



Universitätsklinikum Carl Gustav Carus



Abschlussbericht "PhaGePII (4/20)"

<u>Thema:</u>

Bakteriophagen als wirksame Alternative zu Antibiotika zur Behandlung periimplantärer Infektionen

Antragsteller:

Prof. Dr. med. Klaus-Peter Günther Dr.-Ing. Corina Vater Dr. med. Henriette Bretschneider

UniversitätsCentrum für Orthopädie, Unfall- und Plastische Chirurgie Medizinische Fakultät der TU Dresden

> <u>Projektlaufzeit:</u> 01.01.2021 – 30.06.2023

Abkürzungsverzeichnis

Alg	Alginat
β-ΤCΡ	beta-Tricalciumphosphat
E. coli	Escherichia coli
FCS	engl.: fetal calf serum, bovines Kälberserum
Fg1	1 mg/mL Fibrinogen
Fg10	10 mg/mL Fibrinogen
hP	humanes Plasma
Koll1	Kollagen 1
Lap	Laponit
LB	Kulturmedium für <i>E. coli K12</i>
MC	Methylcellulose
МСМ	engl.: mineralized collagen matrix, mineralisiertes Kollagen
Mg	Magnesium
MTT	Farbstoff zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDLLA	Poly(D,L)laktid
PDLLA:CC	Poly(D,L)laktid + Calciumcarbonat
PEEK	Polyetheretherketon
PFU	engl.: plaque forming units
PLLA-PGA	Poly(L)laktid-Polyglykolid
PII	periimplantäre Infektion
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. capitis	Staphylococcus capitis
Stabw	Standardabweichung
Ті	Titan
TSB	Kulturmedium für S. capitis
UHMW-PE	ultra-hochmolekulares Polyethylen

Abschlussbericht "PhaGePII"

Bakteriophagen als wirksame Alternative zu Antibiotika zur Behandlung periimplantärer Infektionen

Ziel des vorliegenden Projektes ist es, die Wirksamkeit von Bakteriophagen im Vergleich zur Antibiotikatherapie am Beispiel von periimplantären Infektionen miteinander zu vergleichen sowie neue Phagen-basierte Behandlungsstrategien für die Therapie periimplantärer Infektionen zu entwickeln. Das Projekt gliedert sich dabei in 3 Arbeitspakete:

- (1) Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Simulation einer periimplantären Infektion
- (2) Untersuchung des Freisetzungsverhaltens und der antibakteriellen Wirksamkeit von Phagen und/oder Antibiotika in unterschiedlichen Applikationsformen
- (3) erfolgreiche Behandlung einer periimplantären Infektion mit Biofilmbildung mittels Phagen und Antibiotika am *in vitro*-Modell

Nachfolgend werden die bisher (Stand 08/2023) erzielten Ergebnisse gegliedert nach den einzelnen Arbeitspaketen aufgeführt.

AP 1				
Etablierung eines <i>in vitro</i> -Modells zur Simulation einer periimplantären Infektion (PII)				
Ziele:	 Erzeugung von Biofilmen auf verschiedenen Biomaterialien Erzeugung eines Biofilms im Rattenfemur (Modell PII) 			

Erzeugung von Biofilmen auf verschiedenen Biomaterialien

Hinsichtlich der Biofilmbildung wurden als Modellorganismen der Stamm *Escherichia coli K12 (E. coli)* und *Staphylococcus capitis (S. capitis)* untersucht. In einem ersten Versuch wurden die beiden Stämme in unterschiedlichen Ausgangsmengen (10 μ L, 20 μ L) in unterschiedlich vorbehandelte Wells einer Zellkulturplatte (unbehandelt, Vorinkubation mit humanem Serum bzw. Vollblut) überführt und für 1, 4 und 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Anschließend erfolgte die Färbung des gebildeten Biofilms mittels des Farbstoffs Kristallviolett, der an die Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand bindet (**Abb. 1, Abb. 2**).

Es zeigte sich, dass die Biofilmbildung in Polystyrol-Zellkulturplatten sowohl mit steigender Inkubationszeit zunimmt als auch unabhängig von der initialen Bakterienmenge und der Art der Vorbehandlung ist. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass *S. capitis* im Vergleich zu *E. coli* ein höheres Potential zur Biofilmbildung besitzt.



Abb. 1: Biofilmbildung durch *E. coli* in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 und 20 µL) und in unterschiedlich vorbehandelten 96-well Zellkulturplatten (unbehandelt und vorinkubiert mit Humanserum bzw. Vollblut) über 1, 4 und 7 Tage. Detektion des Biofilms mittels Kristallviolett (violette Färbung).



Abb. 2: Biofilmbildung durch *S. capitis* in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 und 20 µL) und in unterschiedlich vorbehandelten 96-well Zellkulturplatten (unbehandelt und vorinkubiert mit Humanserum bzw. Vollblut) über 1, 4 und 7 Tage. Detektion des Biofilms mittels Kristallviolett (violette Färbung).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde anschließend die Biofilmbildung durch *S. capitis* auf unterschiedlichen Implantatmaterialien über einen Inkubationszeitraum von 9 Tagen untersucht. Dafür wurden folgende Materialien verwendet:

• Titanlegierung

Metalle:

- Magnesiumlegierung
- Stahl
- Poly(D,L)laktid (PDLLA)

Polymere:

- PDLLA + Calciumcarbonat (PDLLA:CC)
- Poly(L)laktid-Polyglykolid (PLLA-PGA)
- Polyetheretherketon (PEEK)

Kunststoffs	 ultra-hochmolekulares Polyethylen (UHMW-P 	ΥE)
Runsisione.	 Polystyrol (Kontrolle) 	

Nach Ende der Kultivierungszeit wurde eine Lebend-/Totfärbung durchgeführt, bei der unter dem Fluoreszenzmikroskop lebende Bakterien grün und tote Bakterien rot erscheinen (**Abb. 3**).



Abb. 3: Biofilmbildung durch *S. capitis* auf verschiedenen Bio- bzw. Implantatmaterialien über 9 Tage. Detektion des Biofilms mittels Fluoreszenz-Lebend-/Totfärbung (lebende Zellen: grün, tote Zellen: rot; Ti: Titan, PDLLA: Poly(D,L)laktid; PDLLA:CC: Poly(D,L)laktid + Calciumcarbonat, PLLA-PGA:

Poly(L)laktid-Polyglykolid, UHMW-PE: ultra-hoch molekulares Polyethylen, PEEK: Polyetheretherketon, PEEK + CaP: Polyetheretherketon + Calciumphosphat, Mg: Magnesium).

Analog zum ersten Versuch zeigte sich auf Polystyrol ein ausgeprägter Biofilm, der in dieser Stärke auf keinem der Implantatmaterialien nachweisbar war. Hier war die bakterielle Besiedlung auf den PEEK-Proben am geringsten, gefolgt von der Titanlegierung, den Polylaktid-basierten Polymeren (PDLLA, PDLLA:CC, PLLA-PGA) und dem Polyethylen. Die meisten Bakterien fanden sich auf den Magnesiumlegierungen sowie der Stahlschraube.

In einem zweiten Versuch zur Biofilmbildung in Polystyrol-Zellkulturplatten wurden zur Vorbehandlung der Wells fötales Kälberserum (FCS), humanes Plasma (hP), 1 und 10 mg/mL Fibrinogen (Fg1 und Fg10) sowie 1 mg/mL Kollagen 1 (Koll1) verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation mit den genannten Lösungen wurde die jeweilige Bakteriensuspension (*E. coli K12* bzw. *S. capitis*) zugegeben und für weitere 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung des gebildeten Biofilms mittels Kristallviolett, der sowohl qualitativ (**Abb. 4**) als auch semiquantitativ (**Abb. 5**) analysiert wurde.



Abb. 4: Biofilmbildung durch *E. coli* und *S. capitis* in unterschiedlich vorbehandelten 96-well Zellkulturplatten (ohne Vorbehandlung (ohne) sowie mit fötalem Kälberserum (FCS), humanem Plasma (hP), 1 und 10 mg/mL Fibrinogen (Fg1 und Fg10) und Kollagen 1 (Koll1) vorinkubiert) über 7 Tage. Detektion des Biofilms mittels Kristallviolett (violette Färbung).



Abb. 5: Einfluss der Vorbehandlung (ohne, hP: humanes Plasam, FCS: fötales Kälberserum, Fg1: 1 mg/mL Fibrinogen, Fg10: 10 mg/mL Fibrinogen, Koll1: 1 mg/mL Kollagen 1) auf die Biofilmintensität. Detektion des Biofilms mittels Kristallviolett mit anschließender spektrophotometrischer Vermessung des herausgelösten Farbstoffes.

Während bei *E. coli K12* die Intensität des Biofilms infolge Vorbehandlung mit 1 mg/mL Kollagen 1 am höchsten war, war dies bei *S. capitis* durch Vorbehandlung mit 10 mg/mL Fibrinogen der Fall. Da *S. capitis* ein stärkerer Biofilmbildner als *E. coli K12* ist, wurde der nachfolgend dargestellte Versuch zur Biofilmbildung auf verschiedenen Implantantoberflächen nur mit *S. capitis* durchgeführt. Hierzu wurden die auch schon im ersten Versuch verwendeten Materialien (Ti-Legierung, PDLLA, PDLLA:CC, PDLLA-PGA, UHMW-PE, PEEK, PEEK+CaP, Mg-Legierung, Mg-Legierung oxidiert) sowie zusätzlich noch β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und mineralisiertes Kollagen (MCM) für 24 h mit und ohne 1 mg/mL Fibrinogen inkubiert und anschließend mit *S. capitis* besiedelt. Nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen erfolgte eine Lebend-/Totfärbung (**Abb. 6**).





Abb. 6: Biofilmbildung durch *S. capitis* auf verschiedenen Bio- bzw. Implantatmaterialien, die mit oder ohne 1 mg/mL Fibrinogen vorbehandelt wurden, über 7 Tage. Detektion des Biofilms mittels Fluoreszenz-Lebend-/Totfärbung (lebende Zellen: grün, tote Zellen: rot; Ti: Titan, PDLLA: Poly(D,L)laktid; PDLLA:CC: Poly(D,L)laktid + Calciumcarbonat, PLLA-PGA: Po-ly(L)laktid-Polyglykolid, UHMW-PE: ultra-hoch molekulares Polyethylen, PEEK: Polyetheretherketon, PEEK + CaP: Polyetheretherketon + Calciumphosphat, Mg: Magnesium, β -TCP: β -Tricalciumphosphat, MCM: mineralisiertes Kollagen).

Bei diesem Versuch förderte die Vorbehandlung mit Fibrinogen vor allem auf Polyethylen (UHMW-PE), β -Tricalciumphosphat (β -TCP), mineralisiertem Kollagen (MCM) sowie der Magnesiumlegierung die Biofilmbildung durch *S. capitis*.

Erzeugung eines Biofilms im Rattenfemur (Modell PII)

Um eine periimplantäre Infektion zu simulieren, wurden frisch explantierte Rattenfemora mit einer Markbohrung versehen in die mittels Pipette *S. capitis* inokuliert wurde. Danach wurde als Implantatersatz entweder eine Stahlschraube oder ein Edelstahldraht eingeführt (**Abb. 7**). Die so hergestellten Proben wurden anschließend in mit Medium gefüllte Zellkulturröhrchen überführt und für 1 bzw. 4 Wochen bei 37 °C kultiviert.



Abb. 7: Versuchsaufbau zur Simulation einer periimplantären Infektion im Rattenfemur.

Mittels Dünnschliff-Technik konnten von den Knochen histologische Präparate hergestellt werden (**Abb. 8**), deren Anfertigung jedoch sehr aufwändig und zeitintensiv war. Auch konnten mittels spezifischer Färbung (GRAM-Färbung) die inokulierten Bakterien nicht bzw. nicht eindeutig nachgewiesen werden (Problem: Verlust der Bakterien durch verschiedene Wasch- und Färbeschritte bei der histologischen Aufarbeitung).



Abb. 8: Histologische Dünnschliffe von Rattenfemora mit "Implantat" Edelstahldraht (A) oder Stahlschraube (B) im Markraum.

Um das Problem der histologischen Aufarbeitung zu umgehen, wurden in einem nächsten Versuch nur *S. capitis* in den Markraum von sterilisierten/bakterienfreien Rattenfemora inokuliert, 14 Tage kultiviert, die Femora anschließend mittels Säge geteilt und die Schnittflächen mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt (**Abb. 9**).



Abb. 9: Rattenfemora, die mit und ohne *S. capitis* für 14 Tage kultiviert, anschließend längs entlang des Markraums mittels Säge geteilt und die Schnittfläche mittels Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wurden (grün: lebende Zellen/DNA, rot: tote Zellen, blau: Autofluoreszenz des Knochens).

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind nicht bakterienspezifisch, sondern färben jedwede Art von DNA an. Da die Rattenfemora auch nach der Sterilisation noch Ratten-DNA enthalten, konnte die Bakterien-DNA nicht eindeutig von der Ratten-DNA des Knochens unterschieden werden.

Aufgrund der aufwändigen histologischen Aufarbeitung, der begrenzten Verfügbarkeit der Femora sowie der nicht eindeutigen Identifikation der Bakterien im Knochen, ist das PII-Modell "Rattenfemur" für die Testung vieler Varianten/Proben nicht geeignet.

Als Alternative wurden daher Formkörper/Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen (MCM) verwendet. Diese sind in ausreichenden Mengen und verschiedenen Formen herstellbar, enthalten keine Fremd-DNA, entsprechend in ihrer Struktur der Knochenspongiosa und eignen sich auch für die Testung vieler Proben. Die histologische Aufarbeitung ist mit diesen Materialien ebenso möglich wie diverse andere Färbungen.

Mittels MTT-Färbung können metabolisch aktive (lebende) Zellen bzw. Bakterien optisch sichtbar gemacht werden. Diese Färbemethode wurde auf mit *S. capitis*-besiedelte MCM-Scaffolds angewendet, womit Scaffolds ohne und mit Bakterien zweifelsfrei unterschieden werden konnten (**Abb. 10**).



Abb. 10: Mineralisiertes Kollagen als Alternative zu Rattenfemora zur Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Simulation einer periimplantären Infektion.

Wie in **Abb. 6** gezeigt, lässt sich die Biofilmbildung auf/in MCM-Scaffolds durch Vorbehandlung mit Fibrinogen auch noch intensivieren.

AP 2				
Untersuchung verschiedener Phagen-/Antibiotika-Applikationsformen				
Ziele:	 Funktionalisierung von Biomaterialien mit Phagen und/oder Antibiotika Untersuchung der Freisetzung und der antibakteriellen Wirksamkeit 			

Für die Beladung von Biomaterialien mit Phagen ist es wichtig zu wissen, wie hoch deren Infektionspotential ist. Die Anzahl von infektiösen Phagen in einer Lösung wird als *"plaque forming units"* (PFU) angegeben.

Nach Bindung eines Phagen an seinen spezifischen bakteriellen Wirt erfolgt die Injektion des Phagen-Genoms in die Bakterienzelle. Dort wird dann der Stoffwechsel der Wirtszellen auf die Produktion von Phagenbauteilen umgestellt, die zu neuen Phagen zusammengesetzt werden. Durch verschiedene Enzyme und den steigenden Innendruck infolge der neu synthetisierten Phagen platzt die Bakterienzelle schließlich (Lyse) und eine Vielzahl von Phagen wird in das umgebende Medium abgegeben wo sie dann wieder andere Zellen befallen können. Nachweisen lässt sich diese Lyse der Bakterien durch Messung der optischen Dichte (bei Lyse Abfall der optischen Dichte, \rightarrow Wachstumskurven) oder bei Kultur auf Nährböden durch die Bildung von transparenten Plaques. Über die Testung verschiedener Phagenverdünnungen und Auszählen der gebildeten Plaques kann somit der Phagentiter (PFU/mL) bestimmt werden (\rightarrow Plaque-Assay).

Phagencharakterisierung & - isolation

Für den im Projekt eingesetzten Bakterienstamm *E. coli K12* sind mehrere unterschiedliche entsprechende Phagen kommerziell erhältlich. Verwendet wurden für die Beladungs- und Freisetzungsversuche zum einen T4-Phagen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, DSM# 4505, Braunschweig, Deutschland) sowie ein Mix unterschiedlicher Phagen (Pyo bacteriophage Mix, Eliava Biopreparations, Tiflis, Georgien), der auch gegen *E. coli* wirksam ist. Auch für *S. capitis* konnte von der DSMZ ein entsprechender Phage bezogen werden (DSM# 108069), der jedoch schon nach kurzer Lagerung rapide an Aktivität verlor und damit für die im Projekt geplanten Versuche nicht verwendbar war. Aus diesem Grund wurden *S. capitis*-spezifische Phagen direkt von Probanden selbst isoliert.

S. capitis kommt auf der menschlichen Haut sowie in der Nasenschleimhaut vor und co-existiert im Allgemeinen auch immer mit seinen spezifischen Phagen. Zur Isolation der Phagen wurden daher mit Phagenpuffer getränkte, sterile Wattestäbchen über die Gesichtshaut von Probanden bewegt und anschließend in 1 mL Phagenpuffer resuspendiert. Die so erhaltene Lösung wurde dann mittels 0,2 µm-Filter steril filtriert, um eventuell enthaltene Bakterien zu entfernen. Die Phagenvermehrung erfolgte mittels "double-layer-agar"(dla)-Methode mit anschließender Vermehrung in Flüssigkultur mit *S. capitis*. Von 2 der untersuchten 6 Probanden konnten erfolgreich *S. capitis*-spezifische Phagen isoliert werden (**Abb. 11**), wobei Phagen des Probanden #1 Plaques mit einer klar abgegrenzten Morphologie induzierten. Aufgrund dessen, ihrer guten Lagerstabilität sowie des höheren Titers wurden diese Phagen ("pSc_SD") dann für die geplanten Versuche verwendet.



Abb. 11: Isolierung S. capitis-spezifischer Phagen von der Haut von Probanden.

Funktionalisierung von Biomaterialien mit Phagen und/oder Antibiotika & Untersuchung der Freisetzung und der antibakteriellen Wirksamkeit

In Kooperation mit dem Universitätsklinikum Regensburg wurde in einem ersten Versuch zur Beladung von Biomaterialien mit Phagen ein Alginat-basiertes Hydrogel verwendet, welches mit *Staphylococcus aureus (S. aureus)*-spezifischen Phagen (2·10⁹ PFU/mL) funktionalisiert wurde. Dazu wurden verschiedene Formulierungen eines in unserem Labor etablierten Hydrogels auf Alginatbasis hergestellt, mit unterschiedlichen Mengen an Phagen gemischt und mittels 3D-Druck strangförmige Proben hergestellt. Die nachfolgende **Tab. 1** und **Abb. 12** geben einen Überblick über die verwendeten Hydrogelvarianten und den Versuchsaufbau.

Hydrogelbasis	Bezeichnung	Gel-Zusammensetzung (5 mL)	
PBS	PBS + Phagen	PBS + 3 % Alginat + 9 % Methylcellulose + 500 µL Phagenlösung (1 ⋅ 10 ⁹ PFU)	
	PBS + Phagen + Laponit	PBS + 3 % Alginat + 6 % Methylcellulose + 3 % Laponit + 500 μL Phagenlösung (1·10 ⁹ PFU)	
H ₂ O	H ₂ O + Phagen	H ₂ O + 3 % Alginat + 9 % Methylcellulose + 500 μL Phagenlösung (1 · 10 ⁹ PFU)	
	H ₂ O + Phagen + Laponit	H ₂ O + 3 % Alginat + 6 % Methylcellulose + 3 % Laponit + 500 μL Phagenlösung (1·10 ⁹ PFU)	
	Phagenlösung	Phagenlösung (1·10 ¹⁰ PFU) + 3 % Alginat + 9 % Methylcellulose	
Phagenlösung	Phagenlösung + Laponit	Phagenlösung (1 · 10 ¹⁰ PFU) + 3 % Alginat + 6 % Methylcellulose + 3 % Laponit	

 Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Hydrogele

Diese Proben wurden anschließend für bis zu 4 Tagen in Wasser bei 37 °C inkubiert und die Überstände dann für einen Plaque-Assay (Inkubation für 24 h bei 37 °C) und eine Wachstumskurvenanalyse (50 μ L Überstand mit Phagen + 200 μ L Bakterienlösung, Inkubation für 16 h bei 37 °C) verwendet (**Abb. 12**).



Abb. 12: Versuchsaufbau zur Beladung von Alginat-basierten Hydrogelen mit und ohne Zusatz von Laponit mit *S. aureus*-spezifischen Phagen (Alg: Alginat, MC: Methylcellulose, Lap: Laponit)

Nach 1-tägiger Inkubation der Proben in Wasser zeigte sich in der Wachstumskurvenanalyse, dass die Laponit-haltigen Proben nur zu einer nennenswerten Lyse der Bakterien führten (Abb. 13, obere Reihe). Dabei begann die Lyse aufgrund der 10x höheren Phagenkonzentration bei den auf Phagenlösung basierenden Gelen eher als bei den auf PBS und Wasser basierenden Hydrogelen. Nach 4-tägiger Inkubation der Proben konnten infolge der akkumulierten Freisetzung anhand der Wachstumskurvenanalyse infektiöse (= freigesetzte) Phagen in allen getesteten Hydrogelvarianten nachgewiesen werden (Abb. 13, untere Reihe). Laponit-haltige Gele auf H₂O- und PBS-Basis induzierten dabei ebenfalls wieder eine stärke Reduktion der Bakterien als Laponit-freie Gele. Bei den Phagenlösungbasierten Gelen hatte der Zusatz von Laponit hingegen kaum noch einen Effekt. Auch die initiale Phagenkonzentration, mit der die Gele beladen wurden, spielte nach 4 Tagen bei den Proben mit Laponit nur noch eine kleine Rolle.



Abb. 13: Wachstumskurven von *S. aureus* nach Zugabe der verschiedenen Hydrogel-Überstände nach 1- und 4-tägiger Inkubation der Hydrogelproben in Wasser bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente *S. aureus* ohne Phagen, als Negativkontrolle bakterien- und phagenfreies Medium.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch den Plague-Assay, wo nach 1-tägiger Inkubation durch die Laponit-haltigen Proben mehr und größere Plaques entstanden 14). als bei den Laponit-freien Gelen (Abb. Während bei der Wachstumskurvenanalyse keine Unterschiede zwischen Wasser- und PBS-basierten Laponit-haltigen Gelen nachweisbar waren, konnten im Plaque-Assay bei PBS deutlich mehr Plaques detektiert werden als bei H2O. Die Laponit-freien Gele setzten ebenfalls infektiöse Phagen frei, wobei die Anzahl an Plaques bei den PBS- und Phagenlösung-basierten Gelen sehr viel höher war als bei den H₂O-basierten Gelen. Nach 4-tägiger Inkubation konnten im Vergleich zur 1-tägigen Inkubation deutlich mehr Plagues für die Phagenlösung-basierten Proben ohne Laponit detektiert werden. Bei den Gelen auf H₂O- und PBS-Basis ohne Laponit erschienen in Übereinstimmung mit den Wachstumskurven kaum Plagues auf der Platte. Bei PBS- und Phagenlösungbasierten Gelen mit Laponit war der Lyse-Effekt nach 4-tägiger Inkubation stärker als nach 1-tägiger Inkubation.



Abb. 14: Plaque-Assay, wobei 50 µL der jeweiligen Hydrogel-Überstände (Inkubation in Wasser für 1 bzw. 4 Tage) mit S. aureus in Softagar gemischt, in Petrischalen gegossen und für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden (transparente Bereiche im Agar = Plaques = lysierte Bakterien).

In 2 weiteren Versuchen wurden verschiedene, klinisch relevante Biomaterialien mit Phagen beladen und deren Freisetzung sowie antibakterielle Wirksamkeit anhand von Wachstumskurven und eines Spot-Plaque-Assays untersucht (**Abb. 15**).



Abb. 15: Versuchsaufbau zur Beladung verschiedener Biomaterialien mit Phagen und anschließende Analysemethoden.

Die nachfolgende Tab. 2 gibt einen Überblick über die verwendeten Biomaterialien, Phagen & Inkubationsbedingungen.

Tab. 2: Übersicht über die in den Freisetzungsversuchen verwendeten Biomaterialien und Phagen (MBG: mesoporöses Bioglas, MCM: mineralisiertes Kollagen, β-TCP: β-Tricalciumphosphat, T4 & Pyo-Mix: *E. coli*-spezifische Phagen, pSc_SD: *S. capitis*-spezifische Phagen, d: Tage, HPLM: *human plasma like medium*).

Biomaterial	Phage	Versuchs- dauer	Bedingungen	Freisetzungs- medium
Bioglas (MBG)	T4 & Pyo-Mix	44 d	37 °C, statisch	Puffer
mineralisiertes Kollagen (MCM)	T4 % pSp SD	28 d	37 °C, statisch	HPLM
β-Tricalciumphosphat (β-TCP)				
Kollagenschwamm (Lyostypt)				
Fibringel				

Bioaktive Gläser sind Feststoffe in Pulverform, die typischerweise aus den Elementen Kalzium, Silizium, Phosphor und Sauerstoff zusammengesetzt sind und dabei vielfältig modifiziert werden können (z. B. mit Strontium, Kupfer, Bor, Magnesium). Sie zersetzen sich *in vivo* rasch chemisch und setzen dabei Ionen frei. Gleichzeitig bildet sich auf der Oberfläche Hydroxylapatit, was mit dem umliegenden Gewebe eine feste chemische Bindung eingeht und zu einer hohen Bioaktivität führt. Durch Verwendung von Opfermaterialien im Herstellungsprozess, die am Ende wieder entfernt werden, kann gezielt eine hoch poröse, geordnete Struktur – mesoporöses Glas (MBG) – erreicht werden. Die dadurch entstehende große spezifische Oberfläche (100-700 m²/g) verbessert nicht nur die Degradation des Materials, sondern kann auch als Trägersystem für Proteine, Wachstumsfaktoren oder Medikamente etc. verwendet werden.

Im Rahmen des Projektes wurden 20 mg MBG für 6 Stunden mit je 500 μ L T4- bzw. Pyo-Mix-Phagen beladen (rotierende Inkubation bei 4 °C) und anschließend für bis zu 44 Tage bei 37 °C in 1 mL Phagenpuffer inkubiert. An bestimmten Zeitpunkten wurde der Puffer ausgetauscht und der alte Puffer auf das Vorhandensein von Phagen hin analysiert.

Infektiöse T4- und Pyo-Mix-Phagen konnten mittels Spot-Plaque-Assay bis zum Tag 44 nachgewiesen werden, wobei die Anzahl sichtbarer Plaques aufgrund des höheren Titers bei den T4-Phagen hier gegenüber den Pyo-Mix-Phagen deutlich erhöht war (**Abb. 16**).



Abb. 16: Spot-Plaque-Assay mit aus mesoporösem Bioglas (MBG) über 44 Tage freigesetzten *E. coli*spezifischen Phagen (transparente Bereiche = durch Phagen abgetötete/lysierte Bakterien; in den Bildern anhand der weißlichen Färbung erkennbar).

Die Wachstumskurvenanalytik zeigte, dass beide Phagenarten nach 12-stündiger Inkubation das Wachstum von *E. coli K12* sehr deutlich um 43-87 % verringerten (**Abb. 17**).



Abb. 17: Anzahl an *E. coli K12* nach 12-stündiger Inkubation mit Überständen von T4- bzw. Pyo-Mix-Phagen-beladenen MBG-Proben (n = 1).

Im zweiten Versuch wurden bereits im klinischen Alltag eingesetzte Bio- bzw. Implantatmaterialien mit Phagen beladen, die spezifisch gegen den gramnegativen Erreger *E. coli K12* (T4-Phagen) sowie gegen den grampositiven Keim *S. capitis* (pSc_SD-Phagen) wirken. Die Titer beider Phagenarten waren mit 2·10¹⁰ PFU/mL für die T4-Phagen und 2·10¹² PFU/mL für die pSc_SD-Phagen sehr hoch.

Die Phagen-beladenen Proben wurden für 28 Tage bei 37 °C in *human plasma like medium* (HPLM) inkubiert, welches in seiner chemischen Zusammensetzung humanes Plasma imitiert. Wie im Versuch mit MBG wurde das Medium zu bestimmten Zeitpunkten gewechselt und das alte Medium auf das Vorhandensein von Phagen hin analysiert. Direkt nach der Beladung und ggf. Trocknung der Proben wurden diese kurz mit HPLM gewaschen, was dem Zeitpunkt "d0" entspricht.

Mineralisiertes Kollagen (MCM) entspricht in seiner chemischen Zusammensetzung der des Knochens und kann in diversen Formen synthetisch durch Gefriertrocknung hergestellt werden (vgl. **Abb. 10**). Im trockenen Zustand kann MCM flüssige Lösungen

wie ein Schwamm aufnehmen und ist dann flexibel z. B. an unterschiedliche Defektgeometrien anpassbar.

Für den Versuch wurden die MCM-Proben (Zylinder mit h = 12 mm und Ø 6 mm) mit jeweils 300 μ L Phagenlösung beladen und dann über Nacht unter sterilen Bedingungen im Luftstrom getrocknet.

Während mittels Spot-Plaque-Assay T4-Phagen bis Tag 24 nachweisbar waren, waren *S. capitis*-spezifische Phagen nur bis Tag 3 detektierbar (**Abb. 18**).



Abb. 18: Spot-Plaque-Assay mit aus mineralisiertem Kollagen (MCM) über 28 Tage freigesetzten *E. coli-* & *S. capitis*-spezifischen Phagen (transparente Bereiche = durch Phagen abgetötete/lysierte Bakterien).

Dieser Trend wurde durch die Wachstumskurvenanalytik bestätigt: Während T4-Phagen das Wachstum von *E. coli K12* während der gesamten Inkubationszeit um mindestens 50 % verringerten, konnten das pSc_SD-Phagen gegenüber *S. capitis* nur bis zum Tag 3 (**Abb. 19**). Nach 3 Tagen wurden keine Phagen mehr in den Überstand freigesetzt, was sich in einer fehlenden Wachstumsverringerung von *S. capitis* widerspiegelt.



Abb. 19: Anzahl an *E. coli K12* sowie *S. capitis* nach 12-stündiger Inkubation mit Überständen von T4bzw. pSc_SD-Phagen-beladenen MCM-Proben (MW \pm Stabw, n = 3).

Beta-Tricalciumphosphat (β -TCP) wird schon seit vielen Jahren – meist in Form von gesintertem Granulat oder Formkörpern – zur Auffüllung von Knochendefekten im Bereich Orthopädie und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet. Es ist synthetisch herstellbar, spröde, kann aber von Osteoklasten *in vivo* über lange Zeiträume abgebaut werden.

Da ein Aufsaugen der Phagenlösung durch die β -TCP-Proben (Zylinder mit h = 5 mm und Ø 10 mm) nicht möglich war, wurden jeweils 3 Proben in Anlehnung an die Beladung von MBG mit 3 mL der entsprechenden Phagenlösung in 5 mL-Tubes für 8 Stunden inkubiert (rotierende Inkubation bei Raumtemperatur).

Die so beladenen Proben setzten T4-Phagen bis zum Tag 28 und pSc_SD-Phagen bis zum Tag 16 frei (**Abb. 20**).



Abb. 20: Spot-Plaque-Assay mit aus β -Tricalciumphosphat (β -TCP) über 28 Tage freigesetzten *E. coli*-& *S. capitis*-spezifischen Phagen (transparente Bereiche = durch Phagen abgetötete/lysierte Bakterien).

Wie erwartet spiegelte sich dieses Ergebnis auch in den Wachstumskurven von *E. coli K12* wieder: Über die gesamte Inkubationszeit verminderten die Probenüberstände das Bakterienwachstum um mindestens 50 %. Obwohl im Spot-Plaque-Assay ab Tag 16 keine Plaques mehr detektierbar waren, konnten die Überstände bis zum Tag 28 das Wachstum von *S. capitis* um z. T. deutlich mehr als die Hälfte reduzieren (**Abb. 21**).



Abb. 21: Anzahl an *E. coli K12* sowie *S. capitis* nach 12-stündiger Inkubation mit Überständen von T4bzw. pSc_SD-Phagen-beladenen β -TCP-Proben (MW ± Stabw, n = 3).

Bei Lyostypt handelt es sich um ein nassstabiles Kollagenvlies bovinen Ursprungs, welches in der klinischen Routine für die lokale Blutstillung eingesetzt wird. Wie MCM kann es im trockenen Zustand flüssige Lösungen aufnehmen und ist *in vivo* innerhalb von 3 Wochen vollständig resorbierbar.

Für den Versuch wurden quadratische Lyostypt-Proben (1 x 1 cm) mit jeweils 200 μ L Phagenlösung beladen und dann über Nacht unter sterilen Bedingungen im Luftstrom getrocknet.

Ähnlich dem β-TCP konnten auch bei Lyostypt mittels Spot-Plaque-Assay infektiöse Phagen bis Tag 28 (T4-Phagen) bzw. Tag 13 (pSc_SD-Phagen) nachgewiesen werden (**Abb. 22**).



Abb. 22: Spot-Plaque-Assay mit aus Lyostypt (Kollagenvlies bovinen Ursprungs) über 28 Tage freigesetzten *E. coli-* & *S. capitis*-spezifischen Phagen (transparente Bereiche = durch Phagen abgetötete/lysierte Bakterien).

In der Wachstumskurvenanalytik zeigten Überstände mit T4-Phagen über die gesamte 28-tägige Inkubationszeit eine mindestens 50 %-ige Verringerung des Wachstums von *E. coli K12* (**Abb. 23**). Auch die Überstände mit pSc_SD-Phagen konnten selbst nach 28 Tagen noch eine 42 %-ige Wachstumsreduktion von *S. capitis* induzieren.



Abb. 23: Anzahl an *E. coli K12* sowie *S. capitis* nach 12-stündiger Inkubation mit Überständen von T4bzw. pSc_SD-Phagen-beladenen Lyostypt-Proben (MW \pm Stabw, n = 3).

Das im Versuch verwendete Fibringel ist kommerziell als "Tisseel" (Baxter) erhältlich und wird in der Klinik als Gewebekleber eingesetzt. Dieser besteht aus 2 Komponenten - Fibrinogen und Thrombin – zwei für die Blutgerinnung wichtige Proteine. Tisseel kann in seiner Gelform per Spritze appliziert werden und ist *in vivo* innerhalb von ca. 2-4 Wochen vollständig resorbierbar.

Um Proben für den Freisetzungsversuch herzustellen, wurden jeweils 150 μ L der Fibrinogen- und Thrombinkomponente in ein 1,5 mL-Tube pipettiert, gemischt und für 20 min bei 37 °C auspolymerisiert. Die Thrombinkomponente wurde dabei zur Hälfte durch die jeweilige Phagenlösung ersetzt (150 μ L: 75 μ L Thrombinlösung + 75 μ L Phagenlösung).

Als einziges in diesem Versuch getestetes Biomaterial konnte bei Fibringel bei beiden Phagenarten eine Freisetzung bis zum Tag 28 mittels Spot-Plaque-Assay beobachtet werden (**Abb. 24**). Die Anzahl der Plaques war hier, insbesondere bei den späten Zeitpunkten, bei T4-Phagen größer als bei den pSc_SD-Phagen.



Abb. 24: Spot-Plaque-Assay mit aus Fibringel über 28 Tage freigesetzten *E. coli*- & *S. capitis*-spezifischen Phagen (transparente Bereiche = durch Phagen abgetötete/lysierte Bakterien).

Mittels Wachstumskurvenanalytik konnte diese Beobachtung verifiziert werden (**Abb. 25**). Während T4-Phagen in den Fibringelüberständen das Wachstum von *E. coli K12* um ca. 65-86 % verringerten, reduzierten pSc_SD-Phagen das Wachstum von *S. capitis* anfänglich sehr stark um bis zu 94 % und zum Ende der Inkubationszeit hin um ca. 50 %.



Abb. 25: Anzahl an *E. coli K12* sowie *S. capitis* nach 12-stündiger Inkubation mit Überständen von T4bzw. pSc_SD-Phagen-beladenen Fibringel-Proben (MW \pm Stabw, n = 3).

Die Wachstumskurven von *E. coli K12* und *S. capitis* wurden bei den hier durchgeführten Versuchen über 12 Stunden aufgenommen. Neben den bisher gezeigten Werten für die Wachstumsreduktion am Ende der Messung (% der Kontrolle nach 12 h) ist die Zeit, bei der erstmals ein Wachstumsarrest auftritt, ein Indikator für die absolute Anzahl an freigesetzten, lytischen Phagen. Je früher ein – in den vorliegenden Versuchen – 10 %-iger Wachstumsarrest eintritt, desto mehr aktive Phagen sind in der Überstandslösung vorhanden. Die nachfolgenden beiden Abbildungen (**Abb. 26**, **Abb. 27**) stellen diese Zeit jeweils für *E. coli*-spezifische T4-und für *S. capitis*-spezifische pSc_SD-Phagen grafisch dar.

Bei den mit T4-Phagen beladenen Materialien steigt bei allen Materialien die Zeit, bei der erstmals das Bakterienwachstum um 10 % reduziert ist, mit der Inkubationszeit an (**Abb. 26**). Während Fibringel-Überstände dafür max. 113 min benötigen, liegt dieser Wert bei β -TCP und Lyostypt bei 197 min und bei MCM bei max. 333 min.



Abb. 26: Zeitpunkt, bei dem aufgrund der in den Überständen enthaltenen T4-Phagen erstmals ein 10 %-iger Wachstumsarrest des Wirtsbakteriums *E. coli K12* auftritt (generell: je kleiner Zeit, desto mehr Phagen sind in der getesteten Lösung enthalten; MW \pm Stabw, n = 3).

Bei den mit pSc_SD-Phagen beladenen Materialien steigt bei allen Materialien die Zeit ebenfalls an (**Abb. 27**). Während MCM-Überstände nur bis zum Tag 3 überhaupt einen Wachstumsarrest induzieren können, sind die Werte für β -TCP-, Lyostypt- und Fibringelüberstände mit max. 407-533 min vergleichbar.

Im Vergleich zu *S. capitis*-spezifischen Phagen sind die Werte bei *E. coli*-spezifischen Phagen geringer, was vermuten lässt, dass von den Materialien mehr T4- als pSc_SD-Phagen freigesetzt werden.



Abb. 27: Zeitpunkt, bei dem aufgrund der in den Überständen enthaltenen pSc_SD-Phagen erstmals ein 10 %-iger Wachstumsarrest des Wirtsbakteriums *S. capitis* auftritt (generell: je kleiner Zeit, desto mehr Phagen sind in der getesteten Lösung enthalten; MW \pm Stabw, n = 3).

Ein weiterer Punkt in diesem Arbeitspaket war die Überprüfung der Biofilmwirksamkeit der Biomaterialüberstände. Zur Etablierung der Methode wurden in einem ersten Versuch 2 Tage alte Biofilme von *E. coli* und *S. capitis* für 24 Stunden mit verschiedenen Phagenverdünnungen (unverdünnt – 10⁻¹¹) inkubiert und anschließend mittels Kristallviolett gefärbt. Als Kontrolle dienten Biofilme, die mit dem jeweiligen regulären Bakterienkulturmedium (*E. coli K12*: LB, *S. capitis*: TSB) bzw. dem Freisetzungsmedium (HPLM) inkubiert wurden. Während bei den T4-Phagen optisch kein Unterschied zu erkennen war, zeigte sich im Vergleich zu HPLM bei den pSc_SD-Phagen bis zur Verdünnung 10⁻⁴ eine abgeschwächte Kristallviolettfärbung (**Abb. 28**).



Abb. 28: Wirksamkeit verschiedener Verdünnungen von T4- und pSc_SD-Phagen gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *E. coli K12* bzw. *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung).

Die nachfolgenden Abbildungen (**Abb. 29**, **Abb. 30**, **Abb. 31** und **Abb. 32**) stellen die Biofilmwirksamkeit der Biomaterialüberstände bis zum Tag 10 dar. Auch hier zeigte sich im Vergleich zum Freisetzungsmedium HPLM ohne Phagen kein Einfluss der Überstände der T4-Phagen-beladenen Materialien. Bei Beladung mit S. capitisspezifischen Phagen waren jedoch in Abhängigkeit des Zeitpunktes leichte Unterschiede zu erkennen. Eine semiquantitative Auswertung der Biofilmintensität (Messung der optischen Dichte des herausgelösten Farbstoffs) bestätigte den optischen Eindruck (**Abb. 33**). Die beste Biofilmwirksamkeit konnte dabei für Fibringelüberstände beobachtet werden.



Abb. 29: Wirksamkeit von Überständen von mit Phagen-beladenen MCM-Proben gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *E. coli K12* bzw. *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung).



Abb. 30: Wirksamkeit von Überständen von mit Phagen-beladenen β-TCP-Proben gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *E. coli K12* bzw. *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung).



Abb. 31: Wirksamkeit von Überständen von mit Phagen-beladenen Lyostypt-Proben gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *E. coli K12* bzw. *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung).



Abb. 32: Wirksamkeit von Überständen von mit Phagen-beladenen Fibringel-Proben gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *E. coli K12* bzw. *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung).



Abb. 33: Semiquantitative Analyse der Wirksamkeit von Überständen von mit pSc_SD-Phagenbeladenen Biomaterial-Proben gegenüber 2 Tage alten Biofilmen von *S. capitis* (Kristallviolett-Färbung, MW \pm Stabw, n = 3).



Infolge der Probleme bei der Etablierung des *in vitro*-PII-Modells konnte dieses Arbeitspaket noch nicht umfänglich bearbeitet werden.

In einem ersten Versuch dazu wurde das im AP 1 alternativ zum Rattenfemur entwickelte PII-Modell mit MCM-Scaffolds (vgl. **Abb. 6**) untersucht. Dazu wurden die MCM-Scaffolds mit *S. capitis* besiedelt und zur Ausbildung eines Biofilms für 3 Tage mit Bakterienkulturmedium (TSB-Medium) inkubiert. Anschließend wurden pSc_SD-Phagen in verschiedenen Verdünnungen (10⁻¹-10⁻⁴) systemisch zugegeben und mit den Bakterien-besiedelten Proben für weitere 24 Stunden inkubiert. Die nachfolgende MTT-Färbung machte lebende Bakterienzellen im Scaffold durch eine lila Färbung sichtbar. Wie in **Abb. 34** zu erkennen, infiltrierten/besiedelten die auf den MCM-Scaffold gegebenen Bakterien auch den umgebenden Agar. Nach Zugabe der Phagen konnte auf dem Agar ein leichter Rückgang der bakteriellen Besiedlung beobachtet werden; innerhalb der MCM-Scaffolds konnte jedoch kein Effekt der Phagen nachgewiesen werden. Möglichkeiten die Effektivität der Phagen zu verbessern könnten sein: (1) wiederholte Anwendung der Phagen, ggf. in kürzeren Zeitabständen, (2) zusätzlich zur systemischen Anwendung direkte Injektion der Phagen in den MCM- Scaffold, (3) zusätzliche Gabe von Antibiotika oder anderen antibakteriell wirksamen Substanzen (z. B. Manuka Honig, s. **Abb. 35**) und (4) Kombination der zuvor genannten Möglichkeiten.



Abb. 34: Wirksamkeit systemisch zugegebener Phagen in unterschiedlichen Verdünnungen (10⁻¹-10⁻⁴) gegenüber in MCM-Scaffolds ausgebildeten Biofilmen von *S. capitis*. Nach 24-stündiger Behandlung der Bakterien-besiedelten Proben mit Phagen wurden lebende/aktive Bakterien mittels MTT angefärbt (lila Färbung). Obere Reihe: Scaffolds mit umgebendem Agarbett in 6-Well-Zellkulturschale, untere Reihe: Bakterien-besiedelte Scaffolds nach Behandlung mit Phagen im Ganzen (links) und mittig quer geteilt (rechts).



Abb. 35: Einfluss von Manuka-Honig in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstum von *S. capitis*. Hohe Konzentrationen von 20 und 30 % Manuka-Honig führen zu einer sehr starken Wachstumsreduktion der Bakterien.