



Abschlussbericht „DrugSynergy“

Thema: Synergistische Wirkung von Metallionen zur Reduktion der Antibiotika-Dosis bei der lokalen Behandlung von Implantat-assoziierten Infektionen

Antragsteller: Prof. Dr. Michael Gelinsky

Dr. Vera Todorovic

Dr. Anja Lode

Jun.-Prof. Dr. med. dent. Paula Korn

Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Medizinische Fakultät der TU Dresden

Mitarbeit: B. Sc. Franz Kopelmann

Dr. Reinhard Örtel

M. Sc. Nancy Engel

Projektlaufzeit: 1.10. 2023 – 30.9. 2025

Populärwissenschaftlicher Bericht

Medikamente haben oft unerwünschte Nebenwirkungen, wenn sie in den therapeutisch notwendigen Dosen verabreicht werden – nicht selten kommt es zu deutlichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen für die Patient*innen. Mögliche Strategien zur Entwicklung neuer, verträglicherer und effizienterer Therapien sind (1) die Nutzung von alternativen Substanzen mit anderen Wirkmechanismen oder von (2) Wirkstoffkombinationen, die eine Dosis-Reduzierung der einzelnen Komponenten erlauben, sowie (3) eine lokale Anwendung. All diese Strategien liegen diesem Projekt zugrunde, das sich auf das klinische Problem Implantat-assoziiertes Infektionen fokussiert. Als die am häufigsten auftretenden Komplikationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie Orthopädie und Unfallchirurgie sind sie eine enorme Belastung für die betroffenen Patient*innen, das Gesundheitswesen und die Gesellschaft. Derzeit ist die systemische (oral, intravenös) Verabreichung von Antibiotika in hohen Dosen essenzieller Bestandteil der Therapie zur Bekämpfung der Infektion – verbunden mit den Nachteilen eines schädigenden Einflusses auf Organe und Zellen sowie die lebensnotwendige Mikroflora der Patient*innen. Metallionen mit antibakterieller Wirkung stellen eine Alternative dar, können in hoher Dosierung jedoch ebenfalls toxisch für humane Zellen sein.

Im Projekt untersuchten wir die Hypothese, dass verschiedene antibakterielle Wirkstoffe – Metallionen und Antibiotika – mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in Kombination synergistisch gegen Bakterien wirken, so dass sich die individuellen therapeutisch notwendigen Konzentrationen, und damit verbunden deren zelltoxische Effekte, reduzieren ließen. Wir kombinierten Kupfer-, Zink-, Cerium- und Gallium-Ionen untereinander sowie mit den Antibiotika Gentamicin und Ciprofloxacin in absteigenden Konzentrationen und testeten diese Paarungen auf ihre Effektivität gegen Bakterien sowie ihre Zellverträglichkeit. Synergien äußerten sich darin, dass das Bakterienwachstum bereits bei geringeren Konzentrationen, als für die einzelnen Ionen bekannt, gehemmt bzw. eine stärkere Wirkung als durch reines Antibiotikum in gleicher Konzentration erzielt werden konnte. Wir identifizierten synergistisch wirksame Ionen/Ionen-Kombinationen, jedoch waren sie trotz deutlich reduzierter Konzentrationen immer noch zelltoxisch. Die Antibiotika wirkten synergistisch mit Kupfer-, Zink- und Gallium-Ionen; nur die Kombination von Ciprofloxacin und Gallium-Ionen erwies sich als zellverträglich und wurde für die Entwicklung eines *Drug-Delivery*-Systems für den lokalen Einsatz in infizierten Bereichen ausgewählt. Dafür nutzten wir mesoporöse bioaktive Gläser (MBG). Diese partikulären Knochenersatzstoffe können mit Metallionen modifiziert und – aufgrund ihrer feinen kanalartigen Porenstruktur – mit Wirkstoffen beladen werden. Durch Herstellung von Gallium-modifiziertem MBG und die anschließende Beladung mit Ciprofloxacin war es möglich, ein System zu schaffen, das über längere Zeiträume (>2 Wochen) beide Wirkstoffe freisetzt. Obwohl die Freisetzung des Ions dabei nicht ausreichte, um die für einen synergistischen Effekt notwendige Konzentration zu erreichen, zeichnete sich das Gallium-modifizierte MBG durch eine kontinuierliche Abgabe des Antibiotikums aus, was etablierte MBG-Varianten nicht erreichten. Die Ergebnisse des Projektes bilden eine wertvolle Grundlage für die Weiterentwicklung des Gallium-modifizierten MBG für die lokale Verabreichung von Antibiotika in reduzierter Dosis.

Zielsetzung

Ziel des vorliegenden Projekts war die Untersuchung eines potenziellen Lösungsansatzes zur Überwindung der Limitierungen derzeitiger Behandlungsansätze von Implantat-assoziierten Infektionen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie der Orthopädie und Unfallchirurgie. Diese Behandlungen beruhen in hohem Maße auf der systemischen Gabe von Antibiotika in hohen Dosen, was zu signifikanten Nebenwirkungen führen und die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen begünstigen kann.

Im Rahmen des Projekts sollte ein Wirkstofffreisetzungssystem entwickelt werden, das zwei wesentliche Eigenschaften erfüllt:

1. Lokale und langanhaltende Freisetzung antibakterieller Wirkstoffe
2. Kombination zweier unterschiedlicher antibakterieller Wirkstoffe, zur Minimierung der Zelltoxizität sowie zur Steigerung der Wirksamkeit

Der vorgeschlagene Ansatz basiert auf der Hypothese, dass die gezielte Kombination von zwei (oder mehreren) antibakteriellen Wirkstoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen die therapeutisch notwendige Konzentration der einzelnen Wirkstoffe, und damit deren toxische Wirkung auf humane Zellen und Gewebe, minimieren oder sogar eliminieren kann. Dazu sollten Kombinationen aus verschiedenen, antibakteriell wirksamen Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+} , $Ce^{3+/4+}$, Ga^{3+}) [1–5] sowie aus diesen Metallionen und klinisch verwendeten Antibiotika hinsichtlich synergistischer Effekte gegen zwei Modellbakterienstämme – *Staphylococcus capitis* (Gram-positiv) und *Escherichia coli* (Gram-negativ) – untersucht werden. Die Zytotoxizität sollte an primären humanen Zellen, die bedeutend für die Knochenregeneration sind – mesenchymale Stammzellen und Präosteoblasten – untersucht werden.

Für ausgewählte Kombinationen sollte ein Wirkstofffreisetzungssystem auf Basis mesoporöser bioaktiver Gläser [6–8] entwickelt werden, das eine lokale und langanhaltende Freisetzung in therapeutisch wirksamen, zellverträglichen Dosen ermöglicht.

→ **Mesoporöse bioaktive Gläser (MBG):** Aufgrund ihrer ausgezeichneten Osteokonduktivität (Unterstützung der Knochenneubildung), Bioaktivität (Aufbau einer festen Verbindung zum Knochengewebe) und schnellen Degradierbarkeit sind bioaktive Gläser seit vielen Jahren klinisch etabliert und werden häufig für zahnmedizinische und orthopädische Anwendungen eingesetzt [6]. Mesoporöse bioaktive Gläser sind eine Sonderform, die sich durch eine hoch geordnete mesoporöse Kanalstruktur auszeichnet. Diese Kanäle mit einem Durchmesser von 6-9 nm können mit pharmakologischen Wirkstoffen wie Antibiotika beladen werden, wodurch MBG vielversprechende lokale Freisetzungssysteme darstellen [7]. MBG können außerdem sehr einfach und effizient mit Metallionen modifiziert werden, die während ihrer Degradation langanhaltend freigesetzt werden und lokal eine gewünschte therapeutische Wirkung erzielen können [8].

Ergebnisse

Die erzielten Ergebnisse werden gegliedert nach den Arbeitspaketen (AP) aufgeführt.

AP1	Synergistische Wirkung von Ionen/Ionen- und Ionen/Antibiotika-Kombinationen gegen Bakterien – systematische Untersuchung
Ziel:	Ermittlung von Kombinationen mit einer synergistischen Wirkung gegen die Modellorganismen <i>E. coli</i> und <i>S. capititis</i>

Die Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit verschiedener Kombinationen von Ionen bzw. Ionen mit Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte durch Aufnahme von Wachstumskurven der Bakterien in Suspensionskulturen. Dafür wurden jeweils 50 µL einer antibakteriellen Testlösung zu 100 µL Bakteriensuspension gegeben (in 96-Well-Platten) und das Bakterienwachstum überwacht, indem die optische Dichte der Suspension bei $\lambda = 600$ nm (OD_{600} ; korreliert mit der Bakterienzahl) alle 20 Minuten über einen Zeitraum von 12 Stunden gemessen wurde. Erste Versuche wurden mit dem in der klinischen Praxis häufig verwendeten Antibiotikum Gentamicin durchgeführt. Später wurde zusätzlich das gegen Enterobakterien eingesetzte Ciprofloxacin [9] getestet. Kombinationen, die das Bakterienwachstum, gemessen am Integral der Wachstumskurven (engl.: *area under the curve* - AUC), um 50 % reduzierten, wurden als antibakteriell wirksam eingestuft. Für jede Testlösung wurde jeweils ein bakterienfreier „Blank“ mitgemessen, der im Anschluss an die Messung abgezogen wurde, um eine Verfälschung dieser durch Ausfällungsreaktionen zwischen Ionen und Bakterienmedium zu vermeiden (**Abbildung S1** im Anhang).

1.1 Antibakterielle Wirkung verschiedener Metallionenkombinationen

Die aus der Literatur [4,10–12] bekannten minimalen Hemmkonzentrationen (engl.: *minimal inhibitory concentration* - MIC) sowie davon abgeleitete Testkonzentrationen (Bruchteile der MIC) der Metallionen sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1: Getestete Konzentrationen von Metallionen und Antibiotika

Ionen	Konzentration (mM)					
	MIC	MIC/2	MIC/4	MIC/8	MIC/16	MIC/32
Zn ²⁺	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156
Cu ²⁺	9	4.5	2.25	1.125	0.563	0.281
Ce ^{3+/4+}	3.5	1.75	0.875	0.438	0.219	0.109
Ga ³⁺	1.45	0.725	0.363	0.181	0.091	0.045
Antibiotikum	Konzentration (µg/mL)					
	MIC	MIC/2	MIC/4	MIC/8	MIC/16	MIC/32
Gentamicin	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Ciprofloxacin	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016

$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wurden in deionisiertem Wasser (ddH_2O) in den entsprechenden Konzentrationen gelöst und die Lösungen steril filtriert.

Eine sehr starke antibakterielle Wirkung, zu erkennen an geringen relativen AUC-Werten bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle (Bakteriensuspension ohne Zusatz von antibakteriellen Lösungen), wurde erwartungsgemäß für alle Ionen-Kombinationen bei den MIC-Konzentrationen beobachtet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* (**Abbildung 1A**) im Vergleich zu *S. capititis* (**Abbildung 1B**) generell sensitiver gegenüber allen getesteten Kombinationen war.

Eine synergistische Wirkung ist erkennbar, wenn die Ionen/Ionen-Kombinationen im Konzentrationsbereich unterhalb der MIC einen antibakteriellen Effekt zeigen. Gegen *E. coli* zeigten alle Kombinationen mit Cu sowie Zn + Ga einen starken antibakteriellen Effekt bei MIC/2 und MIC/4 sowie einen eingeschränkten Effekt bei MIC/8 und MIC/16. Die Kombination Ce + Ga verlor ihre Wirksamkeit bereits bei einer Reduktion der Konzentration auf MIC/2; Zn + Ce war ab MIC/8 nicht mehr wirksam. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration (MIC/32) war kein antibakterieller Effekt feststellbar.

Alle getesteten Kombinationen zeigten erwartungsgemäß eine Wirksamkeit gegen *S. capititis* in MIC-Konzentrationen. Unterhalb der MIC-Konzentrationen zeigten alle Kombinationen mit Cu einen deutlichen antibakteriellen Effekt bei MIC/2 und MIC/4 sowie einen minimalen Effekt bei MIC/8, MIC/16 und MIC/32. Die Kombination Zn + Ga war in geringeren Konzentrationen nicht mehr effektiv und auch Zn + Ce und Ce + Ga büßten ihre Wirksamkeit ab MIC/2 ein.

Die Wachstumskurven dieser Versuche für *E. coli* (**Abbildung S2**) und *S. capititis* (**Abbildung S3**) finden sich im Anhang.

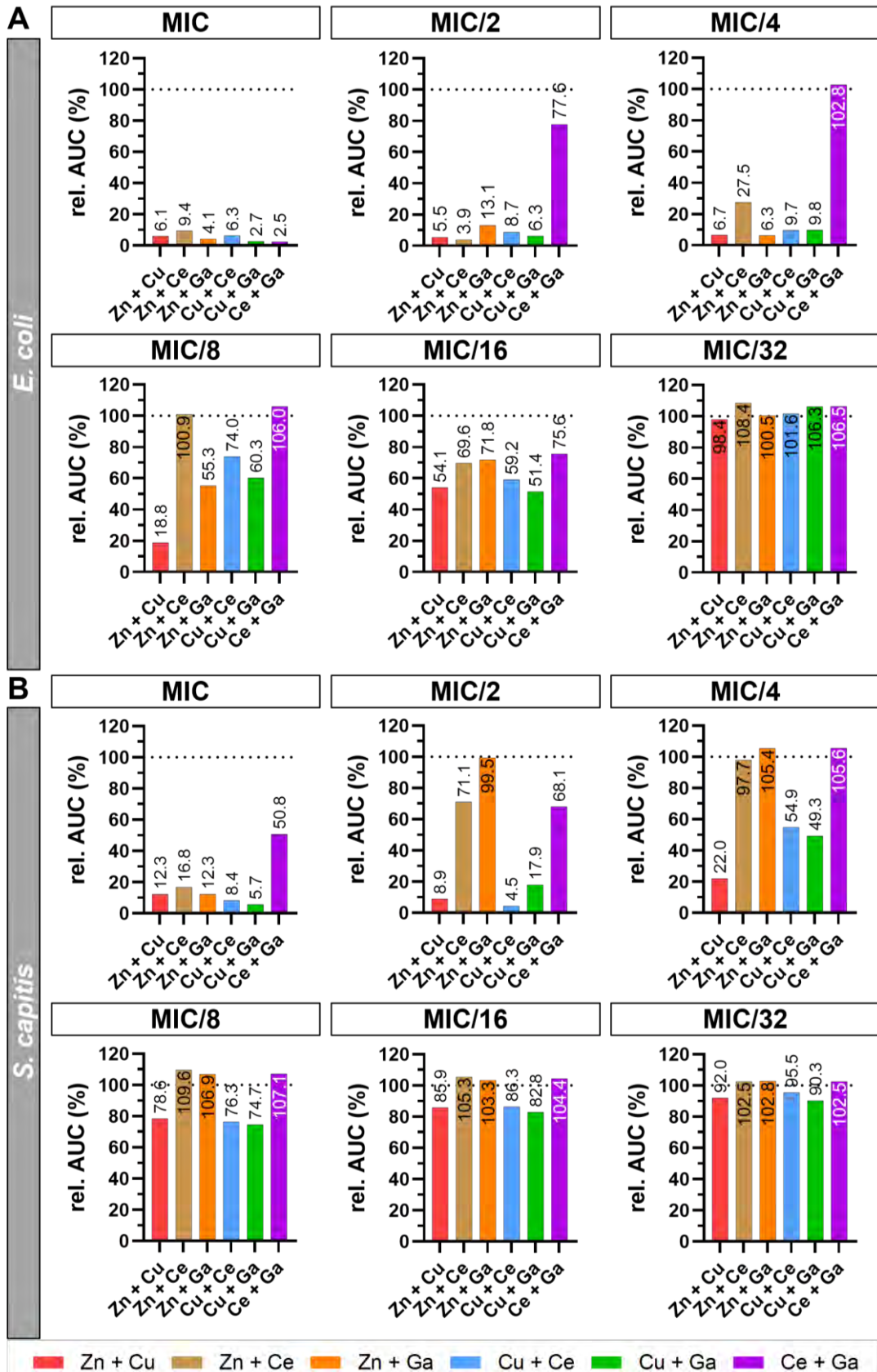


Abbildung 1: Antibakterielle Wirksamkeit der Ionen/Ionen-Kombinationen bei Reduktion der MIC. AUC von Wachstumskurven von mit Ion/Ion-Testlösungen (50 µL) behandelten Bakterien suspensionen (100 µL) normiert auf die jeweilige Negativkontrolle für (A) *E. coli* und (B) *S. capitis*. Für die Testlösungen wurden Metallionen in ihrer jeweiligen MIC-Konzentration bzw. in Bruchteilen davon kombiniert. In der Negativkontrolle wurde die Testlösung durch ddH₂O ersetzt. Angaben in %.

1.2 Antibakterielle Wirkung von Ionen/Antibiotika-Kombinationen

Im Rahmen der Versuche testeten wir zwei Antibiotika – Gentamicin (Genta) und Ciprofloxacin (Cipro) – in Kombination mit den bereits erwähnten Metallionen. Eine synergistische Wirkung ist erkennbar, wenn die Ionen/Antibiotika-Kombinationen in Konzentrationsbereichen beider Komponenten unterhalb der MIC einen antibakteriellen Effekt zeigen.

Für Gentamicin konnte eine synergistische Wirkung in Kombination mit Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen sowohl gegen *E. coli* (**Abbildung 2A**) als auch gegen *S. capitis* (**Abbildung 2B**) demonstriert werden, was sich jeweils in einer Reduktion der AUC im Vergleich zur reinen Gentamicin Kontrolle (Genta (MIC/2) und Genta (MIC/4)) bemerkbar machte. *E. coli* zeigte sich abermals sensitiver, da hier bei einer MIC/4 der Ionen stärkere Effekte auftraten als bei *S. capitis*. Ce- und Ga-Ionen zeigten keinen synergistischen Effekt.

Die zugrundeliegenden Wachstumskurven finden sich im Anhang für *E. coli* (**Abbildung S4**) und *S. capitis* (**Abbildung S5**).

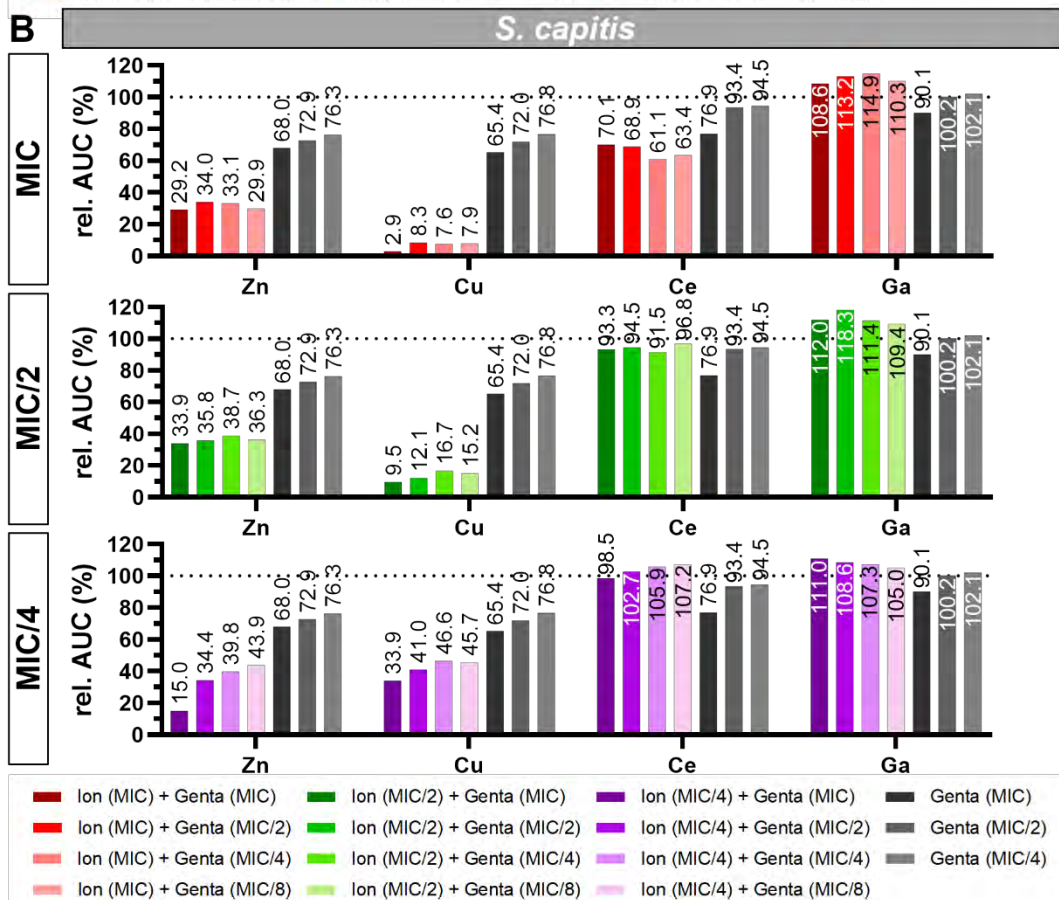
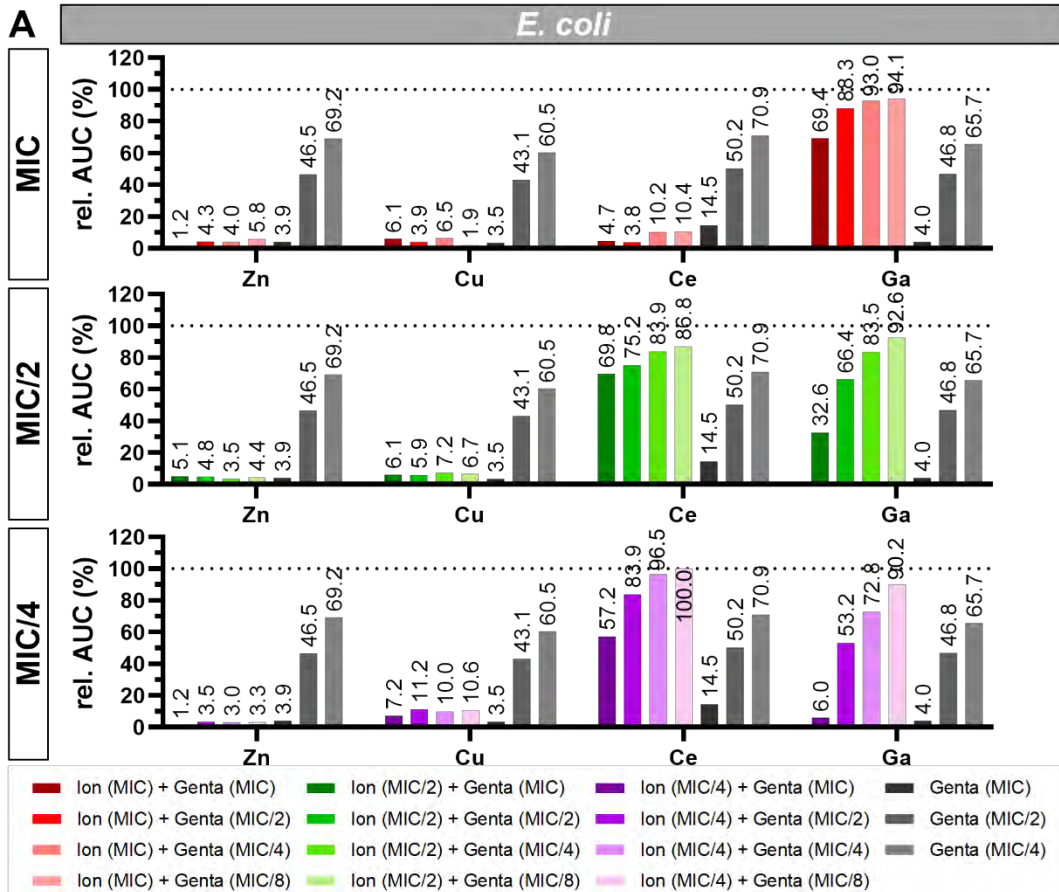


Abbildung 2: Antibakterielle Wirksamkeit der Ionen/Gentamicin-Kombinationen bei Reduktion der MIC. AUCs von Wachstumskurven von mit Ionen/Gentamicin-Testlösungen (50 µL) behandelten Bakterien-suspensionen (100 µL) normiert auf die jeweilige Negativkontrolle für (A) *E. coli* und (B) *S. capitis*. Gentamicin wurde in Konzentration von MIC bis MIC/8 mit Metallionen in Konzentration MIC bis MIC/4 kombiniert. In der Negativkontrolle wurde die Testlösung durch ddH₂O ersetzt. Als Positivkontrolle diente pures Gentamicin in entsprechenden Konzentrationen (MIC – MIC/4). Angaben in %.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurde Ciprofloxacin zunächst in Kombination mit Zn (MIC/4) getestet (**Abbildung 3**). Dabei zeigte sich einerseits ein synergistischer Effekt beider Komponenten gegen *E. coli* und andererseits eine generell höhere Wirksamkeit von Ciprofloxacin gegen *E. coli* und *S. capitis* im Vergleich zu Gentamicin. Daraufhin wurden für die weiteren Versuche die zu testenden Konzentrationen sowohl des Antibiotikums als auch der Ionen weiter reduziert (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).

Gegen *E. coli* zeigte sich ein deutlicher synergistischer Effekt mit Cu (MIC/4) im Vergleich zur reinen Ciprofloxacin Kontrolle (Cipro (MIC/4) - Cipro (MIC/16)). Ein Effekt war auch für die Kombination Ga (MIC/4 und MIC/8) und Zn (MIC/8) mit Cipro (<MIC/4) zu verzeichnen (**Abbildung 4A**).

Gegen *S. capitis* demonstrierte Ciprofloxacin generell eine stärkere Wirkung (**Abbildung 4B**), was die Detektion synergistischer Effekte erschwerte. Dennoch wurde ein moderater Effekt für die Kombination von Cu (MIC/4) mit Cipro (MIC/4 und MIC/8) sowie minimale Effekte von Ga (MIC/4 – MIC/12) mit Cipro (MIC/4 – MIC/16) detektiert.

Die zugrundeliegenden Wachstumskurven finden sich im Anhang für *E. coli* (**Abbildung S4**) bzw. *S. capitis* (**Abbildung S5**).

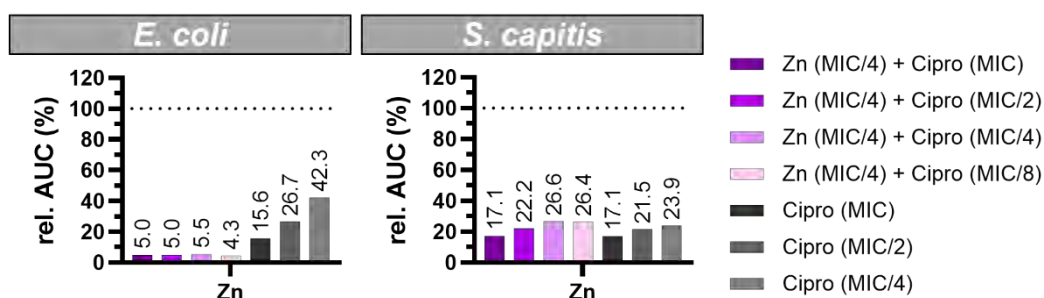


Abbildung 3: Antibakterielle Wirksamkeit der Zn (MIC/4)/Ciprofloxacin-Kombinationen bei Reduktion der MIC. AUC von Wachstumskurven von mit Zn/Ciprofloxacin-Testlösungen (50 µL) behandelten Bakterien-suspensionen (100 µL) normiert auf die jeweilige unbehandelte Negativkontrolle für *E. coli* und *S. capitis*. Angaben in %.

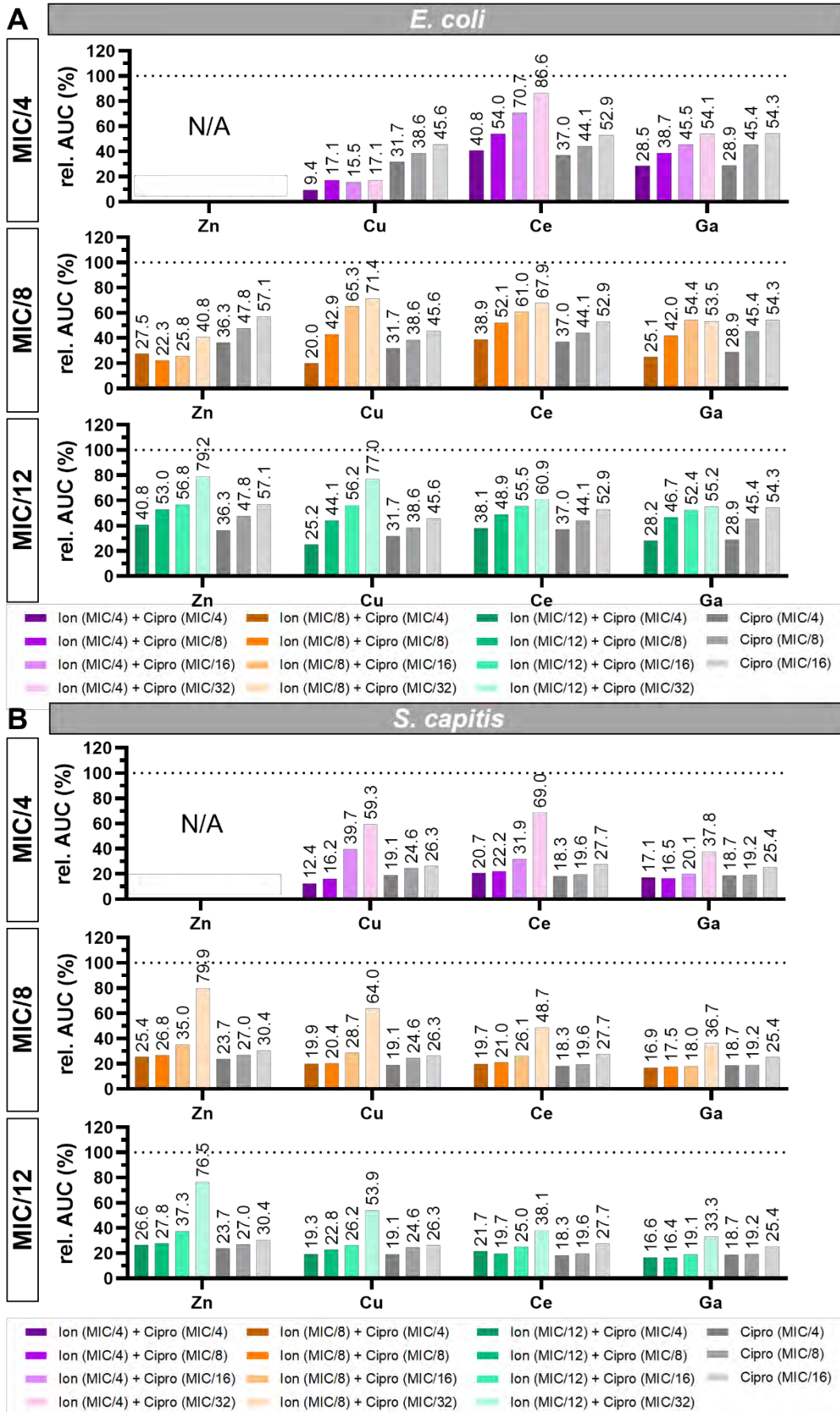


Abbildung 4: Antibakterielle Wirksamkeit der Ionen/Ciprofloxacin-Kombinationen bei Reduktion der MIC. AUC von Wachstumskurven von mit Ion/Ciprofloxacin-Testlösungen (50 µL) behandelten Bakterien suspensionen (100 µL) normiert auf die jeweilige Negativkontrolle für (A) *E. coli* und (B) *S. capitis*. Ciprofloxacin wurde in Konzentration von MIC/4 bis MIC/32 mit Metallionen in Konzentration MIC/4 bis MIC/12 kombiniert. In der Negativkontrolle wurde die Testlösung durch ddH₂O ersetzt. Als Positivkontrolle diente pures Ciprofloxacin in entsprechenden Konzentrationen (MIC/4 – MIC/16). Angaben in %. N/A – nicht verfügbar.

AP2	Wirkung ausgewählter antibakteriell wirksamer Ionen/Ionen- und Ionen/Antibiotika-Kombinationen auf humane Stamm- und Knochenzellen
Ziel:	Ermittlung von Kombinationen und Konzentrationen die nicht zelltoxisch sind

Zwei humane Primärzelltypen – mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Präosteoblasten (hOB) – von je zwei unabhängigen Spendern wurden für die Zytotoxizitätsbewertung gemäß DIN ISO 10993 eingesetzt. Nach der Inkubation mit Ionen/Ionen- bzw. Ionen/Antibiotika-Kombinationen, die in den zuvor bestimmten niedrigsten Konzentrationen gegen Bakterien wirksam waren, wurde die Zytotoxizität anhand des ATP-Gehaltes mittels Lumineszenz-Messung (Kit CellTiter-Glo®, Promega) bestimmt, welcher indirekt als Maß für die Zellviabilität dient. Eine Abnahme der Lumineszenz um mehr als 30 % gegenüber der unbehandelten Negativkontrolle wurde als zytotoxisch bewertet (ISO 10993-5:2009).

Für alle getesteten Ionen/Ionen-Kombinationen konnte lediglich ein sehr schwaches Lumineszenzsignal detektiert werden, was auf eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung gegenüber den untersuchten Zelltypen hindeutet (**Abbildung 5A**). Die beobachtete Toxizität fiel dabei zum Teil sogar stärker aus als jene der verwendeten Staurosporin-Positivkontrolle. Eine Ausnahme stellte Ce (MIC/2) + Ga (MIC/2) dar: Während diese weiterhin eine deutliche Toxizität gegenüber den hMSC zeigte, wurde sie von den hOB gut toleriert.

Zn und Cu in Kombination mit Gentamicin (**Abbildung 5B**) und Ciprofloxacin (**Abbildung 5C**) sowie Ce (MIC) + Genta (MIC/8) entfalteten eine starke bis sehr starke zytotoxische Wirkung. Im Gegensatz dazu wurden Paarungen von Ce und Ga mit Ciprofloxacin von den Zellen sehr gut toleriert. Ciprofloxacin wurde ausschließlich an hMSC getestet, da im vorhergehenden Screening mit Gentamicin kein signifikanter Unterschied in der Wirkung gegenüber hOB beobachtet wurde.

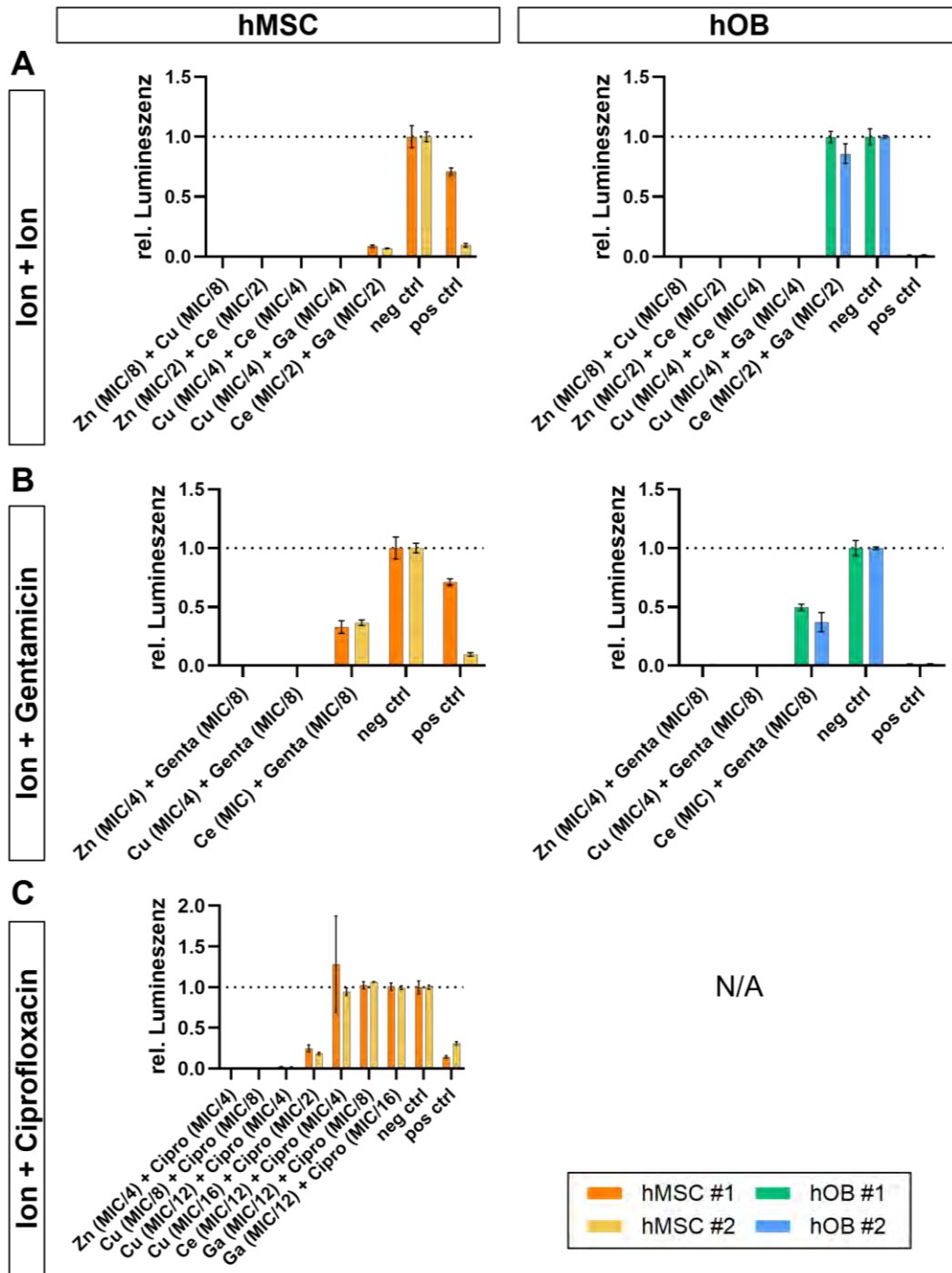


Abbildung 5: Zellviabilitätsmessung von hMSC und hOB nach Inkubation mit ausgewählten, antibakteriell wirksamen Ionen/Ionen- und Ionen/Antibiotika-Testlösungen. Die Viabilität von hMSC und hOB, jeweils von zwei unabhängigen Spendern, wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Testlösungen durch den *CellTiter-Glo Lumiscent Cell Viability Assay* bestimmt. Lumineszenzwerte von biologischen Triplikaten sind auf die unbehandelten Negativkontrollen normiert. (A) Ionen/Ionen-, (B) Ionen/Gentamicin-, (C) Ionen/Ciprofloxacin-Kombinationen. Als Positivkontrolle zur Induktion starker Zytotoxizität diente Staurosporin.

AP3	Synthese und Charakterisierung von mit antibakteriellen Ionen modifizierten mesoporösen bioaktiven Gläsern (MBG)
Ziel:	MBG mit erhaltener innerer Kanalstruktur, die die eingebrachten Ionen in antibakteriell wirksamen Konzentrationen langanhaltend freisetzen

Ausgehend von MBG mit 80, 5 und 15 mol-% Si, P und Ca (15CaMBG) [13] wurden Modifikationen vorgenommen, bei denen Calcium vollständig durch Zn, Cu, Ce bzw. Ga ersetzt wurde. Alle modifizierten MBG wiesen eine mesoporöse Kanalstruktur auf – mit Ausnahme des vollständig mit Ce-substituierten MBG (15CeMBG). Infolgedessen wurden MBG mit partieller Substitution durch Ce (5 und 10 mol-%) synthetisiert – diese wiesen eine mesoporöse Kanalstruktur auf (**Abbildung 6A**).

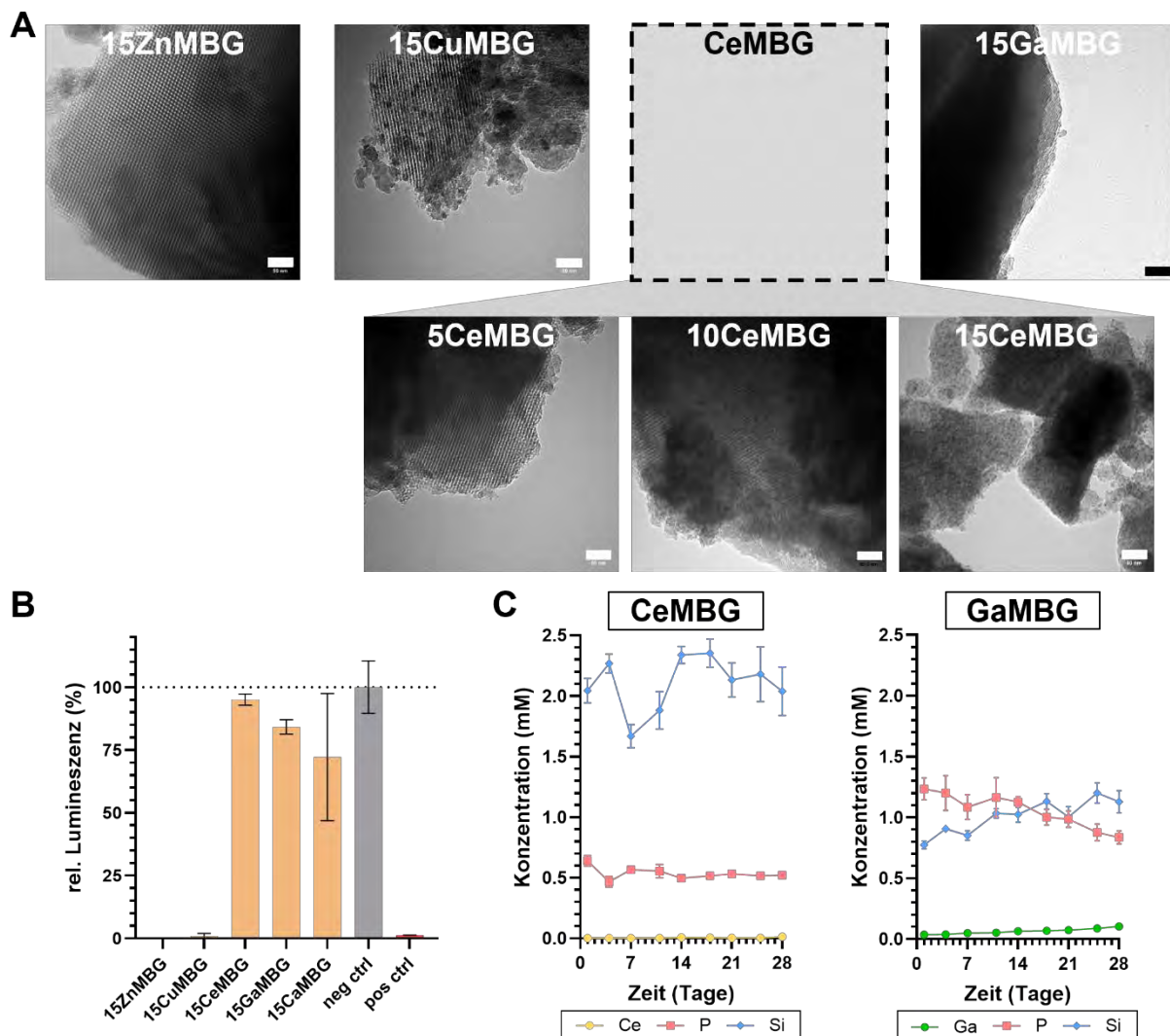


Abbildung 6: Charakterisierung Ionen-modifizierter MBG

(A) Transelektronmikroskopie (TEM)-Aufnahmen von Partikeln der synthetisierten Ionen-modifizierten MBG zeigen die mesoporöse Kanalstruktur, welche in 15CeMBG nicht vorhanden ist. Maßstabablen entsprechen 50 nm. (B) Relative Lumineszenz als Maß für Zellviabilität anhand des ATP-Gehaltes von NHDF nach 24-stündiger Inkubation mit MBG-Extrakten. (C) Freisetzungsprofile der Ionen aus CeMBG und GaMBG über 28 Tage.

Mit Extrakten der MBG, die nach Inkubation der Mikropartikel in *Human Plasma-Like Medium* (HPLM) gewonnen wurden, wurde eine Zytotoxizitätsbewertung durchgeführt, um potentiell zytotoxische Varianten zu ermitteln (**Abbildung 6B**). Für das Experiment wurden normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) genutzt, die im Allgemeinen weniger empfindlich sind als hMSC oder hOB, an denen sich aber dennoch eine ausgeprägte Zytotoxizität der Extrakte von mit Zn und Cu substituierten MBG-Varianten beobachten ließ. Folglich wurden diese beiden Gläser von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Um die Degradation der Gläser sowie die Freisetzung der antibakteriell wirksamen Ionen zu bestimmen, wurden je 20 mg CeMBG und GaMBG in 1 mL *Human Plasma-Like Medium* (HPLM) über 28 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert und die Überstände anschließend mittels induktiv-gekoppelter Plasma Massenspektroskopie (engl.: ICP-OES) gemessen (**Abbildung 6C**). An der freigesetzten Menge an Silikationen lässt sich ablesen, dass CeMBG etwas schneller degradiert als GaMBG. Die substituierten $Ce^{3+/4+}$ -Ionen werden nur sehr geringfügig freigesetzt. Ga^{3+} -Ionen werden stärker freigesetzt, jedoch reichen auch hier die Mengen nicht aus, um Konzentrationen mit einer nachweislich antibakteriellen Wirkung zu erreichen. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch Erhöhung der Menge an GaMBG-Mikropartikeln ein antibakterieller Effekt erzielt werden kann. Gegebenenfalls wird dies auch durch die Kombination mit weiteren aus dem Glas freigesetzten Ionen unterstützt.

AP4	Beladung und Freisetzung von Antibiotika aus MBG
Ziel:	Ionen-modifizierte MBG als Freisetzungssysteme für Antibiotika, die verzögert und in antibakteriell wirksamen Konzentrationen freigesetzt werden

4.1 Erarbeitung eines Beladungsprotokolls für Ciprofloxacin und Untersuchung der Beladungseffizienz

Aufgrund der positiven Ergebnisse in AP1 wurde für diese Untersuchungen Ciprofloxacin ausgewählt. Beladen wurden CeMBG und GaMBG als potenziell antibakterielle Ionen freisetzende MBG-Varianten, die Basisvariante CaMBG diente als Referenz.

Um den jeweiligen Einfluss der Beladungskonzentration sowie der Beladungszeit abzuschätzen, wurden je 2 ml Ciprofloxacin in drei Konzentrationen (5 x MIC, MIC und MIC/2) verwendet und 20 mg der Mikropartikel über 15 und 60 min darin inkubiert. Die Beladung fand bei 4°C und unter stetiger horizontaler Rotation der Proben statt, um die Stabilität des Antibiotikums sowie eine gute Durchmischung sicherzustellen. Die Beladungseffizienz (**Abbildung 7A**) wurde anschließend anhand der durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: HPLC) ermittelten Ciprofloxacin-Restkonzentration in den Überständen der Beladungslösungen bestimmt. Die Beladungseffizienz von CeMBG war mit 60-75% generell geringer im Vergleich zu GaMBG und

CaMBG und war für höhere Ciprofloxacin-Konzentrationen tendenziell geringer. Letzteres wurde auch für CaMBG beobachtet. GaMBG zeichnete sich unabhängig von der Konzentration durch eine konstant hohe Beladungseffizienz >90 % aus. Zwischen den beiden getesteten Inkubationszeiten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Beladungseffizienz, weshalb für die weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 15 min gewählt wurde.

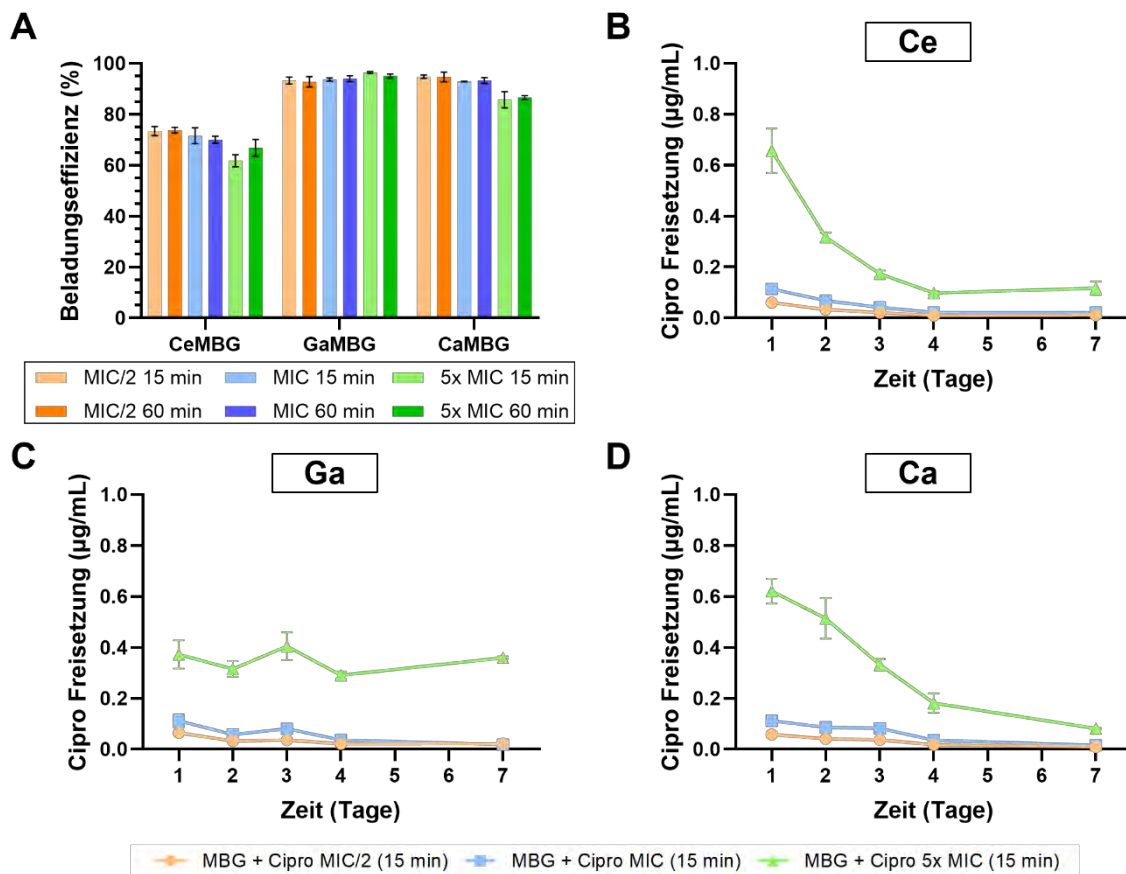


Abbildung 7: Ciprofloxacin Beladungseffizienz und Freisetzungprofil von Ciprofloxacin aus CeMBG, GaMBG und CaMBG. **(A)** Beladungseffizienz normiert auf die Beladungslösung in Abhängigkeit der Ciprofloxacin-Konzentration (5x MIC, MIC und MIC/2) und der Beladungszeit (15 und 60 min). Ciprofloxacin-Freisetzung in HPLM über sieben Tage aus **(B)** CeMBG, **(C)** GaMBG und **(D)** CaMBG nach Beladung in Lösungen mit 5x MIC, MIC bzw. MIC/2 für 15 min.

4.2 Untersuchung des Ciprofloxacin-Freisetzungsprofils

Für die Ciprofloxacin-Freisetzung wurden die beladenen MBG in HPLM (20 mg in 1 mL) inkubiert. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 erfolgte ein Mediumswechsel und in den abgenommenen Überstände wurde die Ciprofloxacin-Konzentration gemessen. Das Freisetzungprofil von Ciprofloxacin aus CeMBG (**Abbildung 7B**) war gekennzeichnet von einer starken initialen Freigabe und anschließend geringer werdenden Konzentrationen. Die Freisetzung aus GaMBG (**Abbildung 7C**) hingegen war anfänglich zwar geringer, blieb im Laufe des Versuchs jedoch vergleichsweise konstant. Für CaMBG

(**Abbildung 7D**) konnte ebenfalls der charakteristische „Burst-Release“ beobachtet werden, wobei der anschließende Rückgang weniger stark war als bei CeMBG. Entsprechend der Ähnlichkeit der Beladungseffizienzen für 15 bzw. 60 min Beladungszeit stimmten auch die jeweiligen Freisetzungprofile überein (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der kontinuierlicheren Freisetzung und höheren Beladungseffizienz wurde GaMBG für die abschließenden Versuche ausgewählt.

AP5	Ionen/Ionen- bzw. Ionen/Antibiotika-Kombinationen, die aus MBG freigesetzt werden: synergistische antibakterielle Wirkung und Zellverträglichkeit
Ziel:	Testung eines ausgewählten Wirkstofffreisetzungssystems auf Basis Ionen-modifizierter MBG hinsichtlich der Freisetzung antibakteriell wirksamer, zellverträglicher Dosen

Für diese Untersuchungen wurde GaMBG ausgewählt und gemäß des erarbeiteten Beladungsprotokolls für 15 min mit Ciprofloxacin in 2x MIC und MIC beladen. Es wurde eine größere Menge an Mikropartikeln (30 mg statt 20 mg pro mL) für diesen Versuch eingesetzt, um idealerweise eine Freisetzung an Ga³⁺-Ionen im antibakteriell wirksamen Konzentrationsbereich zu erreichen. Das beladene Glas wurde in 2 mL HPLM inkubiert; nach 1, 4 und 7 Tagen erfolgte ein Mediumswechsel und die entnommenen Extrakte wurden hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung in Wachstumskurven mit *E. coli* sowie ihrer Zellkompatibilität an hMSC zweier Spender untersucht. Als Referenz diente CaMBG (**Abbildung S8** im Anhang).

Die Ergebnisse der Wachstumskurven der Tage 1, 4 und 7 zeigten, dass die Ciprofloxacin-Freisetzung ausreichte, um das Wachstum der *E. coli* Bakterien deutlich zu hemmen (**Abbildung 8A**). Die Quantifizierung der Ciprofloxacin-Freisetzung bestätigte die zuvor gezeigte, weitestgehend gleichförmige Freigabe, die hier, im Gegensatz zu den vorherigen Messungen, von einem Maximum um Tag 4 gekennzeichnet ist, der von der Anreicherung über die Tage 2-4 ausgeht (**Abbildung 8B**). Basierend auf diesen Werten konnte mit einer Beladungskonzentration von 2x MIC eine Ciprofloxacin-Konzentration in den Überständen von ungefähr MIC/6 erreicht werden. Ein Vergleich mit den Positivkontrollen mit zudosiertem Antibiotikum in MIC/4 bzw. MIC/8 demonstriert eine etwas schwächere antibakterielle Wirkung der Extrakte. Ursachen dafür könnte beispielsweise die konstante Temperatur von 37°C während der Freisetzung aber auch das Milieu selbst sein, das die Aktivität des Antibiotikums reduziert. Eine synergistische Wirkung der aus dem MBG freigesetzten Ga-Ionen wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht beobachtet. Dies lässt sich mit den geringen Konzentrationen, die mit 0.03–0.05 mM (alle 3-4 Tage über die ersten 2 Wochen) im Bereich von MIC/32 lag, was nicht mehr ausreichend für eine synergistische Wirkung war.

Für die Beurteilung der Zellkompatibilität wurden die Extrakte als Medium für hMSC genutzt. Nach 7 Tagen Kultivierung mit einem Mediumswechsel erfolgt die Quantifizierung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) zur Bestimmung der Zahl vitaler Zellen – in **Abbildung 8C** sind die Werte bezogen auf die Kontrolle (Zellen wurde in Medium ohne Freisetzungsprodukte kultiviert) dargestellt. Die Freisetzungsprodukte aller MBG-Varianten scheinen die Zellproliferation zu beeinträchtigen, wobei dieser Effekt bei Zellen von Spender 2 stärker ausfiel.

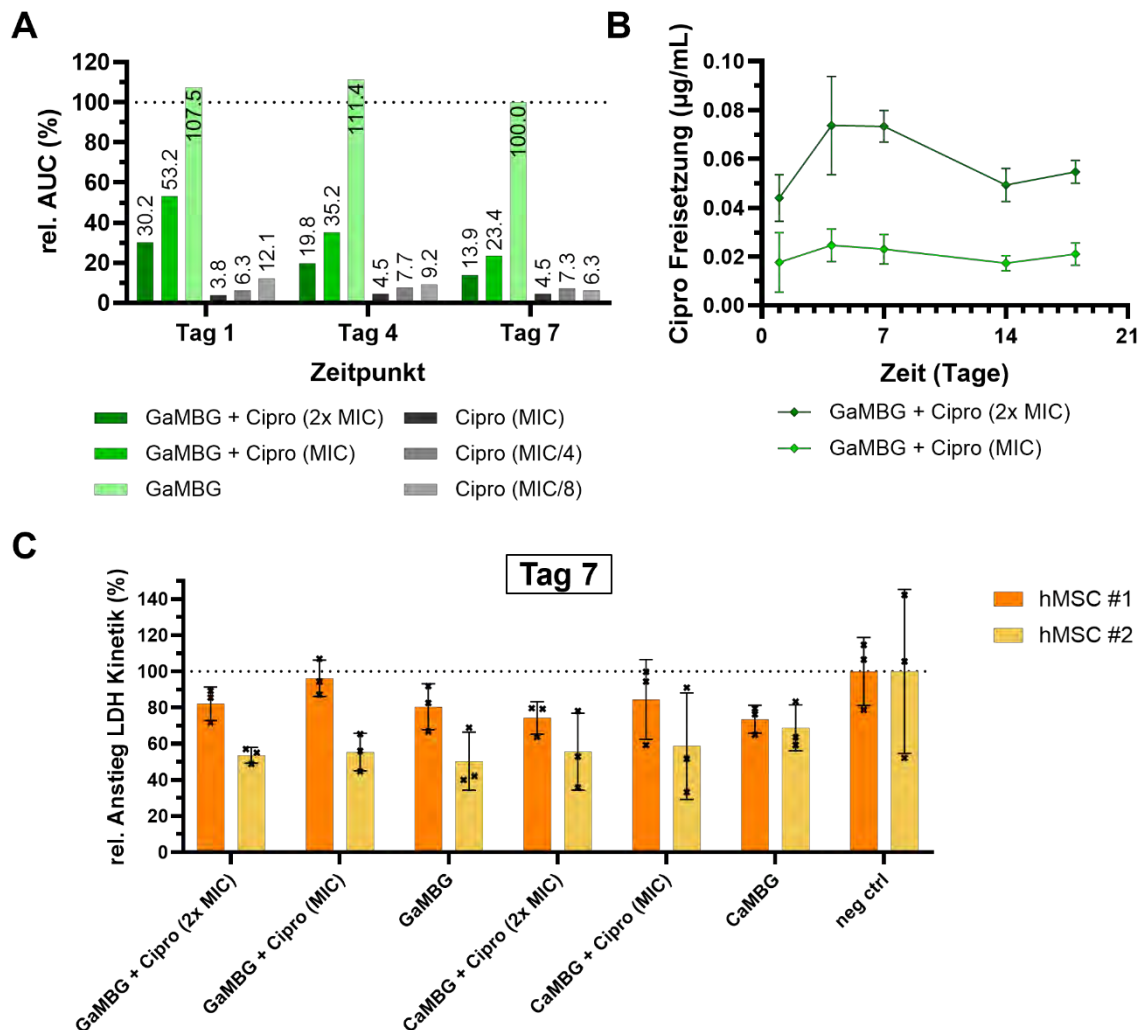


Abbildung 8: Antibakterielle Wirkung und Zellkompatibilität Ciprofloxacin-beladenen GaMBG. Nach Beladung mit Ciprofloxacin (in 2x MIC und MIC) wurde GaMBG für die Freisetzung in HPLM inkubiert. Überstände wurden auf antibakterielle und zytotoxische Wirkung untersucht. **(A)** Relative AUCs der *E. coli* Wachstumskurven nach gemeinsamer Inkubation von 140 µL Überstand und 10 µL Bakterien suspension. Unbeladenes GaMBG sowie zudosiertes Ciprofloxacin (Cipro MIC – MIC/8) als Referenz. **(B)** Freisetzungsprofil von Ciprofloxacin aus GaMBG beladen mit 2x MIC bzw. MIC. **(C)** Relativer Anstieg des Signals während der LDH-Messung als Maß für die Zellzahl von hMSCs zweier Spender nach 7 Tagen Inkubation mit Überständen der MBG-Proben bzw. HPLM + 5 % FCS (neg ctrl).

AP6	Applikation von antibakteriell wirksamen MBG als injizierbares Verbundmaterial – Erarbeitung eines Herstellungsprotokolls
Ziel:	Entwicklung eines injizierbaren Verbundmaterials aus MBG und klinisch etabliertem Fibrin-Gewebekleber

Kommerziell erhältlicher und klinisch zugelassener Fibrin-Kleber (Tisseel, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) wurde bereits zum Einbringen von Zellen oder Wirkstoffen in Knochendefekte verwendet [14–16]. Diese erfolgreichen Anwendungen bildeten die Grundlage für die Hypothese, dass sich Fibrin auch mit MBG zu einem multifunktionalen System zur lokalen Applikation und kontrollierten Freisetzung von Antibiotika und antibakteriell wirksamen Ionen kombinieren lässt. Dafür erarbeiteten wir ein Protokoll zur Herstellung von Fibrin-MBG-Kompositen – mit Fokus auf einen maximalen MBG-Gehalt ohne Beeinträchtigung die Injektionsfähigkeit des Komposits oder die effiziente Vernetzung des Fibrins. Im Rahmen der Versuche kam CaMBG als Modell zum Einsatz.

Der Tisseel-Kit besteht aus zwei Komponenten – Fibrinogen und Thrombin – die mittels eines coaxialen Systems injiziert werden und im Kontakt zueinander das Fibrin gel bilden. Als geeignete Komposit-Zusammensetzungen stellten sich eine Variante mit 200 mg CaMBG pro mL Fibrin, eingebracht in die Thrombin-Komponente des Kits, sowie eine Variante mit 300 mg pro mL heraus, bei der zusätzlich 100 mg in die Fibrinogen-Komponente gemischt wurden. Sowohl Fibrinogen als auch Thrombin wurden dabei 1:1 mit 0,9 % NaCl verdünnt, um eine Viskosität zu gewährleisten, die die Anwendung mit einer Spritze erlaubt, sowie um einen Anteil zu haben, der durch MBG ersetzt werden kann. Im Vergleich zu purem Fibrin, das sich während der Inkubation in HPLM bereits nach 10 Tagen zu zersetzen begann, zeigten Fibrin-MBG-Komposite eine erhöhte Stabilität und waren auch nach 14 Tagen noch strukturell intakt, während die Fibrinproben sich bereits weitestgehend zersetzt hatten.

Mit Blick auf die vorherigen Ergebnisse wurde auf eine Testung von mit Ciprofloxacin beladenem GaMBG in einem Komposit verzichtet. Wie entsprechende Versuche mit Bakteriophagen zeigten, ist eine Freisetzung aus solchen Fibrin-MBG Kompositen prinzipiell möglich, was eine weitere Charakterisierung und umfassende Testungen anregt.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Mittelpunkt des Projektes stand die Untersuchung von synergistischen Effekten von Kombinationen antibakterieller Wirkstoffe (Metallionen und Antibiotika), die eine Reduktion der Konzentrationen der einzelnen Komponenten ermöglichen und somit potenziell die Zellverträglichkeit erhöhen können.

Es wurden synergistisch wirksame Ionen/Ionen-Kombinationen identifiziert, die weit unterhalb der MIC (*minimal inhibitory concentration*) der einzelnen Ionen antibakteriell wirksam waren. Jedoch waren alle diese Kombinationen, trotz deutlich reduzierter Konzentration, immer noch zelltoxisch. Daher wurden Ionen/Ionen-Kombinationen bei der Herstellung von Verabreichungssystemen auf Basis mesoporöser bioaktiver Gläser (MBG) im Rahmen dieses Projektes nicht weiter betrachtet.

Die Kombination von Ionen und Antibiotika ergaben für Gentamicin synergistische Effekte mit Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen im Konzentrationsbereich unterhalb der MIC; aber auch diese Kombinationen erwiesen sich als zelltoxisch. Ciprofloxacin wirkte synergistisch mit Cu^{2+} -, Ga^{3+} - und Zn^{2+} -Ionen im Konzentrationsbereich unterhalb der MIC. Im Zelltoxizitätstest konnte lediglich für die Kombination von Ciprofloxacin und Ga-Ionen eine Zellverträglichkeit nachgewiesen werden. Entsprechend wurde diese Kombination für die Entwicklung eines kombinierten Freisetzungssystems auf Basis von MBG ausgewählt.

Durch Ersetzen der Ca^{2+} - durch Ga^{3+} -Ionen konnten Ga-modifiziertes MBG hergestellt werden, das die für die Beladung mit Antibiotika vorteilhafte mesoporöse Kanalstruktur aufwies. GaMBG erwies sich als zellverträglich und setzte konstant Ga^{3+} -Ionen frei, wenn auch in sehr geringen Konzentrationen. Hier muss in zukünftigen Arbeiten geprüft werden, ob die Freisetzung durch weitere Modifikation der Glaszusammensetzung oder Partikelgröße gesteigert werden kann.

Ga-modifiziertes MBG erwies sich außerdem als sehr vorteilhaftes Freisetzungssystem für Antibiotika. Nach Beladung wurde eine langanhaltende, nahezu konstante Freisetzung von Ciprofloxacin beobachtet (untersucht über 18 Tage); im Gegensatz dazu zeigte das Basis-MBG (CaMBG) sowie Ce-modifiziertes MBG eine initial sehr starke Freisetzung, gefolgt von einem starken Abfall. In zukünftigen Arbeiten sollte die Eignung von GaMBG als Freisetzungssystem für weitere klinisch relevante Antibiotika untersucht werden.

Zumindest unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte jedoch keine synergistische Wirkung von aus dem GaMBG freigesetzten Ga^{3+} -Ionen und nach Beladung freigesetztem Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Dies lag sehr wahrscheinlich an der zu niedrigen Konzentration an Ga^{3+} -Ionen, aber auch ebenfalls freigesetzte Silikat- und Phosphationen könnten einen Einfluss gehabt haben – diese Wechselwirkung kann in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Nichtsdestotrotz konnte ein deutlicher antibakterieller Effekt gegen *E. coli* beobachtet werden, was die Bedeutung des entwickelten GaMBG als vielversprechendes Freisetzungssystem für Antibiotika unterstreicht.

MBG-Mikropartikel können mit Fibrin zu einem injizierbaren Implantatmaterial kombiniert und somit einfach und sicher appliziert werden. Die Kombination mit Fibrin erlaubt zudem die Entwicklung dualer Wirkstofffreisetzungssysteme, bei denen beide Komponenten – MBG-Mikropartikel und Hydrogel – mit Wirkstoffen beladen werden können. Hieraus ergeben sich weitere interessante Fragestellungen für zukünftige Arbeiten zur Entwicklung verbesserter Ansätze für die Therapie Implantat-assoziiierter Infektionen.

Referenzen

- [1] Tiwari V, Mishra N, Gadani K, Solanki PS, Shah NA, Tiwari M. Mechanism of Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2018;9:1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01218>.
- [2] Qi M, Li W, Zheng X, Li X, Sun Y, Wang Y, et al. Cerium and Its Oxidant-Based Nanomaterials for Antibacterial Applications: A State-of-the-Art Review. *Front Mater* 2020;7:213. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00213>.
- [3] Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:1541–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>.
- [4] Graves JL, Ewunkem AJ, Ward J, Staley C, Thomas MD, Rhinehardt KL, et al. Experimental evolution of gallium resistance in *Escherichia coli*. *Evol Med Public Health* 2019;2019:169–80. <https://doi.org/10.1093/emph/eoz025>.
- [5] Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M, Frangipani E, Bernstein L, Visca P. Antimicrobial Activity of Gallium Compounds on ESKAPE Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:316. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00316>.
- [6] Bains F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J Funct Biomater* 2018;9:25. <https://doi.org/10.3390/jfb9010025>.
- [7] Wu C, Chang J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* 2012;2:292–306. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0121>.
- [8] Zhu H, Zheng K, Boccaccini AR. Multi-functional silica-based mesoporous materials for simultaneous delivery of biologically active ions and therapeutic biomolecules. *Acta Biomater* 2021;129:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.007>.
- [9] Renz N, Trampuz A. Pocket Guide zur Diagnostik und Behandlung von Implantat-assoziierten Infektionen nach Frakturversorgung 2019.
- [10] Liedtke J, Vahjen W. In vitro antibacterial activity of zinc oxide on a broad range of reference strains of intestinal origin. *Vet Microbiol* 2012;160:251–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.013>.
- [11] Wang Y, Li H, Yuan X, Jiang Y, Xiao Z, Li Z. Review of copper and copper alloys as immune and antibacterial element. *Trans Nonferrous Met Soc China* 2022;32:3163–81. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(22\)66011-4](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(22)66011-4).
- [12] Farias IAP, Santos CCLD, Sampaio FC. Antimicrobial Activity of Cerium Oxide Nanoparticles on Opportunistic Microorganisms: A Systematic Review. *BioMed Res Int* 2018;2018:1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/1923606>.
- [13] Guduric V, Belton N, Richter RF, Bernhardt A, Spangenberg J, Wu C, et al. Tailorable Zinc-Substituted Mesoporous Bioactive Glass/Alginate-Methylcellulose Composite Bioglasses. *Materials* 2021;14:1225. <https://doi.org/10.3390/ma14051225>.
- [14] Nowotny J, Farack J, Vater C, Johnsen M, Gelinsky M, Tonn T, et al. Translation of cell therapy into clinical practice: validation of an application procedure for bone marrow progenitor cells and platelet rich plasma. *J Appl Biomater Funct Mater* 2016;14:e1-8. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000255>.
- [15] Findeisen L, Bolte J, Vater C, Petzold C, Quade M, Müller L, et al. Cell spheroids are as effective as single cells suspensions in the treatment of critical-sized bone defects. *BMC Musculoskelet Disord* 2021;22:401. <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04264-y>.
- [16] Bolte J, Vater C, Culla AC, Ahlfeld T, Nowotny J, Kasten P, et al. Two-step stem cell therapy improves bone regeneration compared to concentrated bone marrow therapy. *J Orthop Res* 2019;37:1318–28. <https://doi.org/10.1002/jor.24215>.

Anhang

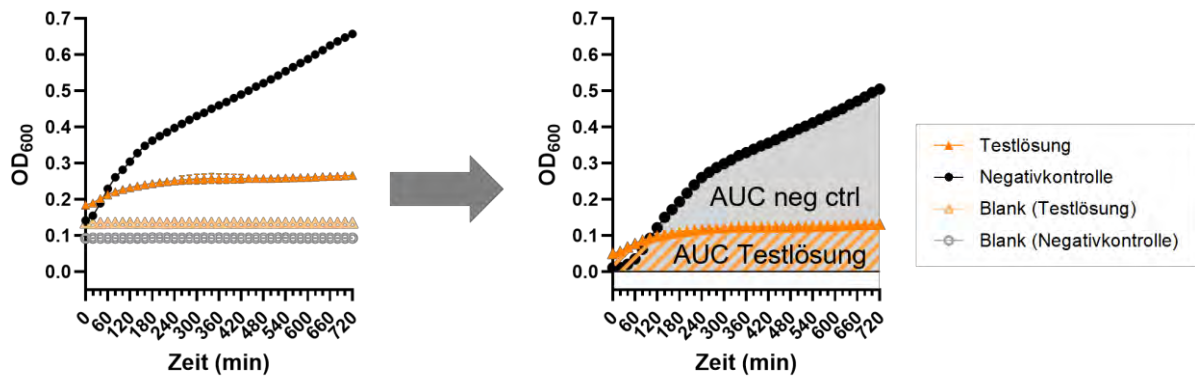


Abbildung S1: Bestimmung des AUC (*Area Under the Curve*) aus Wachstumskurve und Blank. Für jede getestete Ionen/Ionen- bzw. Ionen/Antibiotika-Kombination sowie die Negativkontrolle wurde in der Messung zusätzlich ein bakterienfreier „Blank“ mitgeführt. Die AUC ergibt sich aus der Differenz der Integrale der Wachstumskurve der Testlösung und des zugehörigen Blanks.

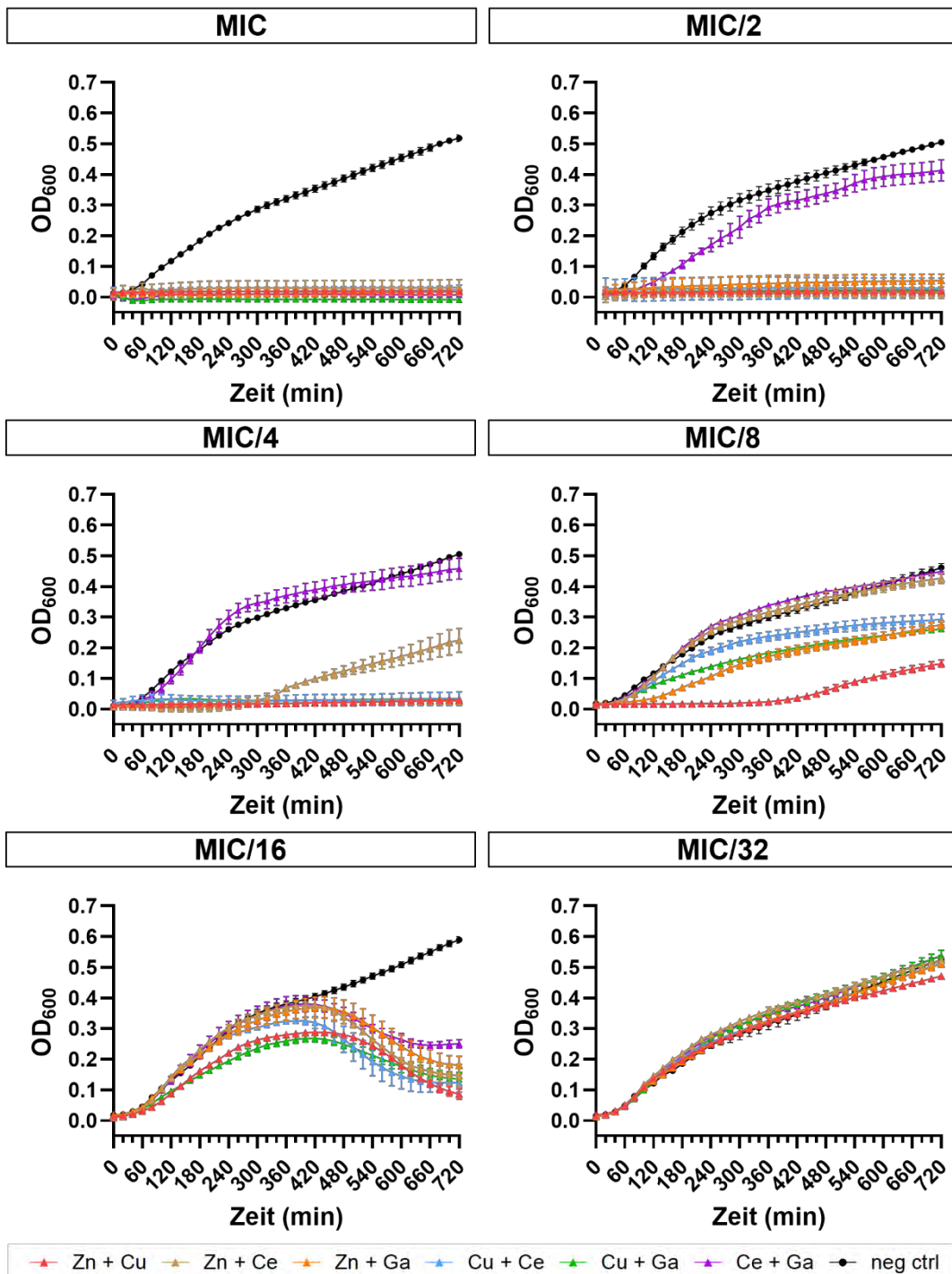


Abbildung S2: Wachstumskurven von *E. coli* nach Behandlung mit Ionen/Ionen-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 µL *E. coli*-Bakteriensuspension wurden mit 50 µL Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC – MIC/32). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O anstelle einer Testlösung verwendet.

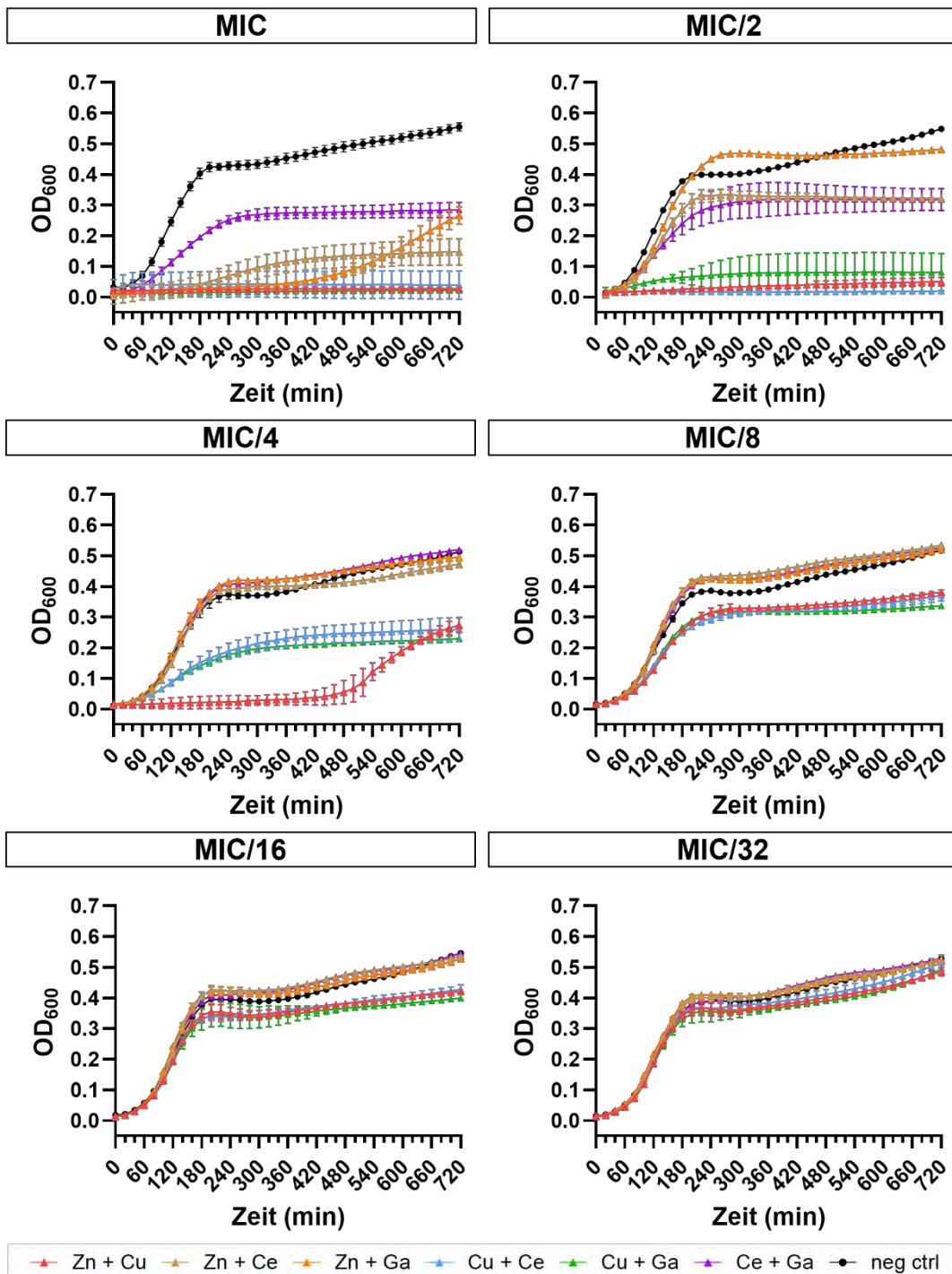


Abbildung S3: Wachstumskurven von *S. capitis* nach Behandlung mit Ionen/Ionen-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 µL *S. capitis*-Bakteriensuspension wurden mit 50 µL Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC – MIC/32). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O anstelle einer Testlösung verwendet.

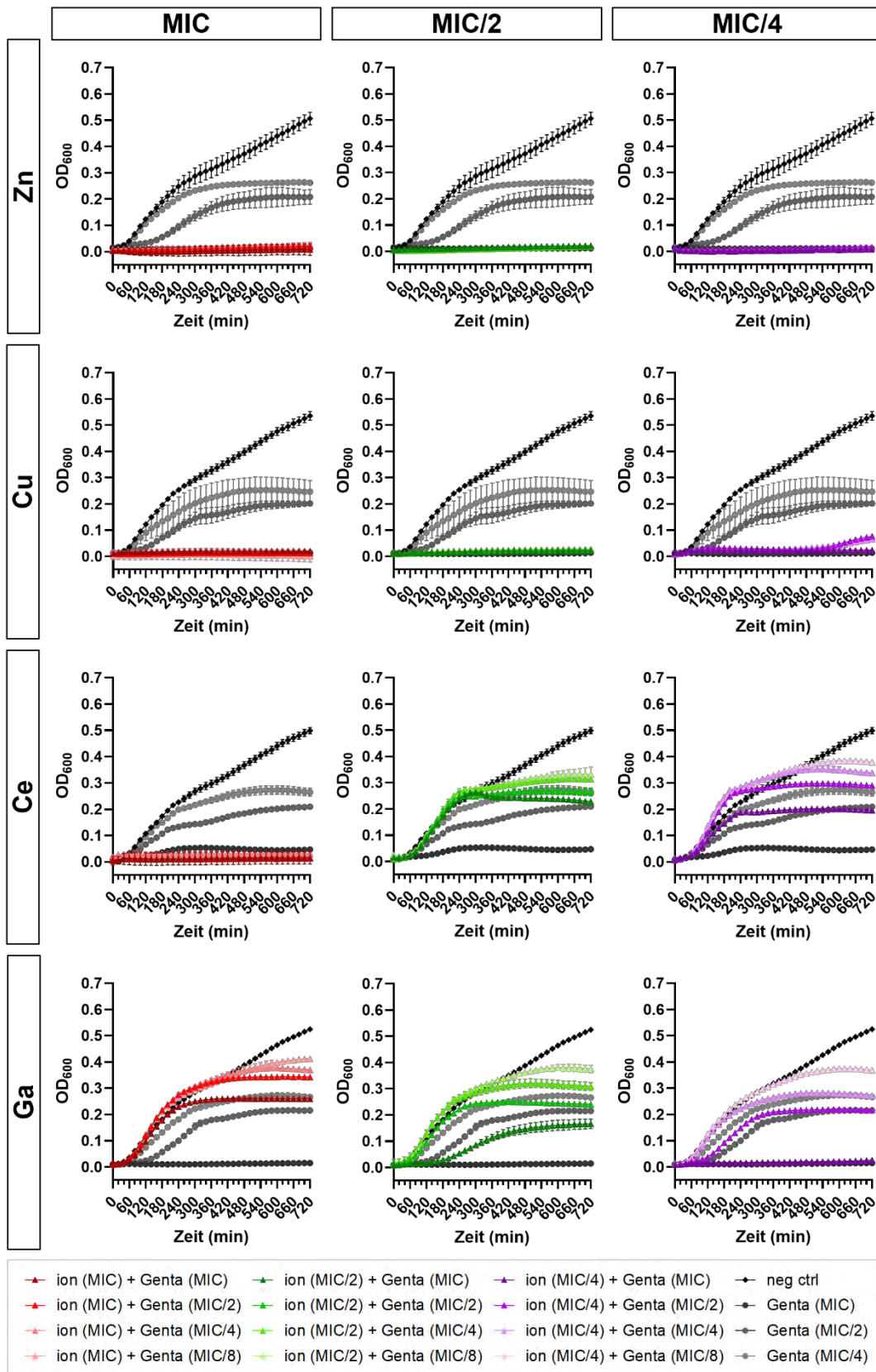


Abbildung S4: Wachstumskurven von *E. coli* nach Behandlung mit Ionen/Gentamicin-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 μ L *E. coli*-Bakteriensuspension wurden mit 50 μ L Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen und Gentamicin in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC – MIC/4 bzw. MIC – MIC/8). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O anstelle einer Testlösung verwendet.

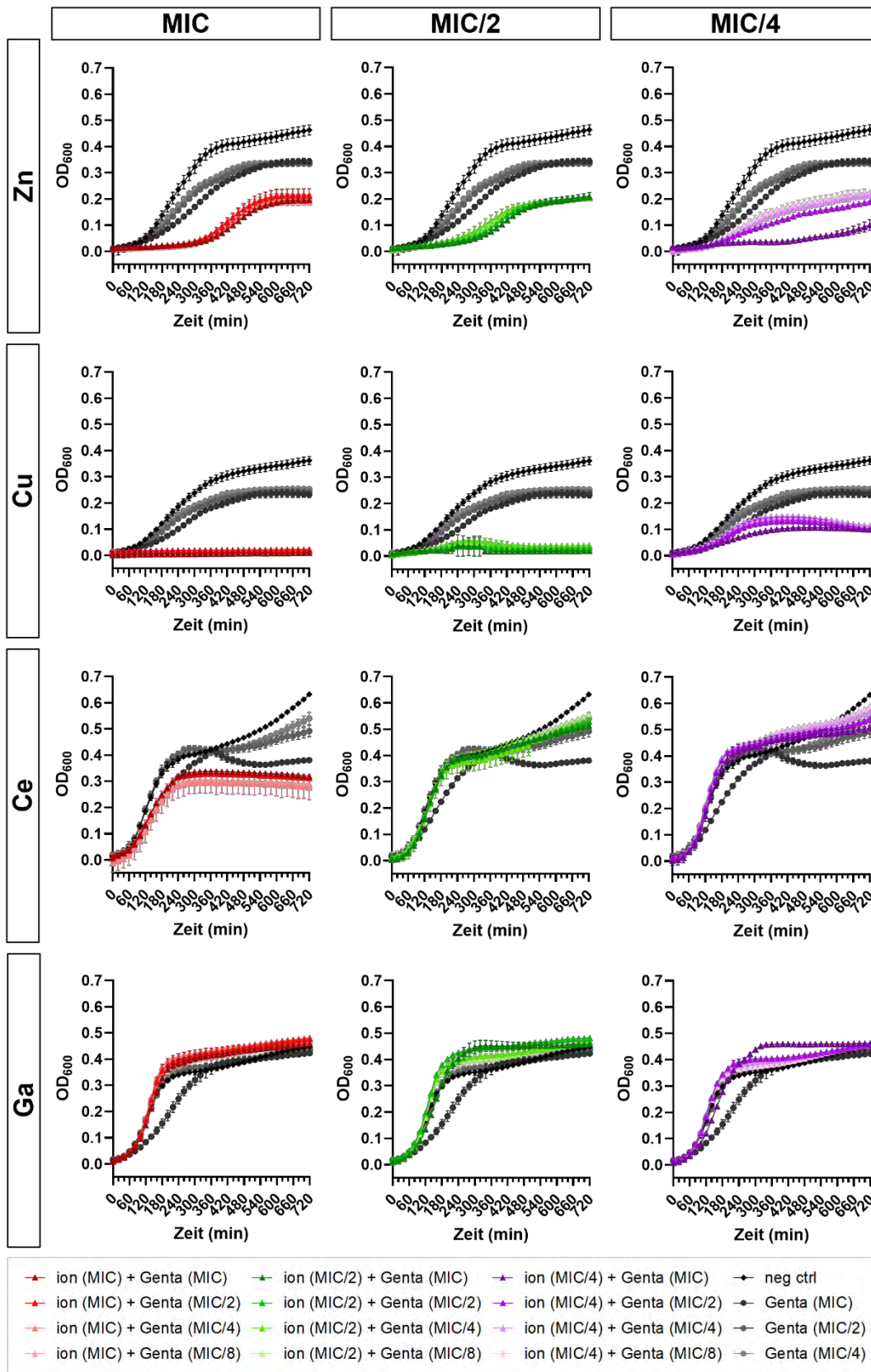


Abbildung S5: Wachstumskurven von *S. capitis* nach Behandlung mit Ionen/Gentamicin-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD_{600}) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 μ L *S. capitis*-Bakteriensuspension wurden mit 50 μ L Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen und Gentamicin in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC – MIC/4 bzw. MIC – MIC/8). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH_2O anstelle einer Testlösung verwendet.

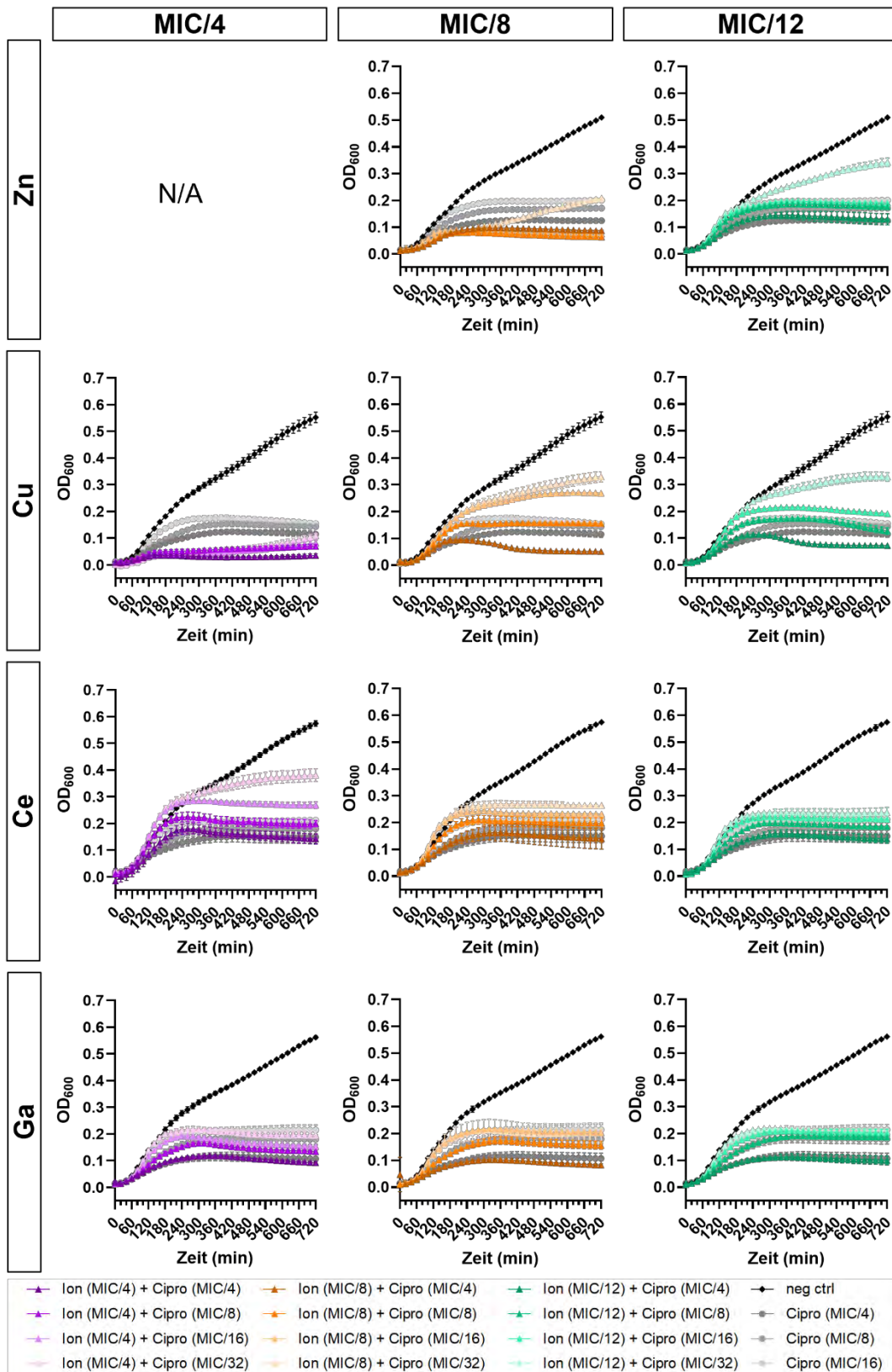


Abbildung S6: Wachstumskurven von *E. coli* nach Behandlung mit Ionen/Ciprofloxacin-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD_{600}) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 μ L *E. coli*-Bakteriensuspension wurden mit 50 μ L Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen und Ciprofloxacin in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC/4 – MIC/12 bzw. MIC/4 – MIC/32). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O anstelle einer Testlösung verwendet.

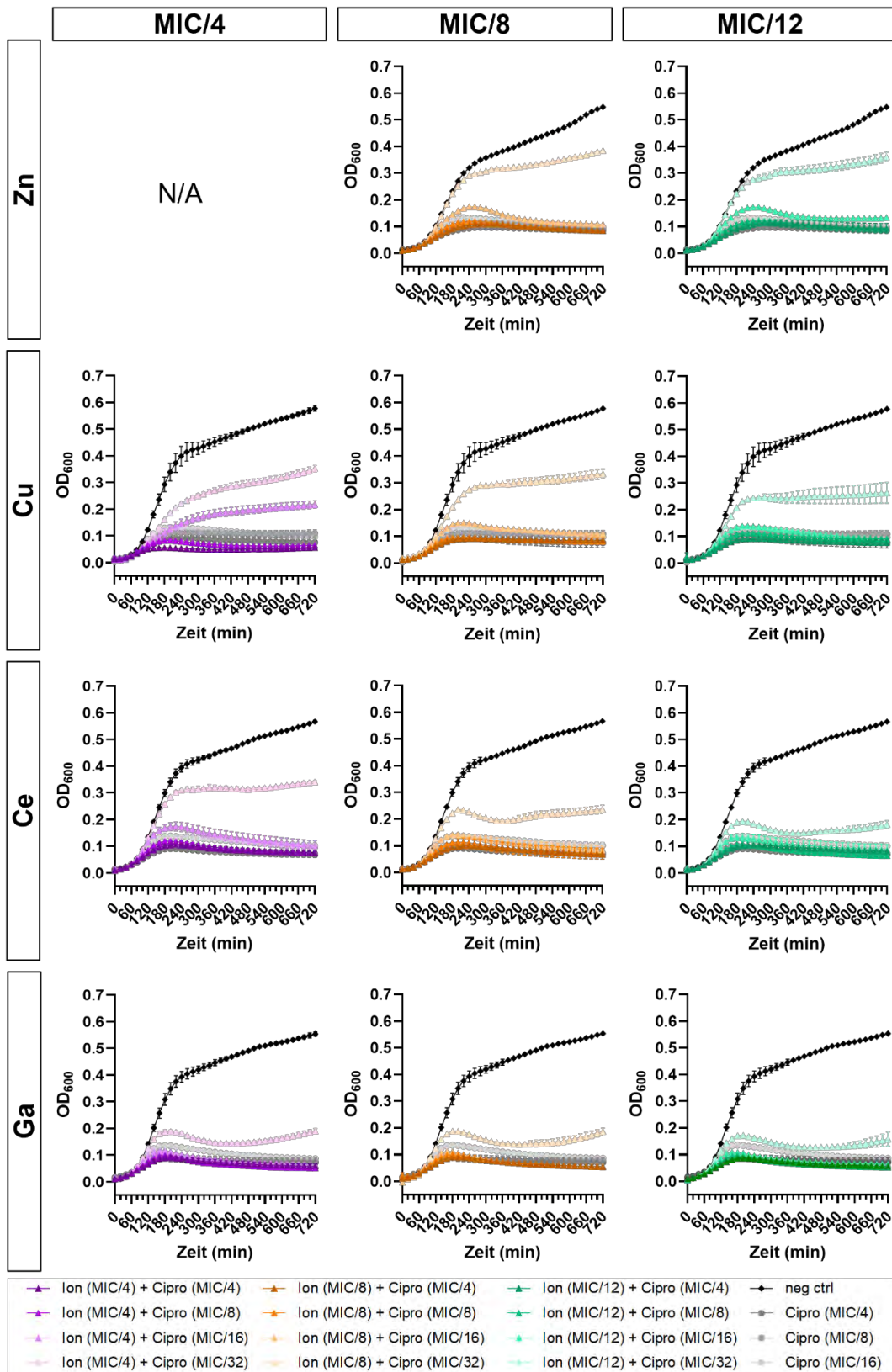


Abbildung S7: Wachstumskurven von *S. capitis* nach Behandlung mit Ionen/Ciprofloxacin-Kombinationen. Die Wachstumskurven (nach Abzug der Blanks) wurden durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD_{600}) über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Jeweils 100 μ L *S. capitis*-Bakteriensuspension wurden mit 50 μ L Testlösung behandelt, bestehend aus Kombinationen von Metallionen und Ciprofloxacin in unterschiedlichen Konzentrationen (MIC/4 – MIC/12 bzw. MIC/4 – MIC/32). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrolle wurde ddH_2O anstelle einer Testlösung verwendet.

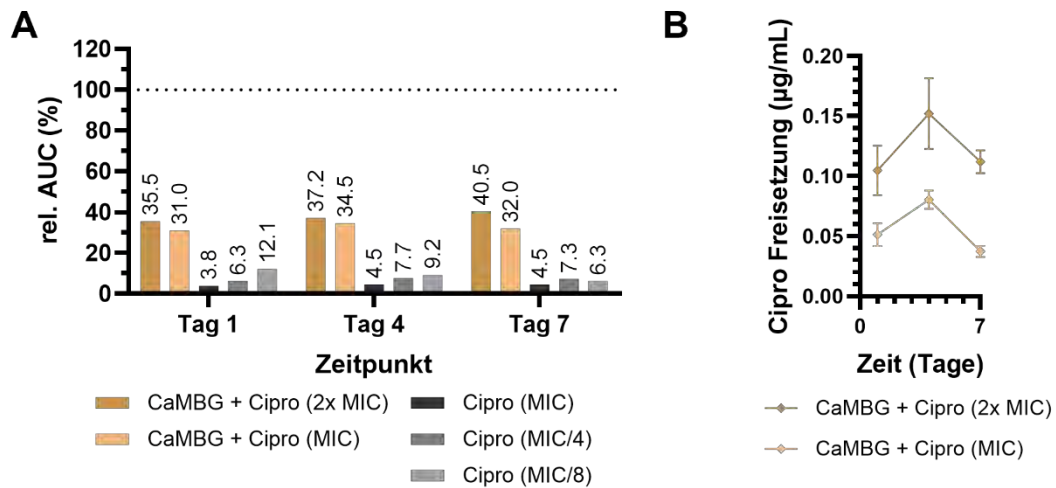


Abbildung S8: Antibakterielle Wirkung von Freisetzungserzeugnissen aus Ciprofloxacin-beladenen CaMBG und Ciprofloxacin-Freisetzung aus CaMBG. Nach Beladung mit Ciprofloxacin (in 2x MIC und MIC) wurde CaMBG für die Freisetzung in HPLM inkubiert und Überstände auf ihre antibakterielle Wirkung untersucht. **(A)** Relative AUCs der *E. coli* Wachstumskurven nach gemeinsamer Inkubation von 140 µL Überstand und 10 µL Bakteriensuspension. Zudosiertes Ciprofloxacin (Cipro MIC – MIC/8) als Referenz. **(B)** Freisetzungsprofil von Ciprofloxacin aus CaMBG beladen mit 2x MIC bzw. MIC.