

Entwicklung eines Antibiotika-Nasensprays für Mukoviszidose Patienten

A. Böing, M. Schurz, E. Meyle, T. Hoppe-Tichy
Apotheke des Universitätsklinikum Heidelberg, 69120 Heidelberg

Hintergrund

Chronische Infektionen der Atemwege sind ein großes Problem bei Mukoviszidose-Patienten, da der krankheitsbedingt zähflüssige Schleim schlecht abtransportiert werden kann und somit einen guten Nährboden für Bakterien darstellt. Hauptsächlich vorkommende Keime sind *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aerug.*). Besonders problematisch ist die Ausbildung eines Biofilms, denn dieser macht die Bakterien weniger sensibel gegenüber Antibiotika, was die Therapie erheblich erschwert. Da einige Patienten zum Teil nach einer Lungentransplantation kurze Zeit später wieder an einer Lungenentzündung erkranken, wird vermutet, dass der Nasen-Rachenraum und vor allem die Nasennebenhöhlen als Erregerreservoir dienen. Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer stabilen Antibiotika-Lösung, die auch Wirkung bei Biofilmen zeigt und als Nasenspray zur frühzeitigen Eindämmung der Kolonisation verwendet werden kann.

Material und Methoden

Entwickelt wurde eine Lösung mit einer Kombination aus Ciprofloxacin-HCl (CIP), Colistinsulfat (COL) und Acetylcystein (ACC), dessen mucolytische Eigenschaft die Wirkung auf Biofilme verbessert. Die Stabilität wurde jeweils bei pH 6 und 7, sowie Lagerung im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur überprüft. Kriterien waren pH-Wert sowie möglicher Verfärbungen und Präzipitate. Die Wirkung der stabilsten Lösung wurde in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung *in vitro* sowohl auf 24 h alte Biofilme als auch auf die Neubildung von Biofilmen von *S. aureus* getestet (ATCC-No.: 25923). Dazu wurden auf einer 96 Well Platte 24h alte Biofilme mit Antibiotiklösung versetzt, weitere 24 h bei 37°C bebrütet, und der Effekt mittels eines auf Fluoreszenzfarbstoffen basierenden Kits zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien gemessen. Die Auswirkung auf die Neubildung von Biofilmmasse wurde anhand eines Vergleiches der Menge des gebundenen Kristallvioletts (Farbstoffbindung proportional zur Masse des Biofilms) einer Probe nach 24h Bebrütung mit bzw. ohne Antibiotiklösung getestet.

Ergebnisse

Stabilität:

Die Lösung aus ACC 20 mg/ml; Ciprofloxacin 0,2 mg/ml und Colistin 1 mg/ml und bei pH 6 und Lagerung bei Raumtemperatur erwies sich über 4 Wochen als ausreichend stabil (vgl. Abb. 1) und wurde *in vitro* gegen *S. aureus* Biofilme getestet.

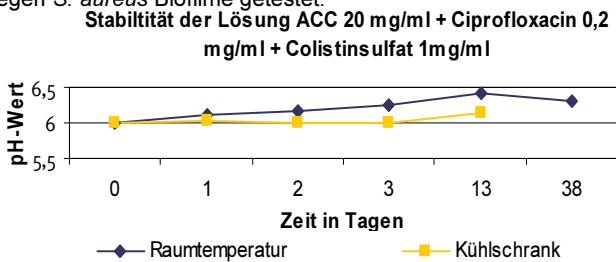


Abb. 1. Stabilität der Antibiotika-Lösung anhand des pH-Wertes; Bei der Lösung im Kühlschrank hatte sich nach etwa 2 Wochen ein Niederschlag gebildet, daher wurde nicht weiter gemessen

Antibiotische Wirkung:

Die 1:10-Verdünnung ergab eine Abtötung der Biofilmbakterien um 28% gegenüber unbehandelten Biofilmen. Die 1:100-Verdünnung wies keinen antibiotischen Effekt auf. In den bisher getesteten Konzentrationen ist die abtötende Wirkung somit nur gering. Auf die Biofilmbildung zeigten beide Verdünnungen eine starke Hemmung von je 90%. Weitere Stabilitätsnachweise sowie die Korrelation zur *in vivo* Wirksamkeit stehen noch aus.

Tabelle 1: Effekt auf 24h alte Biofilme. Aufgeführt sind die in vier Versuchsreihen fluorimetrisch bestimmten Quotienten lebende/tote Bakterien, sowie die daraus berechnete prozentuale Abtötung. Die Antibiotiklösung wurde hierzu 1:10 und 1:100 verdünnt zugegeben und weiter 24h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, 48h alte Biofilme.

Effekt der Antibiotika-Lösung auf 24 h alte Biofilme						
	Verd. 1:10	Kontrolle	Abtötung [%]	Verd 1:100	Kontrolle	Abtötung [%]
1	19,657	25,607	23,24	27,92	26,35	0
2	13,132	19,33	32,06	17,57	17,26	0
3	21,177	31,641	33,07	31,626	28,585	0
4	24,94	33,219	24,92	28,74	29,388	0

Tabelle 2: Hemmung der Biofilmbildung. Aufgeführt sind die in vier Versuchsreihen gemessenen Absorptionen von Kristallviolett bei 570nm, sowie die daraus berechnete prozentuale Inhibition der Biofilmbildung. Die Antibiotiklösung wurde hierzu 1:10 und 1:100 verdünnt.

Effekt der Antibiotika-Lösung auf die Hemmung der Biofilmbildung

	Verd. 1:10	Kontrolle	Hemmung [%]	Verd 1:100	Kontrolle	Hemmung [%]
1	0,0909	0,5829	84,41	0,0861	0,7951	89,17
2	0,0955	1,1637	91,79	0,0946	1,528	93,81
3	0,0918	0,5001	81,64	0,0986	0,4445	77,82
4	0,0734	0,4429	83,43	0,0668	0,3424	80,49

Effekt der Antibiotika-Lösung auf die Hemmung der Biofilmbildung

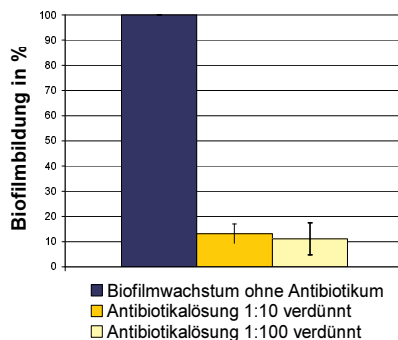


Abb. 2: Effekt auf die Hemmung der Biofilmbildung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus vier individuellen Versuchsreihen inklusive Standardabweichungen. Die gebildete Biofilmmasse ohne Antibiotiklösung wurde als 100% gesetzt.

Fazit

Die Nasenspray-Antibiotiklösung stellt einen vielversprechenden Ansatz vor allem zur Prophylaxe von Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose-Patienten dar. Die lokale Applikation ist durch die potentiell hohe verfügbare Wirkstoffmenge besonders gegen Biofilme mit niedriger Antibiotikasensitivität wirksam. Die Wirksamkeit auf Biofilme anderer Problemkeime (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) sollte weitergehend untersucht werden.