahmen unserer *in vitro* Bakterienhemmhofversuche gespielt haben könnten. Im Hemmhofvergleich der Versuche mit dem lipophilen AB Azithromycin (AB/PA vs. AB; s. Abb. 19, 26, 32 und 38) wird deutlich, dass die Zugabe von 10 mg/ml PA zu Azithromycin 0,001 - 0,5 mg/ml keine signifikant größeren Hemmhöfe zur Folge hat als in Versuchen mit identischen AB-Konzentrationen ohne PA. Andere Beobachtungen konnten bei Versuchen mit einer Azithromycin-Konzentration von 1 mg/ml gemacht werden. Hier zeigt der statistische Vergleich verschiedener Versuche nach Zugabe von 10 mg/ml PA signifikant größere Bakterienhemmhöfe als in Versuchen ohne PA (s. Tabelle 15). Da Azithromycin ein lipophiles AB ist, könnte sich nach Kombination mit PA ein Teil der AB-Moleküle in die PA-Lipidschicht eingelagert haben (s. Arbeiten von Hidalgo et al. (15) und García-Mouton et al. (132)). Weiter kann spekuliert werden, dass die übrigen ungebundenen AB-Moleküle durch den Spreitungseffekt von PA (s. Punkt 5.2.4) und durch Diffusion in die Peripherie gelangten. Im Rahmen der Hemmhofversuche kam es zu keiner zyklischen Kompression des PA-Films, was basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen eine Freisetzung von lipophilen Peptiden aus dem Film unterstützen kann.

Da AB-Moleküle nur in ungebundenem Zustand antimikrobiell wirken können (134) stellt sich die Frage, ob in unseren Hemmhofversuchen die Konzentration antimikrobiell wirkender AB-Moleküle aufgrund einer Eingliederung in die PA-Lipidschicht ggf. verringert wurde. Daraus könnten eine verminderte antimikrobielle Wirkung und folglich kleinere Hemmhöfe resultieren. Da bei einer Azithromycin-Konzentration von 0,001 – 0,5 mg/ml sowohl bei Versuchen mit als auch ohne PA zumindest ähnlich große Hemmhöfe entstanden, kann des weiteren spekuliert werden, ob in unseren Versuchen eine verminderte Konzentration antimikrobiell wirkender AB-Moleküle vielleicht durch eine vermehrte periphere Verteilung der ungebundenen AB-Moleküle durch den PA-Spreitungseffekt ausgeglichen werden konnte. Die Erhöhung der Azithromycin-Konzentration auf 1 mg/ml könnte in den Versuchen zu einer Konzentrationssteigerung ungebundener und folglich antimikrobiell wirkender AB-Moleküle und durch den Spreitungseffekt zu statistisch signifikant größeren Inhibitionszonen geführt haben. Bei der Verwendung lipophiler AB in Kombination mit PA könnten (bei fehlender zyklischer Kompression und Expansion) ggf. also erhöhte Arzneimittelkonzentrationen notwendig sein, um letztendlich trotz möglicher Einlagerung von Molekülen in die Lipidschicht eine ausreichende Konzentration antimikrobiell wirkender Moleküle am Infektionsort zu gewährleisten (bakterienspezifische MHK). Betrachtet man die Versuchsergebnisse der Kontrollversuche, die mit 1 mg/ml Azithromycin und 72 mg/ml PA durchgeführt wurden, ist insbesondere bei Versuchen mit einem HV von 200 µl eine deutliche Größenzunahme der Hemmhofoberflächen im Vergleich zu Versuchen ohne oder mit nur 10 mg/ml PA zu verzeichnen. Tendenziell ähnliche, jedoch weitaus weniger ausgeprägte und folglich oftmals nicht statistisch signifikante Beobachtungen konnten bei Versuchen mit dem ebenso lipophilen Moxifloxacin gemacht werden (s. Abb. 24, 30 und 36). Möglicherweise war die Lösung der lipophilen AB (1 mg/ml) in den Versuchen mit 72 mg/ml PA aufgrund des überaus lipophilen Milieus besser möglich als in Versuchen mit nur 10 mg/ml bzw. ohne PA. Zudem könnte die erhöhte PA-Konzentration einen verstärkten Spreitungseffekt zur Folge gehabt haben, wodurch das AB weiter in die Peripherie verteilt wurde. Bei der Kombination von PA und lipophilen AB scheint neben der AB- auch die PA-Konzentration, v. a. in Kombination mit einem adäquat hohen HV (200 µl; s. Punkt 5.2.5) einen Einfluss auf die Ausbreitung des AB und folglich die Hemmhofgröße zu haben. Eine so deutlich ausgeprägte Größenzunahme der Inhibitionszonen durch eine PA-Konzentration von 72 mg/ml konnte bei Versuchen mit hydrophilen AB nicht beobachtet werden. Dies könnte u. a. auf eine schlechtere Löslichkeit dieser AB in einem stark lipophilen Milieu zurückzuführen sein. Trotzdem führte die Kombination von hydrophilen AB mit PA 10 mg/ml teils zu statistisch signifikant größeren Hemmhofoberflächen als in Versuchen ohne PA. So entstanden in allen Teicoplanin-Versuchen bei einer AB-Konzentration von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml (mit Ausnahme der 100 µl *S. aureus*-Versuche) signifikant größere Hemmhöfe durch die Beimengung von PA (s. Tabelle 15). Auch ein Vergleich der AUC zeigt in allen Teicoplanin-Versuchen (AB/PA vs. AB) signifikante Unterschiede. Dies könnte ggf. auf eine ausgeprägte Verteilung der AB-

Moleküle durch den Marangoni-Effekt zurückzuführen sein (s. Punkt 5.2.4). In der Arbeit von Hidalgo et al. wird beschrieben, dass auch hydrophile *Nanocarrier* mit Surfactantbestandteilen interagieren (15). Dabei kommt es jedoch wahrscheinlich nicht wie bei den lipophilen Molekülen zu einer Einlagerung in die Lipidschicht. In genannter Arbeit wird beschrieben, dass hydrophile Moleküle initial von SP (überwiegend SP-A und SP-D) gebunden und dann von Surfactant-Lipiden umgeben werden und folglich in Vesikeln vorliegen. Auch lipophile Moleküle können in Vesikel, bestehend aus SP und Surfactant-Lipiden, verpackt werden (15). Inwieweit in unseren Versuchen eine Interaktion zwischen PA und hydrophilen AB-Molekülen stattfand, ist unklar, denn SP-A und SP-D sind in PA nicht enthalten. Neben all den positiven Effekten ist dennoch zu erwähnen, dass durch eine direkte Interaktion von Surfactantbestandteilen mit anderen Moleküle, v. a. bei steigenden Konzentrationen, die Gefahr des negativen Einflusses auf die biophysikalischen Surfactant-Eigenschaften zunimmt (15, 132) (s. Punkt 5.1).

Basierend auf den Hinweisen aus der Literatur könnte die Interaktion von Surfactant mit Arzneimittelmolekülen auch eine grundsätzliche Möglichkeit zur systemischen Therapie darstellen. Substanzen könnten entweder eingelagert in die Surfactant-Lipidmonoschichten oder in Vesikeln verpackt im Rahmen der Surfactant-Wiederaufbereitung über Endozytose in die Typ-II-Pneumozyten aufgenommen werden (131). Nicht nur die Arbeiten von Hidalgo et al. sondern auch unsere Versuchsergebnisse lassen vermuten, dass eine Kombination von Surfactant sowohl mit hydrophilen als auch mit lipophilen Arzneimitteln potenziell möglich wäre.

5.2.2 EINFLUSS DER ANTIBIOTIKAKONZENTRATION AUF DIE BAKTERIENHEMMUNG

Die Bakterienhemmhofversuche wurden jeweils mit AB-Konzentrationen von 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 und 1 mg/ml durchgeführt. Diese Konzentrationen liegen meist über den von EUCAST angegebenen individuellen MHKs (s. Punkt 3.1.2.5.1). Prinzipiell ist eine Diffusion von Molekülen, die auf eine Agaroberfläche appliziert wurden in das Nährmedium möglich. So werden z. B. Agar-Gele bei der Methode der Immundiffusion verwendet (135). Sollte ein gewisser Anteil der 10 µl AB- bzw. AB/PA-Probenflüssigkeit nach der Applikation in die Tiefe des Agars diffundiert sein, entsprachen die AB-Konzentrationen während der Inkubationszeit auf der Agaroberfläche (Ort der Bakterienhemmung) ggf. nicht gänzlich den Konzentrationen, die im Vorfeld hergestellt wurden (s. Punkt 3.1.2.5.2). Da lipophile AB unter Umständen stärker Surfactant-assoziiert sind als hydrophile AB (s. Punkt 5.2.1), könnte spekuliert werden, dass bei Versuchen in Kombination mit PA eher hydrophile AB in den Nährboden diffundierten. Dies schließt jedoch eine Diffusion lipophiler AB in den Nährboden nicht aus. Das Ausmaß der Diffusion von AB mit unterschiedlicher Polarität ist vermutlich auch von der Beschaffenheit des Nährbodens abhängig. In welchem Maße die Versuchsergebnisse hierdurch möglicherweise beeinflusst wurden, wurde nicht untersucht. Die Bakterienhemmhofversuche zeigten, dass steigende AB-Konzentrationen zwischen 0,001 und 1 mg/ml mit und ohne PA zu größeren

Inhibitionszonen führen. In der statistischen Analyse erwiesen sich die Größenunterschiede in Abhängigkeit von der steigenden AB-Konzentration in allen Vergleichen als signifikant. Während eine AB-Konzentration von 0,001 mg/ml in keinem unserer Versuche eine Bakterienhemmung zeigte, nahm die Inhibition durch eine steigende AB-Konzentration abhängig vom AB und dem Bakterienstamm in unterschiedlichem Maße zu. Ein Grund für diese Unterschiede könnten die individuellen MHKs für unterschiedliche Bakterienstämme sein. Folglich erschien uns ein Vergleich der Hemmhofgrößen von Versuchen mit unterschiedlichen AB bzw. Bakterienstämmen im Rahmen unseres Projekts nicht sinnvoll. Wie in Punkt 5.2.1 beschrieben wurde, könnte bei einer Kombinationstherapie eine optimale AB-Konzentration ggf. in Abhängigkeit von Arzneimittelinteraktionen variieren. Erhöhte AB-Konzentrationen können in bestimmten Situationen für eine adäquate antimikrobielle Therapie notwendig sein und z. B. durch lokale Anwendungen erzielt werden. Während die antimikrobielle Behandlung von Bakterien innerhalb eines Biofilms im Rahmen einer oralen AB-Therapie beispielsweise oft unzureichend ist, konnte *in vitro* das Wachstum von Biofilm-produzierenden *S. aureus* durch eine hochdosierte topische Moxifloxacin-Behandlung effektiv gehemmt werden (136). Durch eine lokale AB-Therapie besteht also die Möglichkeit, Arzneimitteldosierungen stark zu erhöhen, um deren antimikrobielle Wirkung zu steigern, während die Gefahr Nebenwirkungen zu entwickeln nur bedingt zunimmt. Um zu untersuchen, ob auch in unseren Versuchen eine weitere Steigerung der AB-Konzentration zu einer stärkeren Bakterienhemmung führt, testeten wir zusätzlich das Ausmaß der Bakterienhemmung durch eine lokale AB-Konzentration von 10 mg/ml (ohne PA; Kontrollgruppe). Durch die Konzentrationssteigerung der hydrophilen AB auf 10 mg/ml (ohne PA) konnten nur durch Gentamicin auf *E. coli*-Bakterienrasen (100 µl HV) und durch Teicoplanin auf *S. aureus*- (200 µl) bzw. *GBS-LD*-Bakterienrasen (100 µl) signifikant größere Inhibitionszonen im Vergleich zu Versuchen mit nur 1 mg/ml AB ohne PA induziert werden (s. Abb. 17, 28 und 34). Bei einer Therapie mit Aminoglykosiden ist ein optimaler Therapieerfolg dann gewährleistet, wenn die Serum- bzw. Gewebekonzentration die MHK des jeweiligen Erregers um mindestens das Zehnfache übersteigt (104). Bei der Behandlung einer *E. coli*-Infektion wäre demnach eine Gentamicin-Konzentration von 0,005 mg/ml anzustreben. Wird in Betracht gezogen, dass die Probenflüssigkeit während der Inkubationszeit auf der Agaroberfläche eine niedrigere AB-Konzentration enthielt als die ursprünglich hergestellte (s. o.), könnten die AB-Konzentrationen in unseren Versuchen v. a. mit niedrigeren Gentamicin-Konzentrationen (0,001 mg/ml oder 0,01 mg/ml) für eine optimale lokale Bakterieninhibition letztendlich zu gering gewesen sein. Die gesteigerte Gentamicin-Konzentration auf 10 mg/ml könnte die antimikrobielle Wirkung optimiert haben (s. Abb. 17). In Versuchen mit den lipophilen AB Azithromycin und Moxifloxacin hingegen führte eine AB-Konzentration von 10 mg/ml im Vergleich zu Versuchen mit nur 1 mg/ml AB (je ohne PA) fast immer zu statistisch signifikant größeren Inhibitionszonen (s. Abb. 19, 24, 26, 30, 32, 36 und 38). Ausgenommen hiervon sind lediglich die 200 µl Moxifloxacin-Versuche auf *GBS*-

HD-Bakterienrasen. Insbesondere *in vivo* spielt bei der Wahl der optimalen AB-Konzentration nicht nur die MHK eine Rolle. Auch das Verteilungsvolumen eines AB ist von Bedeutung. Hierbei spielt wiederum die Polarität des Arzneimittels eine Rolle (s. Punkt 5.2.1). Während sich hydrophile Medikamente überwiegend extrazellulär verteilen, erfolgt die Verteilung lipophiler Pharmaka sowohl extra- als auch intrazellulär (102). Das Verteilungsvolumen des lipophilen AB Azithromycin ist mit 25 l/kg KG vergleichsweise hoch. Auch Moxifloxacin hat verglichen zu den von uns verwendeten hydrophilen AB mit 2-4 l/kg KG ein höheres Verteilungsvolumen. Die stärker zunehmenden Hemmhofgrößen bei Azithromycin- und Moxifloxacin-Konzentrationen von 10 mg/ml könnten ggf. mit der ausgeprägten Lipophilie dieser AB und der Notwendigkeit einer adäquat hohen Dosierung in Verbindung stehen.

5.2.3 ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN VON EXOGENEM SURFACTANT

Endogenes Surfactant spielt im Rahmen der pulmonalen Immunabwehr eine wichtige Rolle (s. Punkte 1.1.4). Auch exogenes Surfactant hat einen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien. Während Neumeister et al. (137) und Rauprich et al. (86) hierzu *in vitro* Studien durchführten, untersuchten Herting et al. (89, 90) sowie Sherman et al. (138) verschiedene Surfactantpräparate *in vivo* am Tiermodell. Abhängig vom Bakterienstamm hatte die Beimengung von Surfactant je nach Präparat und Konzentration einen inhibierenden oder proliferierenden Effekt. Einheitliche Versuchsergebnisse konnten weder für modifiziert natürliche noch für synthetische Präparate erzielt werden. Erkenntnisse über die genauen antimikrobiellen Mechanismen von exogenem Surfactant existieren bisher nicht. Über PA ist bekannt, dass es Prophenin enthält. Prophenin ist ein Peptid aus der Gruppe der Defensine und somit Teil der unspezifischen Immunabwehr mit antibakteriellen Eigenschaften (91). Rauprich et al. untersuchten *in vitro* den Einfluss verschiedener Surfactantpräparate in unterschiedlichen Konzentrationen auf vier Bakterienstämme (86). Unter anderem wurde der Einfluss von PA auf das Wachstumsverhalten von *E. coli*, *S. aureus* und *GBS-HD* sowie *GBS-LD* untersucht (s. Abb. 46) (86). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Hinblick auf unsere Ergebnisse der Bakterienhemmhofversuche von besonderem Interesse, da übereinstimmende Bakterienstämme sowie eine identische PA-Konzentration (10 mg/ml) verwendet wurden. Die Anzahl der KBE von *GBS-HD* sowie *GBS-LD* reduzierte sich in dieser Studie durch die Zugabe von PA im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PA (86). Während bei *GBS-LD* erst eine PA-Konzentration von 20 mg/ml zu einem signifikant verminderten Bakterienwachstum führte, genügten bei *GBS-HD* bereits 10 mg/ml. Während die Proliferation von *E. coli* weitgehend unbeeinflusst blieb, hatte die Inkubation von *S. aureus* in PA-Suspensionen nach fünf Stunden eine vermehrte Anzahl an KBE zur Folge als nach der Inkubation ohne PA (86).

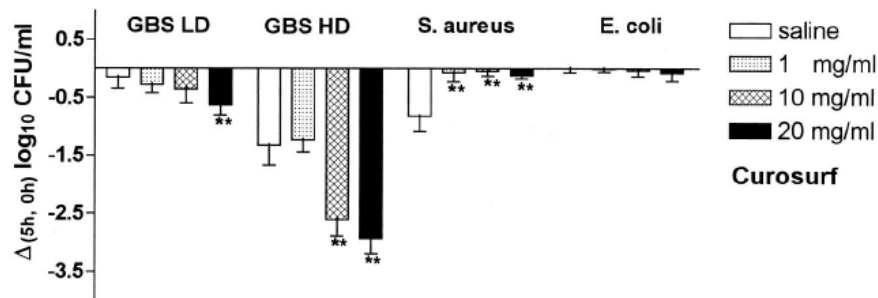


Abbildung 46: Einfluss von Poractant alfa (PA; Curosurf®) auf das *in vitro* Wachstum von *low density* (GBS LD) und *high density* Gruppe-B-Streptokokken (GBS HD), *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) sowie *Escherichia coli* (*E. coli*). 7×10^7 koloniebildende Einheiten (engl.: *colony forming units*; CFU)/ml Bakteriensuspension wurden bei 37°C für 5 Stunden (h) ohne PA (saline, dt.: Kochsalzlösung = Kontrollgruppe) oder mit 1 mg/ml, 10 mg/ml bzw. 20 mg/ml PA inkubiert. Die Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert [$\Delta(5 \text{ h}, 0 \text{ h})$] \log_{10} CFU/ml \pm Standardabweichung aus je sechs Versuchswiederholungen. **: $p < 0,01$; Abbildung aus (86).

In unseren Bakterienhemmhofversuchen führte die kombinierte Applikation von AB und PA im Vergleich zu AB ohne PA teils zu signifikant größeren Hemmhöfen (s. Tabelle 15). Anders als bei Rauprich et al. konnte eine vermehrte Bakterieninhibition in Versuchen mit PA bei allen vier Bakterienstämmen beobachtet werden. Es scheint möglich, dass die teils vermehrte Bakterienhemmung im Rahmen unserer PA-Versuche zumindest teilweise auf eine additive antimikrobielle Wirkung von PA zurückzuführen ist. Da allerdings in einigen Studien beobachtet werden konnte, dass abhängig vom Bakterienstamm das Bakterienwachstum durch PA zunahm (86, 138), ist nicht auszuschließen, dass auch in unseren Versuchen Bakterienwachstum durch PA gefördert wurde. Da dies im Rahmen unseres Projekts nicht gesondert untersucht wurde, kann darüber nur spekuliert werden. Sollte die Proliferation einiger Bakterienstämme durch bestimmte Surfactantpräparate gefördert werden, wäre dies ein deutlicher Nachteil für eine kombinierte AB-Surfactant-Applikation. Der antimikrobielle Effekt der Therapie könnte hingegen gesteigert werden, wenn zusätzlich zum AB auch das Surfactant antiproliferative Eigenschaften hätte. Bei einer ausreichenden Wirkung könnte ggf. sogar eine Reduktion der AB-Konzentration in Betracht gezogen werden, was wiederum einen positiven Effekt auf das Nebenwirkungsprofil sowie die Surfactantinaktivierung haben könnte (s. Punkt 5.1). Dabei ist jedoch zu beachten, dass zu geringe AB-Konzentrationen unter Umständen zu Resistenzentwicklungen führen könnten.

5.2.4 EINFLUSS VON PORACTANT ALFA AUF DIE LOCALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA

Während die Surfactantaktivität durch gewisse AB beeinflusst wird (s. Punkt 5.1), kann auch Surfactant einen Einfluss auf die Wirkung von AB haben. Einerseits wird die antimikrobielle Wirkung gewisser AB durch Surfactant direkt beeinflusst (97, 109, 139-141). Andererseits wird vermutet, dass Surfactant u. a. aufgrund seines besonderen Spreitungseffekts (s. Punkt 1.2.2) Einfluss auf die lokale Ausbreitung und Verteilung der AB nimmt, wodurch deren antimikrobielle Wirkung ggf. lokal beeinflusst werden kann. Die Arbeitsgruppe um Wang et al. untersuchte mithilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera die Folgen der Applikation einer surfactanthaltigen

Lösung auf die Oberfläche eines Flüssigkeitsfilms (142). Die Aufnahmen zeigten, dass sich die Flüssigkeit vom zentralen Surfactant-Applikationsort (Ort der niedrigen OFS, durch Surfactant herbeigeführt) in einer wellenartigen Bewegung zentrifugal (zum Ort der höheren OFS) ausbreitet (s. Abb. 47). Sobald der surfactanthaltige Tropfen mit der Flüssigkeitsoberfläche in Kontakt kommt, türmt sich durch die Veränderung der OFS am Rande des Tropfens eine Art Welle auf (engl.: „Marangoni ridge“; zu Deutsch etwa: Marangoni-Grad). Kleine Partikel, die zuvor auf die Oberfläche der Flüssigkeit gegeben wurden, werden vor dem Marangoni-Grad wie auf einer Welle hergetrieben und so in die Peripherie transportiert. Die Kapillarwellen, die durch den Kontakt zwischen Tropfen und Flüssigkeitsoberfläche entstehen, bewegen sich ebenfalls nach außen, sind aber nicht in der Lage Partikel in die Peripherie zu tragen (142). Nach maximaler Spreitung erfolgt eine weitere, weitaus langsamere Ausbreitung des Surfactants und sonstiger Moleküle durch Diffusion (53).

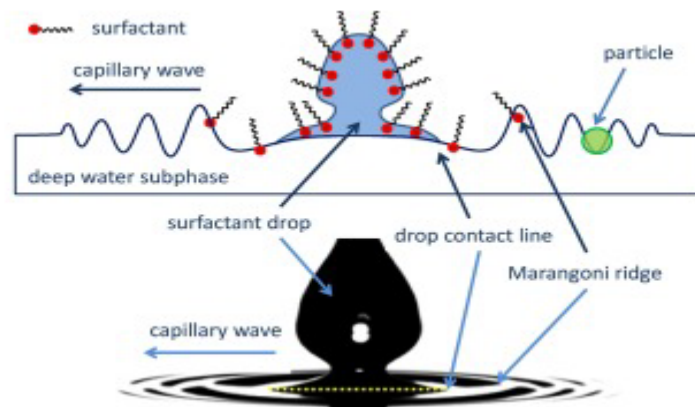


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Effekte, die der Applikation einer surfactanthaltigen Lösung auf die Oberfläche eines Flüssigkeitsfilms folgen: die Kontaktstelle des Tropfens und der Oberfläche (engl.: *drop contact line*) breitet sich in die Peripherie aus, bis sich die beiden Flüssigkeiten vermischt haben. Durch den Kontakt des Tropfens mit der Oberfläche entstehen Kapillarwellen (engl.: *capillary waves*), die sich ebenfalls in die Peripherie ausbreiten. Durch die Veränderung der Oberflächenspannung entsteht an der Flüssigkeitsoberfläche eine Welle (*Marangoni ridge*), die sich ebenfalls in die Peripherie ausbreitet; auf der Oberfläche befindliche Partikel werden durch die Welle nach außen getrieben. Ausbreitungsgeschwindigkeit: *capillary waves* > *Marangoni ridge* > *drop contact line*; nach Wang et al. (142).

Unsere Bakterienhemmhofversuche wurden nach einem ähnlichen Versuchsprinzip durchgeführt wie die Spreitungsversuche von Wang et al. Eine AB- bzw. PA/AB-Suspension wurde auf eine wässrige Hypophase (Bakteriensuspension) appliziert, die zuvor gleichmäßig auf Schafblutagar verteilt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Bakterienhemmhöfe dahingegen beurteilt, ob deren Größe durch PA beeinflusst wurde. Ein Unterschied zwischen unseren Versuchen und denen von Wang et al. besteht darin, dass das AB im Rahmen unseres Vorgehens dem PA vor der Applikation auf die Hypophase selbst beigemischt und nicht wie die Partikel bei Wang et al. vor der Surfactant-Applikation auf die Hypophase gegeben wurden. Es könnte jedoch spekuliert werden, dass nach der Applikation des AB/PA-Gemischs die AB-Moleküle nach demselben Prinzip in die Peripherie verteilt wurden, wie die Partikel auf dem Flüssigkeitsfilm bei Wang et al. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei Versuchen mit PA verglichen zu Versuchen ohne PA (abhängig vom verwendeten AB und dessen Konzentration) oftmals größere Bakterienhemmhöfe entstanden. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass aus den zentral applizierten 10 µl AB ein runder Hemmhof

resultierte (s. Abb. 22 (II)), wohingegen durch das gleichermaßen applizierte AB/PA ein größerer, unförmiger Hemmhof entstand (s. Abb. 22 (I)). Grund für den ungleichmäßigen Hemmhof könnte sein, dass die periphere Ausbreitung der AB-Moleküle durch die PA-Spreitung ungleichmäßig verstärkt wurde. Die lokale antimikrobielle Wirkung nahm folglich jedoch zu. In früheren Untersuchungen, die identisch zu unserem Versuchsprinzip sind, wurde der Einfluss von exogenem Surfactant auf die lokale antimikrobielle Wirkung von Rifamycinen und Polymyxinen untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigen übereinstimmend mit einem Teil unserer Ergebnisse, dass die Beimengung von PA größere Bakterieninhibitionszonen zur Folge hat (112). Es fällt auf, dass die Hemmhofgrößen, abhängig vom Bakterienstamm und AB, durch PA teils in unterschiedlichem Maße beeinflusst wurden. Verschiedene AB interagieren auf unterschiedliche Weise mit PA, wodurch zum einen die PA-Aktivität beeinflusst werden kann (s. Punkt 5.1). In Abhängigkeit der Arzneimittelinteraktionen kann zum anderen auch die Wirkung der AB und folglich ggf. die Hemmhofgrößen beeinflusst werden (s. Punkt 5.2.1). Von Chen et al. wurde beobachtet, dass der Marangoni-Effekt bei verschiedenen Surfactantpräparaten in variabler Intensität auftritt (143). Es ist daher nicht auszuschließen, dass Ergebnisse von Spreitungsversuchen, die nach unserem Versuchsprinzip durchgeführt werden, abhängig vom Surfactantpräparat ggf. unterschiedlich ausfallen könnten.

Bei Bakterienhemmhofversuchen mit Teicoplanin entstanden durch die Beimengung von PA deutlich größere Bakterienhemmhöfe als durch AB alleine (s. z. B. Abb. 21 und 28, Tabelle 15). Interessant ist, dass in den PBS-Versuchen PA am stärksten durch Teicoplanin inaktiviert wurde (s. Punkt 4.2.5). Somit wäre zu erwarten, dass die Kombination von PA und Teicoplanin, insbesondere bei einer steigenden Teicoplanin-Konzentration aufgrund der zunehmenden Inaktivierung zu einem Funktionsverlust des porcinen Surfactants führt und dadurch evtl. auch der Spreitungseffekt vermindert wird. Folglich wären die Hemmhöfe in Versuchen mit PA im Vergleich zu Versuchen ohne PA nicht oder im Falle einer partiellen Inaktivierung ggf. nur wenig vergrößert. Ähnliche Ergebnisse könnten auch bei Versuchen mit Azithromycin erwartet werden (s. Punkt 4.2.1). Im Gegensatz dazu führte jedoch eine Konzentrationssteigerung beider AB (v. a. auf 0,5 mg/ml und 1 mg/ml) in den Versuchen mit PA oft zu signifikant größeren Bakterienhemmhöfen im Vergleich zu Versuchen ohne PA. Eine Theorie zu den Versuchsergebnissen mit Azithromycin wurde in Punkt 5.2.1 diskutiert. Weshalb die Ausbreitung von Teicoplanin und Azithromycin und somit deren antimikrobielle Wirkung durch die Beimengung von PA zunimmt, obwohl die Surfactantaktivität durch dieselben AB offenbar vermindert wird, bleibt unklar. Da in den Bakterienhemmhofversuchen 10 mg/ml PA und in den PBS-Versuchen lediglich 3 mg/ml PA verwendet wurden, kann spekuliert werden, ob PA in den Hemmhofversuchen möglicherweise aufgrund der höheren Konzentration stabiler gegenüber einer Inaktivierung durch diese AB war. Es kann ebenso wenig ausgeschlossen werden, dass PA trotz einer (partiellen) Inaktivierung ggf. als Trägerstoff für AB fungieren könnte.

Van't Veen et al. untersuchten *in vitro* den direkten Einfluss von natürlichem bovinem Surfactant auf die bakterizide Wirkung einiger AB (97). Während Amoxicillin und Ceftazidim unbeeinflusst blieben, wurde die Aktivität von Tobramycin - ein Aminoglykosid - durch die Zugabe des exogenen Surfactants signifikant reduziert. Diese Aktivitätsminderung konnte durch eine Erhöhung der Tobramycinkonzentration jedoch leicht überwunden werden. Die Inaktivierung von Aminoglykosiden wurde bereits früher beschrieben (97). Es wurde beobachtet, dass AB aus dieser Substanzklasse an negativ geladene PL binden (125). Die Arbeitsgruppe rund um van't Veen vermutete daher, dass die AB-Moleküle mit den PL des Surfactants eine Verbindung eingingen und sich die bakterizide Wirkung von Tobramycin aufgrund dessen reduzierte. Des Weiteren ist bekannt, dass die Bioaktivität von Aminoglykosiden stark vom pH-Wert ihrer Umgebung abhängig ist (97, 102). Fällt der pH-Wert unter 7,0, steigt die MHK dieser AB. Für eine suffiziente antimikrobielle Therapie muss die AB-Konzentration in diesem Fall erhöht werden. Es wurde zudem berichtet, dass Aminoglykoside *in vitro* mit ungebundenen Kationen reagieren können (144) und *in vivo* mit Zellbestandteilen sowie anderen Proteinen in Sputum und Bronchialsekret interagieren (145, 146). In einer *in vitro* Studie aus dem Jahr 2019 blieb die bakterizide Wirkung von Gentamicin gegenüber *P. aeruginosa* nach der Kombination mit PA unbeeinträchtigt. Polymyxin E verlor bei identischer Versuchsdurchführung hingegen an bakterizider Wirkung gegenüber *P. aeruginosa* (109). In einer anderen Untersuchung wurde gezeigt, dass sich die antimikrobielle Wirkung von Dapotmycin gegenüber *Streptokokkus pneumoniae* in Kombination mit pulmonalem Surfactant verschlechterte (141). Die Aktivität von Moxifloxacin (139, 140) und Cefepim (ein Cephalosporin der 4. Generation) (147) wurde in der Vergangenheit auch in Zusammenhang mit porcinem Surfactant untersucht. Cefepim verlor an bakterizider Wirkung gegenüber *S. aureus* und *P. aeruginosa*, nachdem das Surfactant hinzugegeben wurde. Die AB-Konzentration musste für eine adäquate Bakterienhemmung erhöht werden. Ebenso musste bei Versuchen mit *S. aureus* die Moxifloxacin-Konzentration nach der Zugabe von PA erhöht werden, um eine adäquate Bakterienhemmung aufrecht zu erhalten. Die bakterizide Wirkung gegenüber *P. aeruginosa* blieb hingegen unbeeinflusst (139). Es scheint u. a. vom Bakterienstamm abhängig zu sein, ob die antimikrobielle Wirkung eines AB nach einer Surfactant-induzierten Aktivitätsminderung für eine adäquate Bakterienhemmung noch ausreichend ist. Dies könnte mit der variierenden MHK eines AB für verschiedene Bakterienstämme in Zusammenhang stehen (s. Punkt 3.1.2.5.1). Ebenso ist nicht auszuschließen, dass die Bioaktivität von Gentamicin und folglich dessen bakterizide Wirkung durch den niedrigen pH-Wert von PA (5,5 – 6,5) wie in Versuchen mit Tobramycin (s. o.) (97) beeinflusst wurde. In Anbetracht der Vorstudien kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch im Rahmen unserer Versuche eine partielle Inaktivierung gewisser AB durch PA stattfand und unsere Versuchsergebnisse hierdurch beeinflusst wurden. Um fundiertere Aussagen über PA-induzierte AB-Inaktivierungen treffen zu können, müsste die

antimikrobielle Wirkung dieser AB in Kombination mit PA im Rahmen von spezifischen Bakterienwachstumsversuchen detailliert untersucht werden.

Auch wenn *in vitro* Untersuchungen vor der klinischen Anwendung einer intratrachealen AB-Surfactant-Kombination zweifellos erforderlich sind, ist eine exakte Vorhersage bzgl. der *in vivo* Surfactant- bzw. AB-Aktivität nach einer Kombination nicht möglich. „Erfolgreiche“ *in vitro* Untersuchungsergebnisse ziehen nicht zwingend ein Therapieversagen *in vivo* nach sich. Beispielsweise wurde der Einfluss von PA auf die antimikrobielle Wirkung von Polymyxin E sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht (109). *In vitro* führte die Beimengung von PA zu einer verminderten bakteriziden Wirkung von Polymyxin E gegenüber *P. aeruginosa*. *In vivo* hatte die kombinierte intratracheale PA/Polymyxin E-Applikation aber eine bessere bakterizide Wirkung zur Folge als Polymyxin E allein. Über ähnliche Ergebnisse berichteten van't Veen et al., die eine intratracheale Kombinationstherapie aus Tobramycin und exogenem Surfactant in *Klebsiella pneumoniae* infizierten Mäusen testeten (95). Auch hier wurde *in vitro* die bakterizide Aktivität des AB durch die Zugabe von exogenem Surfactant vermindert. *In vivo* war im Vergleich (Therapie mit Tobramycin allein, Surfactant allein vs. Tobramycin plus Surfactant) jedoch die Überlebensrate derjenigen Mäuse, die eine Kombination aus Tobramycin und Surfactant erhielten, am höchsten (95).

5.2.5 EINFLUSS DES HYPOPHASENVOLUMENS AUF DIE LOKALE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA MIT UND OHNE PORACTANT ALFA

Im Rahmen unserer Bakterienhemmhofversuche wurde auch der Einfluss des Hypophasenvolumens (100 µl vs. 200 µl) auf das Ausmaß der lokalen antimikrobiellen Wirksamkeit verschiedener AB mit und ohne PA untersucht. Der wässrige Flüssigkeitsfilm (Bakteriensuspension) sollte in den Versuche die alveoläre Hypophase (s. Punkt 1.1.2) imitieren. Die absolute Bakterienmenge war in den Parallelversuchen (100 µl - Bakterienlösung (I) vs. 200 µl - Bakterienlösung (II); s. Punkt 3.1.2.3) identisch.

Innerhalb der 24-stündigen Inkubationszeit entstanden bei identischen AB- bzw. PA-Konzentrationen in allen Versuchsreihen größere Bakterieninhibitionszonen, die mit einem HV von 200 µl (vs. 100 µl) durchgeführt wurden (s. Tabelle 16). Insbesondere bei den höheren AB-Konzentrationen zeigt der statistische Vergleich oft signifikante Unterschiede. Es ist zu betonen, dass dies sowohl bei den Versuchen mit als auch bei den Versuchen ohne PA zu beobachten ist. Bezüglich der Versuche ohne PA vermuten wir, dass sich die AB-Moleküle nach der zentralen Applikation innerhalb der Hypophase v. a. durch Diffusion ausbreiteten (148). Möglicherweise hat die Diffusion der AB-Moleküle innerhalb des erhöhten HV (200 µl) ausgeprägter stattgefunden als auf dem niedrigeren HV (100 µl). Je ausgeprägter die Verteilung der AB-Moleküle ist, desto höher ist vermutlich aber auch ein gewisser Verdünnungseffekt, der je nach Ausmaß zu einer Reduktion der AB-Konzentration geführt haben könnte. Auch wenn die Bakterieninhibition durch eine

stärkere periphere AB-Verteilung lokal erweitert werden könnte, besteht die Gefahr, dass bei geringen AB-Konzentrationen die bakterienspezifische MHK (s. Punkt 3.1.2.5.1) durch den Verdünnungseffekt unterschritten wird und die Bakterienhemmung folglich weniger effizient ist. Dies könnte v. a. dann verstärkt auftreten, wenn die AB-Wirkung durch weitere Faktoren negativ beeinflusst wird (s. Punkt 5.2.1, 5.2.3 und 5.2.4). Hinweise darauf, dass bei einer höheren Hypophase eine gesteigerte AB-Konzentration zu einer effektiveren Bakterieninhibition führen kann, könnten unsere Versuchsergebnisse geben. Betrachtet man die statistische Auswertung der Einzelpunktvergleiche in den 100 μ l- vs. 200 μ l-Versuchen, wird deutlich, dass bei Versuchen mit 200 μ l Hypophase die Bakterienhemmhofgrößen durch 0,5 mg/ml, v. a. aber durch 1 mg/ml stärker zunehmen als in Versuchen mit nur 100 μ l HV. Die Unterschiede sind meist statistisch signifikant (s. Tabelle 16). Dies ist bei Versuchen mit PA, aber ausgeprägter noch bei Versuchen ohne PA zu beobachten. Im Falle einer weniger starken Diffusion bei Versuchen mit 100 μ l HV könnte die Erhöhung der AB-Konzentration v. a. zu höheren Konzentrationen innerhalb der Inhibitionszonen geführt haben. Arbeiten, die *in vitro* den Zusammenhang zwischen der Diffusion von AB-Molekülen und eine daraus resultierende lokale Konzentrationsänderung untersuchten und unsere Hypothese stützen bzw. widerlegen könnten, sind uns aktuell nicht bekannt.

Auch bei den Versuchen mit PA führte die Verwendung von 200 μ l HV zu (teils statistisch signifikant) größeren Inhibitionsflächen. Neben der Diffusion könnte hier, wie in Punkt 5.2.4 bereits diskutiert wurde, die Ausbreitung der AB-Moleküle durch die zusätzliche Applikation von PA positiv beeinflusst worden sein (53, 142). Aufgrund unserer Versuchsergebnisse könnte zunächst vermutet werden, dass die Ausbreitung der AB-Moleküle durch den Marangoni-Effekt (s. Punkt 5.2.4) auf einem erhöhten HV (200 μ l) stärker ausgeprägt ist als auf einem geringeren HV (100 μ l). Kharasch et al. beobachteten im Rahmen einer *in vivo* Studie jedoch, dass der positive Einfluss von Surfactant auf das pulmonale Verteilungsmuster von Pentamidin bei einem geringeren Flüssigkeitsvolumen stärker war als bei einem höheren Volumen (98). Bei Betrachtung der statistischen Analyse unserer Bakterienhemmhofversuche wird deutlich, dass im Vergleich der 100 μ l- und 200 μ l-Versuche weniger statistische Signifikanzen bei Versuchen mit PA auftreten als bei Versuchen ohne PA (s. Tabellen 15 und 16). Berücksichtigt man die Beobachtung von Kharasch et al., könnte spekuliert werden, ob auch in unseren Versuchen der Spreitungseffekt auf 100 μ l HV verhältnismäßig zu einer stärkeren Ausbreitung der AB-Moleküle führte als auf 200 μ l und die Unterschiede zwischen den Hemmhofgrößen (100 μ l vs. 200 μ l) deshalb in Versuchen mit PA seltener signifikant ausfielen als in Versuchen ohne PA. Der Grund, weshalb die Hemmhöfe in den 200 μ l-Versuchen mit PA trotzdem größer ausfielen als die Hemmhöfe auf 100 μ l könnte wie bei Versuchen ohne PA mit der verstärkten Diffusion in einem erhöhten HV zusammenhängen. Wie in Punkt 5.2.1 angesprochen, hatte auch bei den Kontrollversuchen mit 72 mg/ml PA u. a. das HV einen entscheidenden Einfluss auf die Größe der Inhibitionszonen (s. A_{schwarz} in Abb. 24, 26, 32, 36 und 38). Über die Gründe, weshalb bei einer Hypophase von 200 μ l häufiger statistisch signifikante

Unterschiede zwischen Versuchen mit 72 mg/ml PA und Versuchen mit nur 10 mg/ml bzw. ohne PA entstanden als bei einer Hypophase von 100 µl kann nur spekuliert werden. Möglicherweise konnte PA in dieser hohen Konzentration auf einem erhöhten HV besser spreiten, wodurch ggf. auch die AB-Moleküle ausgeprägter in die Peripherie verteilt wurden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Pulmonales Surfactant ist ein Lipoprotein-Komplex, der in den Lungenalveolen vorkommt. Aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaft setzt es die alveoläre Oberflächenspannung (OFS) herab, wodurch ein Kollabieren der Alveolen am Ende der Expiration verhindert wird. Surfactant übernimmt zudem eine wichtige Aufgabe als Teil des angeborenen Immunsystems. Ein endogener Surfactantmangel kann primär aufgrund einer Lungenunreife bestehen oder sekundär durch die Inaktivierung von endogenem Surfactant verursacht werden. Bei Neugeborenen ist die derzeitige Therapie der Wahl eines Surfactantmangels die intratracheale Applikation von exogenem Surfactant. Da ein Surfactantmangel nicht selten mit einer pulmonalen Infektion assoziiert ist, besteht seit längerer Zeit die Idee, beide Erkrankungen mithilfe einer intratrachealen Kombinationstherapie aus exogenem Surfactant und Antibiotika (AB) lokal zu behandeln. Diesen Gedanken aufgegriffen untersuchten wir im Rahmen unseres *in vitro* Projekts, ob das exogene Surfactant Poractant alfa (PA) aufgrund seines einzigartigen Spreitungseffekts als Trägerstoff für verschiedene AB fungieren und die lokale antimikrobielle Wirkung dieser AB folglich erweitert werden kann. Neben dem Einfluss von PA und verschiedenen AB-Konzentrationen untersuchten wir ebenso die Auswirkung der auf die Agaroberfläche applizierten Flüssigkeitsmenge (Hypophasenvolumen) auf das Ausmaß der lokalen antimikrobiellen AB-Wirkung in Zusammenhang mit PA. Im Rahmen von OFS-Messungen am Pulsating Bubble Surfactometer (PBS) wurde außerdem die OFS-reduzierende Aktivität von PA unter dem Einfluss der verschiedenen AB in steigenden Konzentrationen untersucht.

Während Gentamicin und Moxifloxacin im Rahmen unserer Betrachtung keinen negativen Einfluss auf die biophysikalische Aktivität von PA hatten, führte eine Kombination mit Azithromycin, Cefotaxim bzw. Teicoplanin durch individuelle AB-Konzentrationen zu einer partiellen Inaktivierung von PA.

In den Bakterienhemmhofversuchen hatte die Beimengung von PA abhängig von dem verwendeten AB und Bakterienstamm sowohl bei einem HV von 100 µl als auch bei 200 µl teils signifikant größere Inhibitionszonen zur Folge. Der deutlichste Effekt konnte in den Versuchen mit Teicoplanin gefolgt von Versuchen mit Azithromycin erzielt werden. Ebenso führten die Steigerung der AB-Konzentration (0,001 – 1 mg/ml) und die Erhöhung des HV von 100 µl auf 200 µl sowohl bei Versuchen mit als auch bei Versuchen ohne PA zu einer Größenzunahme der Hemmhofflächen. Ein großer Teil unserer *in vitro* Versuchsergebnisse bestätigt somit die Hypothesen, dass durch die Steigerung der AB-Konzentration, durch eine Erhöhung des HV und durch die Zugabe von PA die antimikrobielle Wirksamkeit gewisser AB lokal erweitert werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die biophysikalische Eigenschaft von PA durch bestimmte AB negativ beeinflusst werden kann.

Prospektiv lassen sich aufgrund der stark variierenden Versuchsergebnisse aus unseren Untersuchungen keine generalisierten Aussagen über mögliche Interaktionen zwischen PA und

weiteren AB treffen. Eine individuelle detaillierte Untersuchung einer jeden PA-AB-Kombination wäre im Weiteren notwendig.

7 LITERATUR

1. Heinzmann A (2017) Pneumonie. In: Hentschel R, Jorch G (Hrsg.): Fetoneonatale Lunge. 1. Auflage Georg Thieme Verlag; p. 200.
2. Herting E (2004) Surfactanttherapie neonataler Atemstörungen. Surfactanttherapie bei neonataler Pneumonie. In: Wauer RR (Hrsg.): Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 139-43.
3. Agassandian M, Mallampalli RK (2013) Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1831(3): 612-25.
4. Glasser JR, Mallampalli RK (2012) Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect* 14(1): 17-25.
5. Han S, Mallampalli RK (2015) The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc* 12(5): 765-74.
6. Perez-Gil J (2008) Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1778(7-8): 1676-95.
7. Perez-Gil J, Weaver TE (2010) Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda)* 25(3): 132-41.
8. Griese M (2004) Der gesunde Respirationstrakt - Surfactant. In: Rieger C, Von der Hardt H, Sennhauser FH, Wahn U, Zach MS (Hrsg.): Pädiatrische Pneumologie. 2. Auflage: Springer-Verlag; p. 63-72.
9. Stevens PA (2004) Das Surfactantsystem. In: Wauer RR (Hrsg.): Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 11-27.
10. LeVine AM, Whitsett JA (2001) Pulmonary collectins and innate host defense of the lung. *Microbes Infect* 3(2): 161-6.
11. Hartshorn KL (2010) Role of surfactant protein A and D (SP-A and SP-D) in human antiviral host defense. *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 527-46.
12. Vieira F, Kung JW, Bhatti F (2017) Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins. *Ann Anat* 211: 184-201.
13. Zuo YY, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F (2008) Current perspectives in pulmonary surfactant-inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta* 1778(10): 1947-77.
14. Polin RA, Fox WW, Abman SA (2011) Surfactant. In: Polin RA, Fox WW, Abman SA (Hrsg.): *Fetal and Neonatal Physiologie* 4: Elsevier Saunders; p. 1082-180.
15. Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J (2017) Pulmonary surfactant and nanocarriers: Toxicity versus combined nanomedical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859(9): 1740-8.
16. Orgeig S, Hiemstra PS, Veldhuizen EJ, Casals C, Clark HW, Haczku A, Knudsen L, Possmayer F (2010) Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins. *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl: 43-54.
17. Lopez-Rodriguez E, Pascual A, Arroyo R, Floros J, Perez-Gil J (2016) Human Pulmonary Surfactant Protein SP-A1 Provides Maximal Efficiency of Lung Interfacial Films. *Biophys J* 111(3): 524-36.
18. Carlo WA, Ambalavanan N (2016) The Fetus and the Neonatal Infant. Respiratory Tract Disorders. Respiratory Distress Syndrome. In: Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J, Schor NF (Hrsg.): *Nelson Textbook of Pediatrics*. 1. 20 Elsevier p. 850-8.
19. Silbernagel S, Despopoulos A (2012) Atmung. Oberflächenspannung der Alveolen. In: Silbernagel S, Despopoulos A (Hrsg.): *Taschenatlas Physiologie*. 8. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 124-8.
20. Johansson J, Herting E (2004) Praxis der Surfactanttherapie. Surfactantpräparate und ihre Anwendung. In: Wauer RR (Hrsg.): *Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 48-66.
21. Schwab A (2010) Atmung und Säure-Basen-Haushalt. Atemmechanik. In: Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Klöcker N, et al. (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Physiologie*. 1. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 284-90.

22. Numata M, Mitchell JR, Tipper JL, Brand JD, Trombley JE, Nagashima Y, Kandasamy P, Chu HW, Harrod KS, Voelker DR (2020) Pulmonary surfactant lipids inhibit infections with the pandemic H1N1 influenza virus in several animal models. *J Biol Chem* 295(6): 1704-15.
23. Numata M, Kandasamy P, Nagashima Y, Posey J, Hartshorn K, Woodland D, Voelker DR (2012) Phosphatidylglycerol suppresses influenza A virus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(4): 479-87.
24. Bartmann P (2004) Grundlagen - Immunologie und Inflammation. In: Wauer RR (Hrsg.): *Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 42-5.
25. Mulugeta S, Beers MF (2006) Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect* 8(8): 2317-23.
26. Augusto LA, Li J, Synguelakis M, Johansson J, Chaby R (2002) Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 277(26): 23484-92.
27. Chang HY, Li F, Li FS, Zheng CZ, Lei YZ, Wang J (2016) Genetic Polymorphisms of SP-A, SP-B, and SP-D and Risk of Respiratory Distress Syndrome in Preterm Neonates. *Med Sci Monit* 22: 5091-100.
28. Nkadi PO, Merritt TA, Pillers DA (2009) An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Mol Genet Metab* 97(2): 95-101.
29. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE (2010) Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 61: 105-19.
30. Madsen J, Kliem A, Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U (2000) Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 164(11): 5866-70.
31. Agrawal V, Smart K, Jilling T, Hirsch E (2013) Surfactant protein (SP)-A suppresses preterm delivery and inflammation via TLR2. *PLoS One* 8(5): e63990.
32. Sano H, Kuroki Y (2005) The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol* 42(3): 279-87.
33. Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS (2002) Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 169(7): 3565-73.
34. Kudo K, Sano H, Takahashi H, Kuronuma K, Yokota S, Fujii N, Shimada K, Yano I, Kumazawa Y, Voelker DR, Abe S, Kuroki Y (2004) Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J Immunol* 172(12): 7592-602.
35. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T (2006) Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43(9): 1293-315.
36. Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM (2003) By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115(1): 13-23.
37. Liu Z, Shi Q, Liu J, Abdel-Razek O, Xu Y, Cooney RN, Wang G (2015) Innate Immune Molecule Surfactant Protein D Attenuates Sepsis-induced Acute Pancreatic Injury through Modulating Apoptosis and NF-kappaB-mediated Inflammation. *Sci Rep* 5: 17798.
38. Clark H, Palaniyar N, Strong P, Edmondson J, Hawgood S, Reid KB (2002) Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis in vivo. *J Immunol* 169(6): 2892-9.
39. Clark H, Palaniyar N, Hawgood S, Reid KB (2003) A recombinant fragment of human surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis and pro-inflammatory cytokines in mice developing pulmonary emphysema. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 113-6.
40. Clark H, Reid K (2003) The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema. *Arch Dis Child* 88(11): 981-4.
41. Clark HW (2010) Untapped therapeutic potential of surfactant proteins: is there a case for recombinant SP-D supplementation in neonatal lung disease? *Neonatology* 97(4): 380-7.

42. Casals C (2001) Role of surfactant protein A (SP-A)/lipid interactions for SP-A functions in the lung. *Pediatr Pathol Mol Med* 20(4): 249-68.
43. Herting E, Rauprich P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson J, Robertson B (2001) Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium. *Pediatr Res* 50(1): 44-9.
44. Gortner L, Herting E (2017) Surfactanttherapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener (RDS). AWMF-Leitlinien-Registernummer 024/021. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-0211_S2k_Surfactanttherapie_2017-04_01-abgelaufen.pdf. (Zugriff am 09.03.2018).
45. Sardesai S, Biniwale M, Wertheimer F, Garingo A, Ramanathan R (2017) Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past, present, and future. *Pediatr Res* 81(1-2): 240-8.
46. Polin RA, Carlo WA, Committee on F, Newborn, American Academy of P (2014) Surfactant replacement therapy for preterm and term neonates with respiratory distress. *Pediatrics* 133(1): 156-63.
47. Herting E (2004) Surfactanttherapie neonataler Atemstörungen. Surfactanttherapie beim Mekoniumaspirationssyndrom. In: Wauer RR (Hrsg.): *Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 133-8.
48. Kuzmenko AI, Wu H, Wan S, McCormack FX (2005) Surfactant protein A is a principal and oxidation-sensitive microbial permeabilizing factor in the alveolar lining fluid. *J Biol Chem* 280(27): 25913-9.
49. Herting E, Härtel C, Göpel W (2019) Less invasive surfactant administration (LISA): chances and limitations. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 104(6): F655-F9.
50. Proquitte H, Dushe T, Hammer H, Rudiger M, Schmalisch G, Wauer RR (2007) Observational study to compare the clinical efficacy of the natural surfactants Alveofact and Curosurf in the treatment of respiratory distress syndrome in premature infants. *Respir Med* 101(1): 169-76.
51. Segerer H, van Gelder W, Angenent FW, van Woerkens LJ, Curstedt T, Obladen M, Lachmann B (1993) Pulmonary distribution and efficacy of exogenous surfactant in lung-lavaged rabbits are influenced by the instillation technique. *Pediatr Res* 34(4): 490-4.
52. Pollak A, Hayde M, Salzer HR, Trittenwein G (2000) Der Einsatz von Surfactant in der Neonatologie. In: Kummer F, Konietzko N, Medici TC (Hrsg.): *Pharmakotherapie bronchopulmonaler Erkrankungen*. 1. Auflage: Springer-Verlag; p. 309-24.
53. Koch K, Dew B, Corcoran TE, Przybycien TM, Tilton RD, Garoff S (2011) Surface tension gradient driven spreading on aqueous mucin solutions: a possible route to enhanced pulmonary drug delivery. *Mol Pharm* 8(2): 387-94.
54. Stetten AZ, Iasella SV, Corcoran TE, Garoff S, Przybycien TM, Tilton RD (2018) Surfactant-induced Marangoni transport of lipids and therapeutics within the lung. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 36: 58-69.
55. Ardell S, Pfister RH, Soll R (2015) Animal derived surfactant extract versus protein free synthetic surfactant for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 8: CD000144.
56. Sweet DG, Turner MA, Stranak Z, Plavka R, Clarke P, Stenson BJ, Singer D, Goelz R, Fabbri L, Varoli G, Piccinno A, Santoro D, Speer CP (2017) A first-in-human clinical study of a new SP-B and SP-C enriched synthetic surfactant (CHF5633) in preterm babies with respiratory distress syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 102(6): F497-F503.
57. Soll RF, Blanco F (2001) Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD000144.
58. Moya FR, Gadzinowski J, Bancalari E, Salinas V, Kopelman B, Bancalari A, Kornacka MK, Merritt TA, Segal R, Schaber CJ, Tsai H, Massaro J, d'Agostino R, International Surfaxin Collaborative Study G (2005) A multicenter, randomized, masked, comparison trial of lucinactant, colfosceril palmitate, and beractant for the prevention of respiratory distress syndrome among very preterm infants. *Pediatrics* 115(4): 1018-29.
59. Pfister RH, Soll R, Wiswell TE (2009) Protein-containing synthetic surfactant versus protein-free synthetic surfactant for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD006180.

60. Cochrane CG, Revak SD, Merritt TA, Heldt GP, Hallman M, Cunningham MD, Easa D, Pramanik A, Edwards DK, Alberts MS (1996) The efficacy and safety of KL4-surfactant in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 153(1): 404-10.
61. Pfister RH, Soll RF, Wiswell T (2007) Protein containing synthetic surfactant versus animal derived surfactant extract for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD006069.
62. Sinha SK, Lacaze-Masmonteil T, Valls i Soler A, Wiswell TE, Gadzinowski J, Hajdu J, Bernstein G, Sanchez-Luna M, Segal R, Schaber CJ, Massaro J, d'Agostino R, Surfaxin Therapy Against Respiratory Distress Syndrome Collaborative G (2005) A multicenter, randomized, controlled trial of lucinactant versus poractant alfa among very premature infants at high risk for respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 115(4): 1030-8.
63. Spragg RG (2002) The future of surfactant therapy for patients with acute lung injury - new requirements and new surfactants. *Biol Neonate* 81 Suppl 1: 20-4.
64. Echaide M, Autilio C, Lopez-Rodriguez E, Cruz A, Perez-Gil J (2020) In Vitro Functional and Structural Characterization of A Synthetic Clinical Pulmonary Surfactant with Enhanced Resistance to Inhibition. *Sci Rep* 10(1): 1385.
65. Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, Perez-Gil J, Bianco F, Garzia R, Razzetti R, Kramer BW (2012) New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One* 7(10): e47631.
66. Walther FJ, Hernandez-Juviel JM, Gordon LM, Waring AJ (2014) Synthetic surfactant containing SP-B and SP-C mimics is superior to single-peptide formulations in rabbits with chemical acute lung injury. *PeerJ* 2: e393.
67. Mingarro I, Lukovic D, Vilar M, Perez-Gil J (2008) Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends. *Curr Med Chem* 15(4): 393-403.
68. Jeon GW (2019) Surfactant preparations for preterm infants with respiratory distress syndrome: past, present, and future. *Korean J Pediatr* 62(5): 155-61.
69. Jeon GW, Oh M, Sin JB (2015) Efficacy of surfactant-TA, calfactant and poractant alfa for preterm infants with respiratory distress syndrome: a retrospective study. *Yonsei Med J* 56(2): 433-9.
70. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL (1996) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 129(1): 63-71.
71. Wauer RR (2004) Surfactanttherapie neonataler Atemstörungen. Epidemiologie neonataler respiratorischer Erkrankungen. Pneumonie. In: Wauer RR (Hrsg.): Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 92-4.
72. Chan GJ, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE (2015) Prevalence of early-onset neonatal infection among newborns of mothers with bacterial infection or colonization: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 15: 118.
73. Berger R, Abele H, Bahlmann F, Bedei I, Doubek K, Felderhoff-Müser U, Fluhr H, Garnier Y, Grylak-Barschlin S, Hanns H, Herting E, Hoopmann M, Hösli I, Hoyme U, Jendreich A, Krentel H, Kuon R, Lütje W, Mader S, Maul H, Mendling W, Mitschdörfer B, Nicin T, Nothacker M, Olbertz D, Rath W, Roll C, Schlembach D, Schleußner E, Schütz F, Seifert-Klauss V, Steppat S, Surbek D (2019) Prävention und Therapie der Frühgeburtlichkeit. AWMF-Leitlinien-Registernummer 015/025. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-025k_S2k_Praevention-Therapie_Fruehgeburt_2019-08-verlaengert.pdf. (Zugriff am 19.05.2020).
74. Peng CC, Chang JH, Lin HY, Cheng PJ, Su BH (2018) Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol* 59(3): 231-7.
75. Gingelmaier A, Genzel-Boroviczény O (2013) Peripartale Infektionen. Amnioninfektionssyndrom. In: Friese K, Mylonas I, Schulze A (Hrsg.):

- Infektionserkrankungen der Schwangeren und des Neugeborenen. 3. Auflage: Springer-Verlag; p. 595-602.
76. Zemlin M, Berger A, Franz A, Gille C, Härtel C, Küster H, Müller A, Pohlandt F, Simon A, Merz W (2019) Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. AWMF-Leitlinien-Registernummer 024/008. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-008l_S2k_Bakterielle_Infektionen_Neugeborene_2021-03.pdf. (Zugriff am 12.08.2020).
 77. Vogel M (2004) Surfactanttherapie neonataler Atemstörungen. Pathomorphologie respiratorischer Erkrankungen. Amnioninfektionssyndrom - Perinatalpneumonie - Neugeborenensepsis. In: Wauer RR (Hrsg.): Surfactanttherapie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie. 3. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 103-4.
 78. Herting E, Härtel C, Franz A, Kehl S, Gille C, Doubek K, Spellerberg B, Maier RF, Vetter K, Eglin K (2016) Prophylaxe der Neugeborenensepsis - frühe Form - durch Streptokokken der Gruppe B. AWMF-Leitlinien-Registernummer 024/020. https://gnpi.de/wp-content/uploads/2020/07/024-020l_S2k_Prophylaxe_Neugeborenensepsis_Streptokokken_2016-04.pdf. (Zugriff am 19.05.2020).
 79. Lachenauer CS, Wessels MR (2016) Infectious Diseases. Group B Streptococcus. In: Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J, Schor NF (Hrsg.): Nelson Textbook of Pediatrics. 1. 20: Elsevier; p. 1337-41.
 80. Stoll BJ, Shane AL (2016) The Fetus and the Neonatal Infant. Infections of the Neonatal Infant. Epidemiology of Early- and Late-Onset Neonatal Infections. In: Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J, Schor NF (Hrsg.): Nelson Textbook of Pediatrics. 1. 20: Elsevier; p. 912-4.
 81. Tesini BL (2018) Sepsis bei Neugeborenen. MSD Manual. Ausgabe für medizinische Fachkreise. <https://www.msmanuals.com/de-de/profi/pädiatrie/infektionen-des-neugeborenen/sepsis-bei-neugeborenen>. (Zugriff am 09.06.2020).
 82. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD (2014) Early-onset neonatal sepsis. Clin Microbiol Rev 27(1): 21-47.
 83. Gastmeier P (2017) Surveillance von nosokomialen Infektionen, multiresistenten Erregern und Antibiotika-Anwendungen bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1.500g. Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin. https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/neo/NEOKISS_Protokoll_Sep_2018.pdf. (Zugriff am 04.05.2020).
 84. Tesini BL (2018) Pneumonie bei Neugeborenen. MSD Manual. Ausgabe für medizinische Fachkreise. <https://www.msmanuals.com/de-de/profi/pädiatrie/infektionen-des-neugeborenen/pneumonie-bei-neugeborenen>. (Zugriff am 09.06.2020).
 85. Herting E, Gefeller O, Land M, van Sonderen L, Harms K, Robertson B (2000) Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the Collaborative European Multicenter Study Group. Pediatrics 106(5): 957-64.
 86. Rauprich P, Moller O, Walter G, Herting E, Robertson B (2000) Influence of modified natural or synthetic surfactant preparations on growth of bacteria causing infections in the neonatal period. Clin Diagn Lab Immunol 7(5): 817-22.
 87. Song GW, Robertson B, Curstedt T, Gan XZ, Huang WX (1996) Surfactant treatment in experimental Escherichia coli pneumonia. Acta Anaesthesiol Scand 40(9): 1154-60.
 88. Van't Veen A, Gommers D, Verbrugge SJ, Wollmer P, Mouton JW, Kooij PP, Lachmann B (1999) Lung clearance of intratracheally instilled 99mTc-tobramycin using pulmonary surfactant as vehicle. Br J Pharmacol 126(5): 1091-6.
 89. Herting E, Sun B, Jarstrand C, Curstedt T, Robertson B (1997) Surfactant improves lung function and mitigates bacterial growth in immature ventilated rabbits with experimentally induced neonatal group B streptococcal pneumonia. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 76(1): F3-8.
 90. Herting E, Jarstrand C, Rasool O, Curstedt T, Sun B, Robertson B (1994) Experimental neonatal group B streptococcal pneumonia: effect of a modified porcine surfactant on bacterial proliferation in ventilated near-term rabbits. Pediatr Res 36(6): 784-91.

91. Wang Y, Griffiths WJ, Curstedt T, Johansson J (1999) Porcine pulmonary surfactant preparations contain the antibacterial peptide prophenin and a C-terminal 18-residue fragment thereof. *FEBS Lett* 460(2): 257-62.
92. Schwarz C, Duisberg U, Bend J, Schulte-Hubbert B, van Koningsbruggen-Rietschel S (2017) Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, Modul 2: Diagnostik und Therapie bei der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. AWMF-Leitlinien-Registernummer 020-018. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-018l_S3_Mukoviszidose_Modul_2_2017-08-01.pdf. (Zugriff am 03.06.2020).
93. Flick H, Meilinger M, Wagner M, Olschewski H, Eber E (2014) Inhalative Antibiotikatherapie bei Non-CF-Bronchiektasen *Pneumologie* 11: 323-9.
94. Flick H, Schmidt I (2013) Inhalative Antibiotika zur Therapie von Pseudomonasinfektionen bei Non-CF Bronchiektasen. Österreichische Gesellschaft für Pneumologie. https://www.ogp.at/media/publikationen/Pocketguides/Inhalative_Antibiotika.pdf. (Zugriff am 04.04.2018).
95. van't Veen A, Mouton JW, Gommers D, Lachmann B (1996) Pulmonary surfactant as vehicle for intratracheally instilled tobramycin in mice infected with *Klebsiella pneumoniae*. *Br J Pharmacol* 119(6): 1145-8.
96. Haitisma JJ, Lachmann U, Lachmann B (2001) Exogenous surfactant as a drug delivery agent. *Adv Drug Deliv Rev* 47(2-3): 197-207.
97. van 't Veen A, Mouton JW, Gommers D, Kluytmans JA, Dekkers P, Lachmann B (1995) Influence of pulmonary surfactant on in vitro bactericidal activities of amoxicillin, ceftazidime, and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 39(2): 329-33.
98. Kharasch VS, Sweeney TD, Fredberg J, Lehr J, Damokosh AI, Avery ME, Brain JD (1991) Pulmonary surfactant as a vehicle for intratracheal delivery of technetium sulfur colloid and pentamidine in hamster lungs. *Am Rev Respir Dis* 144(4): 909-13.
99. van 't Veen A, Gommers D, Mouton JW, Kluytmans JA, Krijt EJ, Lachmann B (1996) Exogenous pulmonary surfactant as a drug delivering agent: influence of antibiotics on surfactant activity. *Br J Pharmacol* 118(3): 593-8.
100. Zheng J, Zhang G, Lu Y, Fang F, He J, Li N, Talbi A, Zhang Y, Tang Y, Zhu J, Chen X (2010) Effect of pulmonary surfactant and phospholipid hexadecanol tyloxapol on recombinant human-insulin absorption from intratracheally administered dry powders in diabetic rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58(12): 1612-6.
101. Bakheit AH, Al-Hadiya BM, Abd-Elgalil AA (2014) Azithromycin. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 39: 1-40.
102. Bodmann KF, Grabein B, Kresken M, Derendorf H, Stahlmann R, Ott SR, Olzowy B, Eckmann C, Wagenlehner F, Sunderkötter C, Vossen MG, Dohmen PM, Shah PM, Mutters R, Walger P, Wilke M (2019) Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. AWMF-Leitlinien-Registernummer 082-006. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08-verlaengert.pdf. (Zugriff am 13.12.2021).
103. Nitschke M, Sayk F, Hartel C, Roseland RT, Hauswaldt S, Steinhoff J, Fellermann K, Derad I, Wellhoner P, Buning J, Tiemer B, Katalinic A, Rupp J, Lehnert H, Solbach W, Knobloch JK (2012) Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* 307(10): 1046-52.
104. EUCAST (2021) Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 11.0. <http://www.eucast.org>. (Zugriff am 05.12.2021).
105. Bush K, Bradford PA (2016) beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(8).
106. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6).
107. Mustaev A, Malik M, Zhao X, Kurepina N, Luan G, Oppegard LM, Hiasa H, Marks KR, Kerns RJ, Berger JM, Drlica K (2014) Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: two modes of drug binding. *J Biol Chem* 289(18): 12300-12.

108. Economou NJ, Zentner IJ, Lazo E, Jakoncic J, Stojanoff V, Weeks SD, Grasty KC, Cocklin S, Loll PJ (2013) Structure of the complex between teicoplanin and a bacterial cell-wall peptide: use of a carrier-protein approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69(Pt 4): 520-33.
109. Basabe-Burgos O, Zebialowicz J, Stichtenoth G, Curstedt T, Bergman P, Johansson J, Rising A (2019) Natural Derived Surfactant Preparation As a Carrier of Polymyxin E for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in a Near-Term Rabbit Model. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 32(2): 110-8.
110. Cummings JJ, Gerday E, Minton S, Katheria A, Albert G, Flores-Torres J, Famuyide M, Lampland A, Guthrie S, Kuehn D, Weitkamp JH, Fort P, Abu Jawdeh EG, Ryan RM, Martin GC, Swanson JR, Mulrooney N, Eyal F, Gerstmann D, Kumar P, Wilding GE, Egan EA, Aero-02 Study I (2020) Aerosolized Calfactant for Newborns With Respiratory Distress: A Randomized Trial. *Pediatrics* 146(5).
111. Sood BG, Cortez J, Kolli M, Sharma A, Delaney-Black V, Chen X (2019) Aerosolized surfactant in neonatal respiratory distress syndrome: Phase I study. *Early Hum Dev* 134: 19-25.
112. Stichtenoth G (2017) Pulmonales Surfactant als Träger für topische Antiinfektiva. *Med. Habil. Schr. Lübeck*.
113. Taisova AS, Korolev NP, Griaznova NS, Zinchenko E, Lesovaia ZI (1989) [Effect of beta-lactam antibiotics on lipid bilayer membranes. II. Cephalosporin antibiotics]. *Antibiot Khimioter* 34(7): 504-10.
114. Krieg B (1999) Aminosäuren/Peptide/Proteine. Protolysegleichgewicht/Puffereigenschaften. In: Krieg B (Hrsg.): *Chemie für Mediziner*. 6. Auflage: Walter de Gruyter; p. 341-4.
115. Tausch HW, Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Alonso C, Zasadzinski JA (2005) Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental. *Biophys J* 89(3): 1769-79.
116. Zuo YY, Alolabi H, Shafiei A, Kang N, Policova Z, Cox PN, Acosta E, Hair ML, Neumann AW (2006) Chitosan enhances the in vitro surface activity of dilute lung surfactant preparations and resists albumin-induced inactivation. *Pediatr Res* 60(2): 125-30.
117. Kang N, Policova Z, Bankian G, Hair ML, Zuo YY, Neumann AW, Acosta EJ (2008) Interaction between chitosan and bovine lung extract surfactants. *Biochim Biophys Acta* 1778(1): 291-302.
118. Berquand A, Fa N, Dufrêne YF, Mingeot-Leclercq M-P (2005) Interaction of the Macrolide Antibiotic Azithromycin with Lipid Bilayers: Effect on Membrane Organization, Fluidity, and Permeability. *Pharm Res* 22: 465-75.
119. Ortiz-Collazos S, Picciani PHS, Oliveira ON, Jr., Pimentel AS, Edler KJ (2019) Influence of levofloxacin and clarithromycin on the structure of DPPC monolayers. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861(10): 182994.
120. Wächter M (2012) Stoffspezifische Konstanten/Stoffeigenschaften In: Wächter M (Hrsg.): *Tabellenbuch der Chemie: Daten zur Analytik, Laborpraxis und Theorie*. 1. Auflage: Wiley-VCH; p. 8-14.
121. Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, Holopainen J, Karttunen M (2006) Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 90(4): 1121-35.
122. McClenahan JB, Mussenden R, Ohlsen JD (1969) Effect of ethanol on surfactant of ventilated lungs. *J Appl Physiol* 27(1): 90-5.
123. Komatsu H, Okada S (1997) Effects of ethanol on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol mixed liposomal membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 85(1): 67-74.
124. Domenech O, Francius G, Tulkens PM, Van Bambeke F, Dufrêne Y, Mingeot-Leclercq M-P (2009) Interactions of oritavacin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788(9): 1832-40.

125. Mingeot-Leclercq M-P, Laurent G, Tulkens PM (1988) Biochemical mechanism of aminoglycoside induced inhibition of phosphatidylcholine hydrolysis by lysosomal phospholipases *Biochemical Pharmacology* 37(4): 591-9.
126. Georgiev GD, Georgiev GA, Lalchev Z (2010) Interaction of gentamicin with phosphatidylserine/phosphatidylcholine mixtures in adsorption monolayers and thin liquid films: morphology and thermodynamic properties. *Eur Biophys J* 39: 1301-12.
127. Bensikaddour H, Snoussi K, Lins L, Van Bambeke F, Tulkens PM, Brasseur R, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq M-P (2008) Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPG: Fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and ³¹P NMR spectroscopies and conformational analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 17778(11): 2535-43.
128. Sun B, Herting E, Curstedt T, Robertson B (1994) Exogenous surfactant improves lung compliance and oxygenation in adult rats with meconium aspiration. *J Appl Physiol* (1985) 77(4): 1961-71.
129. Sun B, Curstedt T, Robertson B (1993) Surfactant inhibition in experimental meconium aspiration. *Acta Paediatr* 82(2): 182-9.
130. EUCAST (2023) EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; updated Januar 2023. Version 11.0. www.eucast.org. (Zugriff am 08.02.2023).
131. Hidalgo A, Cruz A, Perez-Gil J (2015) Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 95(Pt A): 117-27.
132. Garcia-Mouton C, Parra-Ortiz E, Malmsten M, Cruz A, Perez-Gil J (2022) Pulmonary surfactant and drug delivery: Vehiculization of a tryptophan-tagged antimicrobial peptide over the air-liquid interfacial highway. *Eur J Pharm Biopharm* 180: 33-47.
133. EUCAST (2023) Reading guide - EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 10.0. www.eucast.org. (Zugriff am 08.02.2023).
134. Levison ME, Levison JH (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am* 23(4): 791-815.
135. Bourgeois MA, Oaks JL (2014) Laboratory Diagnosis of Viral Infections. In: Sellon DC, Long MT (Hrsg.): *Equine Infectious Diseases*. 2. Auflage Elsevier; p. 132-40.
136. Desrosiers M, Bendouah Z, Barbeau J (2007) Effectiveness of Topical Antibiotics on *Staphylococcus Aureus* Biofilm in Vitro. *American Journal of Rhinology* 21(2): 149-53.
137. Neumeister B, Woerndle S, Bartmann P (1996) Effects of different surfactant preparations on bacterial growth in vitro. *Biol Neonate* 70(2): 128-34.
138. Sherman MP, Campbell LA, Merritt TA, Long WA, Gunkel JH, Curstedt T, Robertson B (1994) Effect of different surfactants on pulmonary group B streptococcal infection in premature rabbits. *J Pediatr* 125(6 Pt 1): 939-47.
139. Schwameis R, Strommer S, Zeitlinger M, Sauermann R (2012) Does pulmonary surfactant generally affect antimicrobial activity? *BMC Pharmacol Toxicol* 13 Suppl 1: A62.
140. Schwameis R, Erdogan-Yildirim Z, Manafi M, Zeitlinger MA, Strommer S, Sauermann R (2013) Effect of pulmonary surfactant on antimicrobial activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 57(10): 5151-4.
141. Silverman JA, Mortin LI, Vanpraagh AD, Li T, Alder J (2005) Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis* 191(12): 2149-52.
142. Wang X, Bonaccorso E, Venzmer J, Garoff S (2015) Deposition of drops containing surfactants on liquid pools: Movement of the contact line, Marangoni ridge, capillary waves and interfacial particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 486: 53-9.
143. Chen CM, Chang CH, Chao CH, Wang MH, Yeh TF (2019) Biophysical and chemical stability of surfactant/budesonide and the pulmonary distribution following intra-tracheal administration. *Drug Deliv* 26(1): 604-11.
144. Kenny MA, Pollock HM, Minshew BH, Casillas E, Schoenknecht FD (1980) Cation components of Mueller-Hinton agar affecting testing of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 17(1): 55-62.

145. Mendelman PM, Smith AL, Levy J, Weber A, Ramsey B, Davis RL (1985) Aminoglycoside penetration, inactivation, and efficacy in cystic fibrosis sputum. *Am Rev Respir Dis* 132(4): 761-5.
146. Potter JL, Matthews LW, Spector S, Lemm J (1965) Complex formation between basic antibiotics and deoxyribonucleic acid in human pulmonary secretions. *Pediatrics* 36(5): 714-20.
147. Birkun A (2014) Exogenous pulmonary surfactant as a vehicle for antimicrobials: assessment of surfactant-antibacterial interactions in vitro. *Scientifica (Cairo)* 2014: 930318.
148. Silbernagel S, Despopoulos A (2012) Grundlagen, Zellphysiologie. Passiver Transport durch Diffusion. In: Silbernagel S, Despopoulos A (Hrsg.): *Taschenatlas Physiologie*. 8. Auflage: Georg Thieme Verlag; p. 20-3.

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med., PhD Guido Stichtenoth und Herrn Prof. Dr. med. Egbert Herting bedanken, durch die mir dieses Forschungsprojekt an der Universität zu Lübeck ermöglicht wurde. Guido, der erst mein Interesse für dieses Thema weckte, stand zu jeder Zeit tatkräftig für Rückfragen zur Verfügung und motivierte mich mit jedem Treffen und jedem Gespräch auf ein Neues. Vielen Dank für deine Hilfe, deine Geduld und die Möglichkeit, dieses Forschungsprojekt bei euch durchführen zu können!

Während meiner Zeit im Labor unterstützte mich Gabriele Walter in jeglicher Hinsicht. Als MTA arbeitete sie mich zunächst in die spezifischen Techniken ein, griff mir bei Problemen oder Komplikationen während dieser Zeit unter die Arme und stand auch lange danach noch mit ihrer stetigen und bedingungslosen Hilfsbereitschaft hinter mir. Vielen Dank liebe Gabi, ohne dich wäre das Ganze nicht möglich gewesen!

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Familie, die mich die gesamte Zeit über unterstützte und um einen guten Rat nie verlegen war: danke an meine Eltern, meine Schwester Elisabeth und Timo sowie meinen Freund Luca für ihre Geduld und ihr Verständnis dafür, dass sie insbesondere letzten Sommer während der Verschriftlichung der Arbeit einige Zeit auf mich verzichten mussten; danke an meine Schwester Julia und meinen Schwager Raik, die mir bei statistischen Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite standen und danke an Jan und Fanny für die Unterstützung bei technischen Fragen, die bei der Anfertigung einiger Illustrationen auftraten.

Zuletzt noch ein Dankeschön an meine Freunde, vor allem an Lena und Julia, die mich immer wieder ermutigten und an Marinus, der meinen etwas in die Jahre gekommenen Computer bei technischen Problemen stets wieder auf Vordermann brachte.