

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ORTHOPÄDIE  
PROF. DR. MED. DR. H.C. JOACHIM GRIFKA  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PLASMA- UND GEWEBEKONZENTRATIONEN VON LINEZOLID BEI  
PERIPROTHETISCHEN INFEKTIONEN IN RATTEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Bauer Michael

2012



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ORTHOPÄDIE  
PROF. DR. MED. DR. H.C. JOACHIM GRIFKA  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PLASMA- UND GEWEBEKONZENTRATIONEN VON LINEZOLID BEI  
PERIPROTHETISCHEN INFEKTIONEN IN RATTEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Bauer Michael

2012

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Joachim Grifka
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter Angele
Tag der mündlichen Prüfung:	13.11.2012

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1. Einleitung .....	1
1.1. Die Rolle des Tiermodells in der Entwicklung neuer Antibiotika.....	1
1.2. Implantatassoziierte Infektionen .....	2
1.2.1 Epidemiologie .....	2
1.2.2 Therapie und Erregerspektrum .....	2
1.2.3 Pathophysiologie und Pathomechanismus.....	3
1.3. Linezolid .....	4
1.3.1 Struktur und physiochemische Eigenschaften.....	4
1.3.2 Pharmakokinetische Eigenschaften .....	5
1.3.3 Wirkmechanismus und pharmakodynamische Eigenschaften .....	6
1.3.4 Unerwünschte Medikamentenwirkung / Medikamenteninteraktion.....	7
1.3.5 Klinische Anwendung .....	8
1.4. Aufgabenstellung / Zielsetzung .....	8
2. Material und Methoden .....	10
2.1. Tierversuch.....	10
2.1.1 Versuchstiere und Haltung .....	10
2.1.2 Ausschluss- und Abbruchkriterien .....	10
2.1.3 Vorbereitung der Operation und Narkose der Tiere.....	11
2.1.4 Operation / Implantation des Marknagels.....	12
2.1.5 Postoperative Verabreichung des Linezolid .....	13
2.1.6 Tötung und Organentnahme .....	13
2.1.7 Material .....	14
2.2. Bestimmung von Linezolid mit Hilfe der HPLC .....	15
2.2.1 Messprinzip und Geräteaufbau .....	15
2.2.1 Herstellung der Standardlösung .....	17
2.2.2 Probenaufbereitung .....	17
2.2.3 Validierung der HPLC-Methode.....	19
2.2.3.1 Selektivität und Spezifität.....	19
2.2.3.2 Linearität .....	20

2.2.3.3 Präzision.....	20
2.2.3.4 Empfindlichkeit.....	21
2.2.3.5 Wiederfindung .....	22
3. Ergebnisse .....	23
3.1. Analytische Kennzahlen der Bestimmung von Linezolid in biologischer Matrix .....	23
3.1.1 Spezifität und Selektivität .....	23
3.1.2 Linearität .....	26
3.1.3 Präzision.....	27
3.1.4 Empfindlichkeit .....	27
3.1.5 Wiederfindung.....	28
3.2. Linezolidkonzentration im Plasma und Gewebe.....	28
3.2.1 Plasmakonzentration von Linezolid .....	29
3.2.2 Konzentration im Gewebe.....	30
3.2.3 Gewebe-Plasma-Relationen von Linezolid.....	32
3.2.4 Unterschied infizierte und nichtinfizierte Seite .....	33
3.2.5 Bezug zur minimalen Hemmkonzentration .....	33
4. Diskussion .....	34
4.1. HPLC-Methode zur Bestimmung von Linezolid .....	34
4.2. Anwendung des Tiermodells für Linezolid.....	34
4.2.1 Verwendete Dosisschemata.....	35
4.2.2 Ergebnisse im Vergleich .....	37
4.2.3 Pharmakokinetik bei Ratten .....	38
4.2.4 Minimale Hemmkonzentration .....	38
4.3. Folgeversuche.....	38
4.3.1 Höhere Erfolgsraten mit Linezolid gegenüber Vancomycin bei MRSA-bedingten Pneumonie auf periprothetische Infektionen übertragbar .....	39
5. Zusammenfassung .....	40
6. Literaturverzeichnis .....	41
7. Abkürzungsverzeichnis .....	48
8. Anhang.....	51
8.1. Abbildungsverzeichnis:.....	51
8.2. Tabellenverzeichnis:.....	52
9. Curriculum vitae .....	54

10. Danksagung ..... 56

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Rolle des Tiermodells in der Entwicklung neuer Antibiotika

Zwei Meilensteine in der Geschichte der Antibiotikatherapie sind direkt Tierexperimenten mit Infektionen zuzuordnen.

Die Entdeckung, dass der Farbstoff (Sulfamidochrysoidin, Prontosil), der *in vitro* keine antibakterielle Wirkung zeigt, effektiv gegen Pneumokokkeninfektionen in Mäusen wirkt <sup>1</sup>, bewies zum Einen, dass systemische bakterielle Infektionen durch Medikamente behandelt werden können und zum Anderen, dass *in vivo* Versuche in der Antibiotikaforschung unverzichtbar sind.

Auch die therapeutische Wirkung von Penicillin wurde in Tierexperimenten entdeckt. Fleming nutzte Penicillin nur um Kulturen zu differenzieren und gelegentlich als lokales Antiseptikum. Erst zehn Jahre später, 1938, reinigten Florey und Chain die Substanz und untersuchten die therapeutische Wirkung an Mäusen und später auch am Menschen<sup>2</sup>.

So ist es leicht nachvollziehbar, dass jede neue Antibiotikumentwicklung nicht ohne Verifizierung ihrer antimikrobiellen Effektivität am Tiermodell auskommt.

In den Leitlinien für die klinische Evaluation von antiinfektösen Medikamenten, gelten tierexperimentelle Evaluationen für neue Präparate (oder neue Kombinationen) als Voraussetzung für klinische Studien. Besonders pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften und Wirksamkeit sollten in Tiermodellen, die menschliche Infektionen simulieren, gezeigt werden. Daten aus Tierexperimenten können nicht direkt auf den Menschen übertragen werden, sie sollten aber der klinischen Anwendung vorausgehen und zur weiteren Planung von klinischen Studien herangezogen werden <sup>3</sup>. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten sich *in vivo* Versuche an Tieren an klinisch vorherrschenden Infektionen und klinischen Behandlungsschemen orientieren <sup>4</sup>.

## 1.2. Implantatassoziierte Infektionen

### 1.2.1 Epidemiologie

Trotz aller Bemühungen zur Vermeidung von Infektionen durch bedeutende technische und pharmakologische Errungenschaften (z. B. verbesserte perioperative Antibiotikaphylaxe, antibiotikahaltiger Zement, verkürzte Operationszeiten, „laminar.air-flow“-Technik), ist bei der Primärimplantation in über 30 % mit einer intraoperativen Kontamination zu rechnen<sup>5</sup>. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Mehrzahl aller Protheseinfektionen bereits während der Operation durch bakterielle Verunreinigungen erworben werden<sup>6</sup>.

Bei Hüft-, Knie und Schulter-Gelenkersatz treten klinisch manifeste Infektionen mit einer Häufigkeit von 1 bis 2 % auf, nach der Implantation von Ellenbogen- und Sprunggelenksendoprothesen ist mit einer Inzidenz von 3 bis 6 % zu rechnen<sup>7-9</sup>.

Viele der in der Literatur beschriebenen aseptischen Lockerungen sind, wahrscheinlich in Wirklichkeit septische Lockerungen<sup>10</sup>, da aus OP-Präparaten „aseptischer Lockerungen“ von Hüftgelenksendoprothesen in 76 % der Fälle eine bakterielle Besiedlung nachgewiesen werden konnte<sup>11</sup>.

Obwohl die Infektionsrate in den letzten Jahrzehnten massiv gesenkt werden konnte, wird die Fallzahl implantatassoziiertes Infektionen demographisch bedingt weiter ansteigen<sup>7</sup>. Die daraus resultierende steigende Anzahl von Wechseloperationen, die ein höheres Infektionsrisiko<sup>12</sup> bergen, werden die Gesamtzahlen der Endoprotheseninfektionen zusätzlich weiter ansteigen lassen.

### 1.2.2 Therapie und Erregerspektrum

Die Therapieoptionen bei Protheseninfektion sind begrenzt. Bei einer Frühinfektion in den ersten 6 bis 12 Wochen ist unter Umständen ein Prothesenerhalt möglich. Neben einer hochdosierten Langzeitantibiose und intensivem Débridement besteht als letztes Mittel meist nur der Prothesenwechsel. In der Folge kann sogar eine Arthrodesse oder Amputation der Extremität notwendig sein<sup>7</sup>.

Die häufigsten Erreger von Protheseninfektionen sind koagulase-positive Staphylokokken (z. B. *Staphylococcus aureus*). Auf Polymeren sind hauptsächlich koagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*) und auch gram-negative Keime (*Pseudomonas*

*aeruginosa*, Enterokokken) nachweisbar. In nahezu dreißig Prozent der Fälle liegt eine polymikrobielle Infektion vor und es lassen sich mehrere verursachende Keime nachweisen<sup>13;14</sup>.

Der umfangreiche Antibiotikaeinsatz führt zu einem starken Selektionsdruck, der die Entstehung und Ausbreitung resistenter Bakterien begünstigt. Besonders kritisch ist die Zunahme mehrfach resistenter Erreger, wie z. B. des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). In einer orthopädischen Klinik beträgt die Inzidenz von MRSA-Trägern bis zu 5,3 %<sup>15</sup> und in dieser Gruppe beträgt das Risiko eine MRSA-Infektion zu entwickeln bis zu 30 %<sup>16;17</sup>. Gleichzeitig nimmt auch die Resistenz gegenüber anderen Antibiotika zu, was auf Kreuzresistenzen von MRSA gegen andere Wirkstoffklassen, wie Fluorchinolone und Makrolide, zurückzuführen ist<sup>18</sup>.

Die Behandlung ist hier nochmals erschwert und gelingt häufig nur noch mit dem Reserveantibiotikum Vancomycin, was den Selektionsdruck weiter erhöht. So zeigen Enterokokken, insbesondere *Enterococcus faecium*, eine deutliche Zunahme der Resistenz. 2007 lag die Prävalenz von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*-Stämmen (VRE) bei 15,3%<sup>19</sup>.

Zusätzlich treten durch die schlechtere Behandlungsmöglichkeit vermehrt Komplikationen auf und das Outcome ist deutlich schlechter<sup>20</sup>. Auch die erheblichen Behandlungskosten für Infektionen von Endoprothesen steigen bei dem Nachweis von MRSA nochmals enorm an<sup>21;22</sup>.

### 1.2.3 Pathophysiologie und Pathomechanismus

Nach einer Kontamination adhären die Keime mit Hilfe ihrer Kapsel an das Implantat. Dort bilden sie sessile Kolonien, welche sich durch einen bis zu 40µm dicken Biofilm vor dem körpereigenen Abwehrsystem schützen<sup>14;23;24</sup>. Das Immunsystem kann Keime nur während der planktonischen Phase eliminieren und so die Infektion kontrollieren, so dass es nicht zu klinischen Symptomen kommt. Kommt es zur Bildung von sessilen Kolonien, kommt es zu einer Infekt-Exazerbation mit Ausbildung von Abszessen, Fisteln und Osteitiden. Zusätzlich ist die lokale Immunkompetenz durch das Implantat drastisch herabgesetzt. Dies kann sowohl durch das Design (Hohlnagel, solider Nagel) als auch das Material (Titan, Edelstahl) beeinflusst werden<sup>25;26</sup>. Bereits 1982 wurde in Tierversuchen gezeigt, dass sich die zur

Infektmanifestation erforderliche Keimmenge, nach Fremdkörperimplantation um den Faktor  $10^5$  reduziert<sup>27</sup>.

## 1.3. Linezolid

Mit den Oxazolidinonen, deren wichtigste Substanz das Linezolid ist, ist eine völlig neue Stoffklasse vollsynthetischer Chemotherapeutika auf den Markt gekommen. Linezolid wurde im Jahre 2001 in Deutschland und in einigen europäischen Ländern unter dem Handelsnamen Zyvoxid® als Infusion, Filmtablette und Granulat zur Herstellung einer Suspension zur oralen Anwendung zugelassen.

### 1.3.1 Struktur und physiochemische Eigenschaften

Abbildung 1 zeigt die Strukturformel von Linezolid. Es handelt sich um {(S)-N-[[3-[3-Fluoro-4-(4-Morpholinyl)Phenyl]-2-Oxo-5-Oxazolidinyl]-Methyl]-Acetamid}, ein weißlich bis gelbliches kristallines Pulver. Sein Schmelzpunkt liegt bei 175°C, Kristallveränderungen finden bei 155 °C statt.

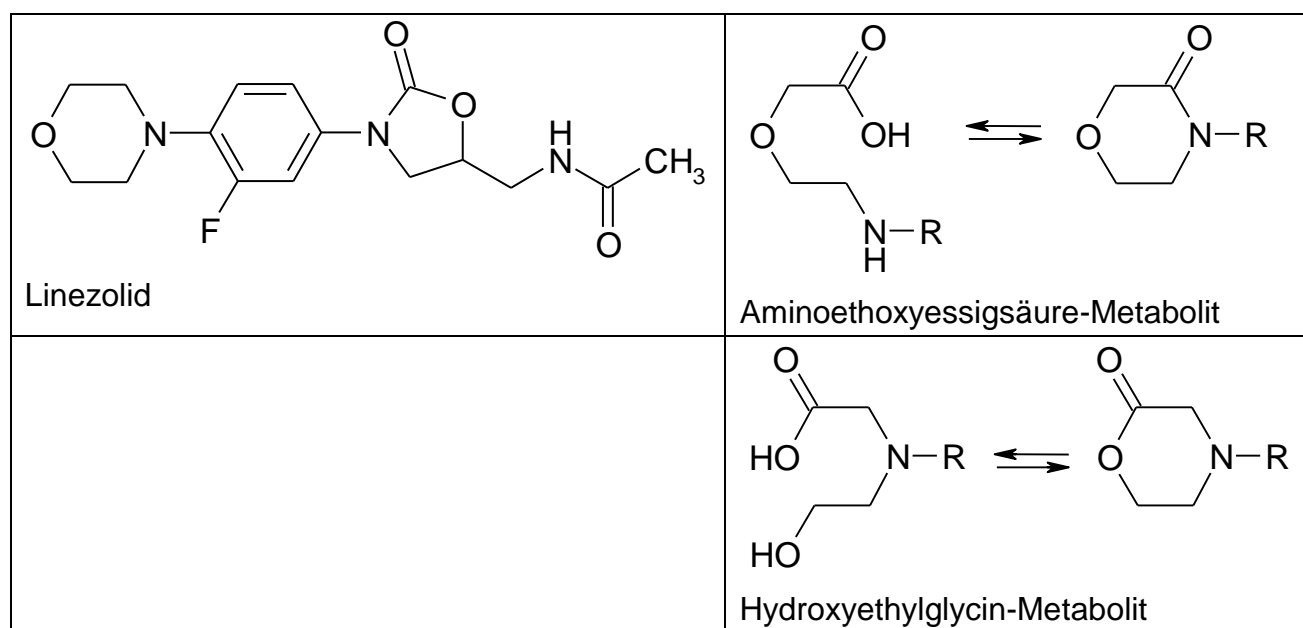


Abbildung 1: Chemische Struktur von Linezolid und seiner Hauptmetaboliten, die durch oxidative Spaltung des Morpholin-Rings entstehen. In wässriger Lösung liegt ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen den Carbonsäuren und der Lacton- bzw. Lactam-Struktur vor.

Bei pH-Werten zwischen 5 und 9 löst sich Linezolid nur sehr gering in Wasser (3,2 µg/l). Die Löslichkeit verbessert sich bei pH-Werten unter 3 und mit steigender Temperatur. Das Molekül liegt bei physiologischem pH-Wert in neutraler, ungeladener Form vor. Die

Lipophilie, die durch den Verteilungskoeffizient zwischen n-Octanol und Wasser charakterisiert wird, beträgt bei einem pH-Wert von 7,4 für Linezolid 0,55<sup>28</sup>.

### 1.3.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Nach oraler Anwendung wird Linezolid nahezu vollständig und rasch resorbiert. Die Maximalkonzentrationen werden innerhalb 1 bis 2 Stunden gemessen, die orale Bioverfügbarkeit beträgt 100 %<sup>29;30</sup>. Dadurch kann Linezolid oral und intravenös in gleicher Dosis verabreicht werden. Die Bioverfügbarkeit wird von der Nahrungsaufnahme nur gering, klinisch irrelevant beeinflusst (3,4 % Unterschied in der AUC)<sup>30;31</sup>. Linezolid bindet konzentrationsunabhängig relativ gering (31%) an Plasmaproteine, was für eine gute Gewebepenetration spricht<sup>32</sup>. Das Verteilungsvolumen ist mittel-hoch und beträgt im Steady State bei Erwachsenen 40 bis 50 l (0,75-0,7 l/kg KG), was dem Volumen des Gesamtkörperwassers entspricht<sup>32</sup>.

Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 5 bis 7 Stunden, wobei die Gesamtkörperclearance einer großen interindividuellen Schwankungsbreite (100-200 ml/min) unterliegt.

Linezolid wird in der Leber intensiv durch oxidative Spaltung des Morpholin-Rings verstoffwechselt<sup>31;33</sup>. Dabei entstehen ein Hydroxyethylglycin-Metabolit und ein Aminoethoxyessigsäure-Metabolit<sup>34</sup> (vgl. Abbildung 1). Beide Abbauprodukte zeigen keine eigene antimikrobielle Wirksamkeit.

Die Elimination erfolgt hauptsächlich renal, 30 % der Dosis als unveränderte Muttersubstanz, 40 % als Hydroxyethylglycin-Metabolit und 10 % als Aminoethoxyessigsäure-Metabolit. Lediglich 12 % erscheinen als Metaboliten in den Fäzes<sup>28</sup>. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz wurde auf Grund der hohen metabolischen Clearance keine signifikante Änderung der Gesamtclearance beobachtet. Eine Dosismodifikation ist daher bei eingeschränkter Nierenfunktion nicht empfohlen<sup>35</sup>.

### 1.3.3 Wirkmechanismus und pharmakodynamische Eigenschaften

Oxazolidinone wirken bakteriostatisch<sup>36;37</sup>. Bei hohen Konzentrationen wurde mit einigen *Streptococcus*-Stämmen auch eine langsame bakterizide Aktivität beobachtet<sup>36</sup>. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung der Proteinsynthese. Etablierte Proteinbiosyntheseinhibitoren, wie Aminoglykoside, Makrolide oder Tetracycline, greifen während des Elongationszyklus ein, um die Verlängerung der Polypeptidkette zu unterbinden. Linezolid greift in einem sehr frühen Stadium der Synthese ein. Es bindet spezifisch an die 23S rRNA der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms, wobei die Bildung eines funktionstüchtigen 70S-Initiationskomplexes aus N-Formyl-Met-tRNA, Ribosom und mRNA verhindert wird<sup>38;39</sup>. Zusätzlich wird auch ein Einfluß auf die Elongation und die Translokation sowie die Bindung von Linezolid an weitere Stellen des Ribosoms diskutiert<sup>40;41</sup>. Molekularbiologische Details des Wirkmechanismus sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Das Wirkspektrum von Linezolid umfasst im Wesentlichen grampositive aerobe und anaerobe Bakterien. Dazu gehören auch MRSA, VRE und Penicillin resistenter *Streptococcus pneumoniae*<sup>42;43</sup>. Eine Aktivität gegen Mycobakterien konnte in einigen *In-vitro*-Untersuchungen belegt werden<sup>44-47</sup>, ein klinischer Einsatz findet hier bereits statt. Bei gramnegativen Bakterien zeigte sich keine oder nur mäßige Wirkung von Linezolid, diese scheinen eine natürliche Resistenz zu besitzen<sup>33</sup>.

Der MIC-Wert liegt für Staphylokokken (MSSA, MRSA, MSSE, MRSE) zwischen 1 und 4 mg/L und ist damit gut vergleichbar mit Clindamycin und Vancomycin. (vgl. Tabelle. 1)<sup>43</sup>. Der MIC<sub>90</sub>-Wert gibt die Antibiotikadosierung bei der mindestens 90 % der Keime abgetötet werden und der MIC<sub>50</sub>-Wert die Antibiotikadosierung bei der mindestens 50 % der Keime abgetötet werden an.

Die Standardinformation für Krankenhausapotheker gibt einen allgemeinen MIC-Breakpoint bei der Identifizierung von Linezolid-Empfindlichen Organismen von  $\leq 2$  mg/L vor. Organismen mit einer MIC<sub>90</sub> von  $\geq 8$  mg/L sollten als resistent gegen Linezolid angesehen werden<sup>28</sup>.

Organism		Linezolid	Vancomycin
MSSA	MIC <sub>50</sub>	2	1
	MIC <sub>90</sub>	4	2
MRSA	MIC <sub>50</sub>	2	1
	MIC <sub>90</sub>	2	2
MSSE	MIC <sub>50</sub>	1	1
	MIC <sub>90</sub>	2	4
MRSE	MIC <sub>50</sub>	1	2
	MIC <sub>90</sub>	2	2

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration (MIC) in mg/L angegeben. Tabelle Modifiziert nach Gemell et al.<sup>43</sup>  
MSSA=Methicillin sensibler *Staphylococcus aureus*, MRSA= Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*;  
MSSE= Methicillin sensibler *Staphylococcus epidermidis*; MRSE= Methicillin resistenter *Staphylococcus epidermidis*; MIC=minimale Hemmkonzentration

### 1.3.4 Unerwünschte Medikamentenwirkung / Medikamenteninteraktion

Klinische Studien zeigten, dass Linezolid bei einem Behandlungszeitraum von nicht mehr als 28 Tagen im Allgemeinen gut verträglich ist<sup>48</sup>. Während der Behandlung können in 1 bis 10 % der Fälle Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Übelkeit, Transaminasenerhöhungen und Geschmacksstörungen auftreten<sup>42</sup>. Besonders nach langen Behandlungszeiträumen über 14 Tagen wurde eine Myelonsuppression (Anämie, Leukopenie, Panzytopenie, Thrombozytopenie) beobachtet, welche nach Absetzen der Linezolidtherapie vollständig reversibel ist<sup>49-51</sup>. Besonders bei Patienten die Linezolid länger als zwei Wochen erhalten, werden deshalb wöchentliche Kontrollen des Blutbilds empfohlen<sup>42</sup>.

Die reversible, nichtselektive Hemmung der Monoaminoxidase A und B ist die bisher einzige beobachtete Interaktion mit Linezolid<sup>29</sup>. Bei gleichzeitiger Gabe von anderen MAO-Inhibitoren ist die Anwendung von Linezolid nicht empfohlen. Eine gleichzeitige Gabe von Medikamenten die den Monoaminostoffwechsel beeinflussen, wie SSRI, trizyklische Antidepressiva und Sympathomimetika, besteht das Risiko einer Blutdruckerhöhung. Hier sollte eine regelmäßige Blutdruckkontrolle stattfinden<sup>42</sup>. Durch die Hemmung des Noradrenalin-Abbaus (MAO-A-Hemmung) ist eine Wechselwirkung mit Tyramin-haltigen Nahrungsmitteln nicht auszuschließen. Die Tyraminaufnahme sollte 100 mg/Tag nicht überschreiten<sup>52</sup>.

In Tierversuchen wurde festgestellt, dass Linezolid nicht über das Cytochrom-P450-System metabolisiert wird. Von einer Interaktion von Linezolid mit der Cytochrom P-450-Superfamilie ist daher nicht auszugehen<sup>33</sup>.

### 1.3.5 Klinische Anwendung

In Europa wurde Linezolid für ambulant erworbene und nosokomiale Pneumonien sowie für die Therapie von schweren Haut- und Weichteilinfektionen zugelassen.

Bei einer Pneumonie kann Linezolid verordnet werden, wenn bekannt ist oder vermutet wird, dass sie durch Linezolid empfindliche Erreger verursacht ist. Bei Verdacht oder Nachweis von gram-negativen Keimen muss gleichzeitig eine spezifische gram-negative Therapie begonnen werden.

Bei schweren Haut- und Weichteilinfektionen darf Linezolid nur verwendet werden, wenn ein mikrobiologischer Nachweis von empfindlichen gram-positiven Erregern vorliegt. Bei Verdacht oder Nachweis von Mischinfektionen mit resistenten oder unempfindlichen Keimen, ist die Anwendung von Linezolid nur beim Fehlen von Behandlungsalternativen angezeigt. Eine gram-negative Therapie muss hier ebenfalls bei Verdacht oder Nachweis sofort begonnen werden.

Die empfohlene Behandlungsdauer liegt bei 10 bis 14 Tagen bei einer Dosisempfehlung von 600 mg zweimal täglich. Die maximale zugelassene Therapiedauer liegt bei 28 Tagen<sup>42</sup>.

## 1.4. Aufgabenstellung / Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika (Moxifloxacin, Vancomycin und Rifampicin) bei periprothetischen Infekten am Tiermodell überprüft.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, um die Wirksamkeit von Linezolid bei periprothetischen MRSA-Infektionen überprüfen zu können. Hierfür sollte ein Dosierungsschema erarbeitet werden, mit welchem Plasma- und Gewebekonzentrationen bei Ratten erreicht werden, die denen beim Menschen unter der Therapie mit der Standarddosierung von Linezolid vergleichbar sind. Zur Bestimmung der Linezolidkonzentrationen im Plasma und Gewebe wurde eine HPLC Methode entwickelt und

validiert. Gleichzeitig wurde die Praktikabilität der intraperitonealen Applikationsart überprüft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierversuch

Der Versuch wurde von der Regierung der Oberpfalz unter dem Aktenzeichen 54-2531.1-19/07 genehmigt.

#### 2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Für die Experimente wurden 18 männliche Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere waren im Alter von 12 bis 14 Wochen und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 382 g (SD 21 g).

Die Haltung erfolgte im Tierlabor der Universität Regensburg Forschungsbau H4. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen Typ III R (480 qcm Bodenfläche) gehalten. Ihnen wurde energiereduziertes Standardrattenfutter (Type 1535-000) der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH und Wasser *ad libitum* angeboten.

Im Tierstall herrschten Raumtemperaturen von 21 °C (+/- 1 °C) und eine Luftfeuchtigkeit von ca. 55 % (min 45 % / max 75 %). Der zwölfstündige Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatisierte künstliche Beleuchtung bei einer Lichtstärke von 300 Lux aufrechterhalten.

Die Tiere hatten nach Anlieferung 7 Tage Zeit sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen, bevor mit dem Experiment begonnen wurde. Ein Tier starb während der Eingewöhnungsphase. Es wurden 17 Tiere in die Studie eingebunden.

Alle Eingriffe und Medikamentenapplikationen erfolgten im Tierlabor.

#### 2.1.2 Ausschluss- und Abbruchkriterien

Ausschluss- und Abbruchkriterien wurden vor Projektbeginn festgelegt.

Ausschluss bedeutet, dass das Untersuchungsmaterial nicht für die geplante Auswertung verwendet werden darf, aber – wenn möglich – für Teilaspekte oder andere Fragestellungen aufgearbeitet werden kann. Nicht geplante Ereignisse, welche die erwartete Aussage eines Experimentes gefährden, führen zum Ausschluss. Ein Tier ist von der Auswertung

auszuschließen, wenn folgende Ereignisse auftreten und daraus ein biologisches oder mechanisches Problem resultiert:

- selbstinduzierte Wunden,
- versuchsunabhängige Erkrankung.

Abbruch bedeutet, dass das Experiment bei den betreffenden Tieren vorzeitig beendet wird, das Untersuchungsmaterial aber verwendet werden darf. Bedingungen, die für das Versuchstier als unzumutbar erachtet werden, führen zum Abbruch, und zur unverzüglichen Tötung des Tieres.

Als Hauptindikator wurde das Körpergewicht herangezogen. Ein Gewichtsverlust während der Zeit zwischen der Operation und dem Beginn der Behandlung wurde erwartet. Hier wurde ein Gewichtsverlust von 30 % toleriert. Während des Behandlungszeitraumes sollte der Gewichtsverlust kompensiert werden und höchstens 15 % des Anfangsgewichts betragen.

Zusätzlich wurden klinische Symptome und Verhalten der Tiere eingeschätzt. Jedes einzelne der folgenden Merkmale ist für sich allein ein Abbruchsgrund:

- Apathie (völlige Inaktivität, fehlende Reaktion auf äußere Reize)
- Auffallende Abwehrreaktionen/Aggressivität bei der Behandlung als Zeichen für starke Schmerzen
- Stark verminderte Futter- bzw. Wasseraufnahme
- Motorische Auffälligkeiten
- Auffällige Atembeschwerden
- Unphysiologische, abnorme Körperhaltung (eine gewisse Schonhaltung des infizierten Beines wird toleriert)

### 2.1.3 Vorbereitung der Operation und Narkose der Tiere

Die Vollnarkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 90 bis 120 mg/kg KG Ketanest (Ketamin 10 %, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen) und von 6 bis 8 mg/kg KG Xylonest (Xylazin 2 %, CP-Pharma, Burgdorf). Bis zum Erreichen der vollen Narkosetiefe wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt. Gegebenenfalls wurden die Narkotika in niedrigerer Dosierung intraoperativ nachappliziert.

Die Tiere erreichten ungefähr fünf Minuten nach Injektion die notwendige Narkosetiefe, um sie auf die Operation vorzubereiten. Zunächst wurde das linke Bein und das Abdomen mit einem elektrischen Haartrimmer rasiert und die rasierte Stelle desinfiziert.

Danach wurden die Tiere in Rückenlage auf den aseptisch abgedeckten OP-Tisch gelagert und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Das linke Bein wurde nochmals desinfiziert.

### 2.1.4 Operation / Implantation des Marknagels

Die Implantation des Marknagels wurde durch Imitation einer retrograden Femurnageloperation durchgeführt. Die Operationstechnik für bakterielle Osteomyelitis der Tibia an Ratten von Zak wurde hierfür modifiziert und auf den Femur übertragen<sup>53;54</sup>.

Das linke Kniegelenk des Hinterbeines wurde medial der Patella eröffnet, die Patella nach lateral luxiert und der Markraum intercondylär mit einem Handbohrer der Fa. Synthes eröffnet. Die Öffnung wurde schrittweise erweitert um einen Durchmesser von 1,1 mm zu erreichen. Der Femur wurde dann mit 100 µl *Staphylococcus aureus* Suspension ( $10^8$  koloniebildende Einheiten/ml, MSSA, ATCC 29213) über eine Pipette beimpft. Die Pipettenspitze wurde zunächst senkrecht auf das Loch aufgesetzt und langsam in eine parallele Position zum Knochen gebracht, um die Suspension langsam zu injizieren. Ein kleiner Teil der Flüssigkeit geht dabei über die Knochenoberfläche verloren. Ein steriler, 15 mm langer 18 Gauge Nagel wurde intramedulär implantiert. Die Markhöhle wurde mit sterilem Knochenwachs verschlossen. Das Kniegelenk wurde reponiert und die Wunde mit einer Einzelstichnaht (PDS 4/0, Fa. Ethicon) verschlossen. Das Knie wurde gereinigt und das Tier in den Käfig zurückgelegt. Die aufwachenden Tiere hatten sofort Zugriff auf Futter und Trinkwasser. Eine Analgesie war nicht nötig. In der Regel erholten sich die Tiere sehr schnell von diesem Eingriff. Die postoperative Haltung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie präoperativ.

Die Tiere wurden eine Woche beobachtet und ihre Aktivität, Essverhalten, Schonhaltung und Wundheilung dokumentiert, bevor mit der antimikrobiellen Behandlung begonnen wurde.

### 2.1.5 Postoperative Verabreichung des Linezolid

Den Tieren wurde vom achten bis 14. postoperativen Tag zweimal täglich (6:00 Uhr und 18:00 Uhr) Linezolid intraperitoneal injiziert. Hierfür wurden die Tiere randomisiert in zwei Gruppen von acht (Gruppe A) und neun (Gruppe B) Tieren eingeteilt. Aus dem Linezolidpulver (Line, 99.9 %, 030674-QCS, Fa. Pfizer, Karlsruhe) wurde eine Lösung (3 mg/ml) mit Aqua gemischt. Gruppe A erhielt 25 mg/kg KG Linezolid, was einer Injektionsmenge von durchschnittlich 3,1 ml (SD 0,17) entspricht. Gruppe B erhielt 50 mg/kg KG Linezolid, was einer Injektionsmenge von durchschnittlich 6,0 ml (SD 0,84) entspricht. Um Infektionen an der Einstichstelle zu vermeiden, wurde das Abdomen bereits präoperativ rasiert und vor jeder Injektion desinfiziert. Das relativ große Volumen, welches durch die schlechte Löslichkeit von Linezolid in Wasser nötig war, war problemlos zu injizieren und wurde von den Tieren gut vertragen.

### 2.1.6 Tötung und Organentnahme

Am 14. postoperativen Tag wurden die Tiere zwei Stunden nach der letzten Antibiotikagabe getötet. Zunächst wurden die Tiere wie oben beschrieben erneut narkotisiert und gewogen. In tiefer Narkose wurde den Tieren intracardial 1 ml Blut (EDTA Monovette mit 20%iger Ascorbinsäuresuspension) entnommen. Über die gleiche Kanüle wurde anschließend eine Überdosis Pentobarbital verabreicht.

Unter aseptischen Bedingungen wurden nun die Gewebe entnommen. Beide Kniegelenke der Hinterbeine wurden eröffnet. Beidseits wurden die distale Hälfte des Quadriceps (ca. 600 mg) und distale Hälfte des Femur (ca. 400 mg) entnommen. Auf der infizierten linken Seite wurde zunächst das Implantat präpariert. Anschließend wurde das Abdomen und die Brusthöhle eröffnet. Ca. ein Drittel der Leber (1-2 g) und ein rechter Lungenlappen (1-2 g) entnommen. Zusätzlich wurde aus der rechten Leiste Fettgewebe (ca. 200 mg) gewonnen.

Das Blut wurde 10 Minuten mit 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Plasma gewonnen und bei -25 °C eingefroren.

Die gewonnenen Gewebe wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -25 °C gelagert.

## 2.1.7 Material

### Chemikalien, Lösungen und Medikamente

Aqua ad injectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Desinfektionsmittel	Softasept, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketamin	Ketamin 10 %, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen
Linezolid	Pfizer, Karlsruhe
Xylazin	Xylazin 2 %, CP-Pharma, Burgdorf

Tabelle 2: Chemikalien, Lösungen, Medikamente

### Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

EDTA-Monovetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Elektrorasierer	Moser, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde Gas
Gesichtsmaske	High-Filtration Anti-Fog Face Mask, Mölnlycke Health Care, Göteborg, Schweden
Handschuhe (steril)	Operationshandschuhe steril, Latex, puderfrei, Sempermed supreme, Semperit Technische Produkte Ges.m.b.H. & Co. KG, Wien, Österreich
Handschuhe (unsteril)	Peha-soft, Hartmann, Heidenheim
Implantate 1,0 x 15 mm	aus Venenverweilkanüle Medi-Cath, Kendall Medizinische Erzeugnisse GmbH, Neustadt/Donau
Knochenwachs	Ethicon W30, Johnson & Johnson Intl.
Mullkompressen	10x10cm, STERIL-SET, NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter
Nadeln (kurz)	Microlance 3, BD, Drogheda, Irland

Nadeln (lang)	Neoject 20G, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Pipette	Research® (variabel) für Pipettenspitzen 200µl, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	20-200 µl, Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen (Cryo)	Cryo-Röhrchen 2 ml, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Röhrchen (groß)	Röhre 50ml, steril, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpell	Disposable Scalpel No. 15, Feather, Produkte für die Medizin, Köln
Spritzen (1 ml)	BD Plastipak, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzen (2 ml)	BD Discardit II, Becton Dickinson S.A., Fraga, Spain
Verband-Set Cham	1 Schere 11 cm, 1 Adson Pinzette ½ Zähne 12 cm, 5 ES Kompressen 10x10 cm 8fach, 1 Nadelhalter 14 cm, 1 Papp-Schale, Paul Hartmann AG, Heidenheim
Waage	Sartorius LP 2200S, Sartorius, Göttingen

Tabelle 3: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

## 2.2. Bestimmung von Linezolid mit Hilfe der HPLC

Die Konzentration von Linezolid in Plasma- und Gewebeproben wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography, HPLC) mit UV-Detektion bestimmt. Die Analysen wurden am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt.

### 2.2.1 Messprinzip und Geräteaufbau

Bei der HPLC werden Stoffgemische durch Wechselwirkung mit einer stationären Phase (Trennsäule, gefüllt mit i.d.R. porösen Kieselgelteilchen von 3 bis 5 µm) und einer mobilen Phase (Fließmittel oder Eluent) getrennt (vgl. Abbildung 2). Ein Detektor, meist ein UV-Detektor, erfasst die von der Trennsäule eluierten Verbindungen. In Abhängigkeit von der Konzentration und dem Absorptionskoeffizienten der Substanz bei der ausgewählten Wellenlänge wird ein Gauß-kurvenförmiges Signal erzeugt, dessen Fläche und Höhe ein Maß

für die Konzentration sind. Durch den Vergleich mit einem Standard und entsprechender Integrationssoftware können die Daten quantitativ ausgewertet werden.

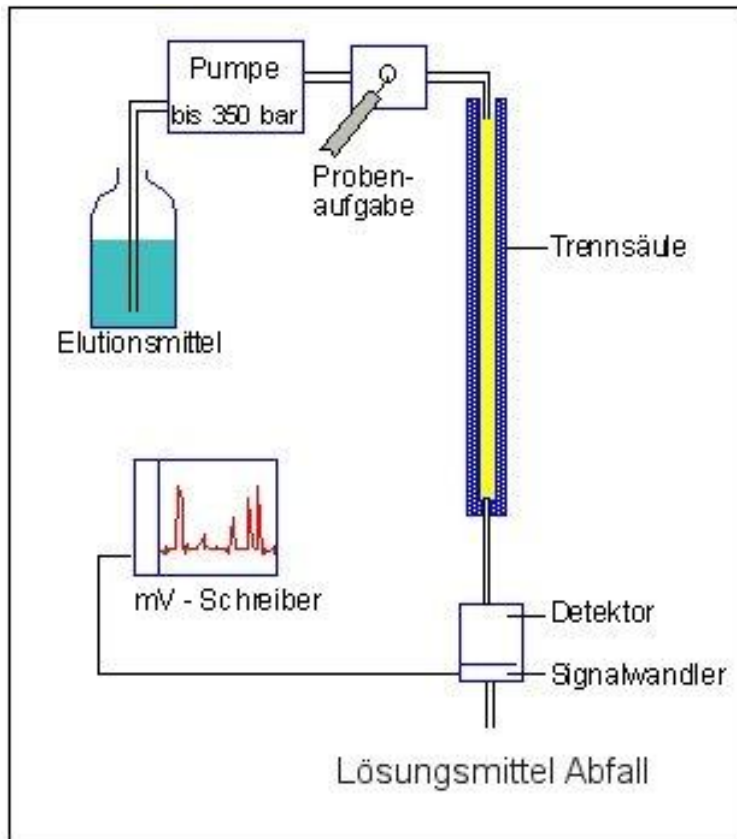


Abbildung 2: Schema einer HPLC

Für die Bestimmung von Pharmaka oder körpereigenen Stoffen in biologischer Matrix wird fast ausschließlich die reversed-phase (Umkehrphasen) Chromatographie eingesetzt. Dabei ist die polare Kieselgeloberfläche durch lipophile Gruppen, typischerweise Alkanketten, modifiziert. Die Elution erfolgt mit Wasser-Methanol oder Wasser-Acetonitril-Mischungen. Dabei hat Wasser die geringste Elutionskraft und Methanol oder Acetonitril haben die stärkste Elutionskraft. Lipophile Moleküle interagieren intensiver mit der stationären Phase und eluieren später als hydrophile Moleküle. Da Pharmaka häufig basische oder saure Eigenschaften aufweisen, werden dem Eluenten Puffersalze zugesetzt. Durch Wahl unterschiedlicher pH-Werte kann die Retention der zu analysierenden Substanzen gesteuert werden.

Die lipophile Oberfläche von reversed-phase Kieselgel wird auch mit biologischen Membranen verglichen. In Analogie zur Verteilung eines Stoffes zwischen Wasser und Oktanol (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) wird das Retentionsverhalten von

Wirkstoffen in der reversed-phase Chromatographie mit deren pharmakologischen Eigenschaften in Relation gesetzt<sup>55</sup>.

### Chromatographisches System

Für die chromatographische Trennung wurde eine LC-10-HPLC-Apparatur der Fa. Shimadzu (Duisburg) mit photometrischer Detektion bei 254 nm und Auswertung über die Class-10 Software (Fa. Shimadzu, Duisburg) eingesetzt. Die Trennung erfolgte an einer analytischen Säule (interner Durchmesser 150x4.6 mm) gefüllt mit Synergi Max RP 4 µm Kieselgel (Fa. Phenomenex, Aschaffenburg) und einer mobilen Phase gemischt aus 600 ml 0,1 % Essigsäure (HOAc), 50 ml Methanol und 200 ml Acetonitril (MeCN). Der pH-Wert wurde mit 10 M Natriumhydroxid (NaOH) auf 4.7 eingestellt. Bei einem Fluss von 1.0 ml/min und einer Säulentemperatur (Säulenofen 125, ERC, Riemerling) von 35 °C eluierte Linezolid nach 5,7 Minuten.

### 2.2.1 Herstellung der Standardlösung

Zur quantitativen Bestimmung von Linezolid wurden Eichlösungen hergestellt. Zur Herstellung einer Stammlösung der Konzentration 1,00 mg/ml wurden 25,0 mg Linezolid (Gehalt 99,9%, 030674-QCS, Firma Pfizer, Karlsruhe) auf einer Analysenwaage (BP211D, Fa. Sartorius AG, Göttingen) abgewogen und in einem 25 ml Messkolben in Wasser gelöst.

Aus der Stammlösung, die im Kühlschrank bei 6 °C gelagert wurde, wurden jeweils frisch durch ein- oder mehrfache 1:10 Verdünnungen mit Wasser Arbeitslösungen hergestellt.

Die Stabilität der Stammlösungen bei 6 °C wurde für acht Wochen nachgewiesen. Für längere Zeiträume wurden die Lösungen in Eppendorf-Cups (ca. 600 µl) bei -20 °C tiefgefroren. Aufgetaute Lösungen wurden nur einmal verwendet.

### 2.2.2 Probenaufbereitung

Vor der Injektion von Plasma und Gewebeextrakten in eine HPLC-Apparatur müssen die Proteine aus den Proben entfernt werden. Dafür wird ein Gemisch aus Trichloressigsäure und Methanol verwendet. Für Plasma wurde eine Lösung aus 4,5 g Trichloressigsäure (TCA), gelöst in 90 ml Wasser und 30 ml Methanol (TCA/MeOH), für Gewebe aus 2,5 g TCA, gelöst in 100 ml Wasser und 33 ml Methanol verwendet.

Die Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und maximal zwei Tage verwendet.

Plasma:

Die gefrorenen Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 2 sec gemischt (REAX Top Vortexer, Fa. Heidolph, Kelheim) und 10 min bei 4 °C mit 2500 g zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode), um evtl. ausgefallenes Fibrin zu sedimentieren. Dann wurden 200 µl Plasma in Eppendorf-Cups vorgelegt und 200 µl TCA/MeOH zugegeben. 5 bis 10 sec mit REAX-2 durchmischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 2 min zentrifugiert (10000g, Mikro 22, Fa. Hettich, Tuttlingen) und 200 µl Überstand in Autosampler-Minivials überführt.

Knochen/Fett:

Das gesamte Gewebe (ca. 300 bis 400 mg Knochen oder Fett) wurden in einem Metallblock mit Bohrung und Stempel (Typ Tissue-Pulverizer, [www.spectrapor.com/labware/Pulverizer.html](http://www.spectrapor.com/labware/Pulverizer.html)) mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit einem Hammer zerkleinert (vgl. Abbildung 3).



Abbildung 3: Tissue-Pulverizer zum Zerkleinern tiefgefrorener Gewebe

Um eine gute Durchmischung zu erreichen wurde dieses zweimal durchgeführt. Von dem Knochen- und Fettmehl wurden ca. 200 mg abgewogen und in 10facher Menge TCA/MeOH (w/v) mittels Ultraschall (Sonoplus UW2070, Spitze M73, 60 sec, gepulst 50%, Energie minimal; Fa. Bandelin, Berlin) in 4ml PPN-Röhrchen nochmals homogenisiert. Die Proben wurden dann 30 min im Überkopfschüttler REAX-2 (Fa. Heidolph, Kelheim) gemischt und anschließend 10 min bei 2750 g (4000UpM, Multifuge 1 L-R, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) zentrifugiert. Die aufschwimmende Fettmanschette wurde mit der Pipettenspitze

durchstochen und 200 µl Lösung wurden entnommen. Diese wurden durch eine Pipettenspitze mit Filtereinsatz direkt in Minivials filtriert.

Leber/Lunge/Muskel:

Je ca. 400 mg Leber oder 400 mg Lunge und 500 mg Muskel wurden in 10facher Menge TCA/MeOH (w/v) mit Hilfe des Ultra Turrax (Tp 18-10, Fa. IKA, Staufen/Breisgau) in 12 ml PPN-Röhrchen zerkleinert. Wie das Knochen- und Fettgewebe wurde das Homogenisat 30 min im Überkopfschüttler gemischt und 10 min zentrifugiert. Eine Fettmanschette hatte sich nicht gebildet und so konnten 200 µl Überstand direkt in Minivials pipettiert werden.

### 2.2.3 Validierung der HPLC-Methode

Unter dem Begriff Validierung versteht man Nachweis und Dokumentation der Zuverlässigkeit einer verwendeten analytischen Methode, mit angemessener Präzision und Richtigkeit, die von ihr erwarteten Daten zu liefern<sup>56;57</sup>. Sie ist die Dokumentation der Eignung für den Bestimmungszweck und die Grundvoraussetzung für Qualitätssicherung, Vergleichbarkeit und verlässliche Interpretation der Analyse-Ergebnisse<sup>58</sup>.

Vor Aufarbeitung und Messung der Plasma- und Gewebeproben der Versuchstiere wurde deshalb durch die Methodvalidierung sichergestellt, dass die Analysemethode geeignet war, sowohl sichere, als auch reproduzierbare Daten für den Wirkstoff Linezolid zu liefern. Zur Herstellung von Standardlösungen verschiedener Konzentrationsstufen von Linezolid wurden Verdünnungsstufen der Stammlösungen in Wasser hergestellt. Anschließend wurde Leerplasma (human) und Leergewebe (Schweinegewebe) mit verschiedenen Konzentrationen an Linezolid versetzt, um die erforderlichen Vergleichswerte für die anschließenden Untersuchungen der Proben zu erhalten.

Als Validierungsparameter dienten die nachfolgend aufgelisteten Kriterien:

#### 2.2.3.1 Selektivität und Spezifität

Eine Methode ist dann selektiv, wenn sie die verschiedenen, nebeneinander zu bestimmende Komponenten, auch in Gegenwart von Begleitstoffen wie Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukten oder Matrix, ohne gegenseitige Störungen erfasst<sup>56;57</sup>. Sie zeigt sich im Chromatogramm durch sauber getrennte Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten<sup>56</sup>.

Eine Methode ist spezifisch, wenn sie den zu bestimmenden Analyten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandenen Komponenten eindeutig identifiziert <sup>56</sup>.

Um die Selektivität sicher zu stellen, wurden Leerwerte von Leerplasmaproben und Schweinegewebeproben nach dem Probenaufbereitungsschema vorbereitet und analysiert.

### 2.2.3.2 Linearität

Bei der HPLC muss der funktionelle Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und Messsignal (Peak-Höhe) ermittelt werden. Die Linearität einer analytischen Methode zeigt dabei ihre Fähigkeit, innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches Messsignale zu liefern, die direkt proportional zu der Analytenkonzentration in der Probe sind <sup>58</sup>. Direkt proportional bedeutet jedoch nicht zwingend eine lineare Abhängigkeit zwischen Messsignal und Analytenkonzentration, weshalb auch die Begriffe ‚Analysefunktion‘ oder ‚Kalibrierfunktion‘ synonym Verwendung finden <sup>56</sup>.

### 2.2.3.3 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analyseergebnissen um den Mittelwert und beschreibt die Fähigkeit, eine Analyse mit geringer Standardabweichung mehrfach durchführen zu können. Der Umfang der Übereinstimmung der Ergebnisse wiederholter Messungen wird quantitativ durch die Standardabweichung oder den Variationskoeffizienten von Wiederholungsmessungen in einem Probenmaterial beschrieben <sup>59</sup>. Der Variationskoeffizient CV errechnet sich nach der Formel

$$CV=SD/X*100$$

SD: Standardabweichung

X: arithmetisches Mittel

Zur Dokumentation der Präzision (Intra-Assay, Inter-Assay und Bias) wurden bei jedem Assay mit Linezolid dotierte Gewebeproben in Doppelbestimmung mitgeführt.

#### 2.2.3.4 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit (engl. sensitivity) einer Methode zeigt sich durch die Fähigkeit, auch niedrige Konzentrationen einer Substanz analysieren zu können und wird durch die Nachweisgrenze (für die qualitative Analyse) und die Bestimmungsgrenze (für die quantitative Bestimmung) beschrieben. Die Bestimmungsgrenze liegt dabei deutlich höher<sup>57</sup>.

Die Nachweisgrenze (engl. limit of detection = LOD) oder Detektionsgrenze ist die niedrigste Analytenkonzentration, die noch ein Signal hervorruft, welches vom Rauschen der Grundlinie abgrenzbar ist. Im Allgemeinen wird diese in der chromatographischen Praxis über eine signal-to-noise ratio von 2 bis 3 berechnet<sup>56:60</sup>.

Die Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantification = LOQ) oder Sensitivität der vorliegenden Methoden wurde nach Kromidas<sup>56</sup> und Green<sup>60</sup> über eine zehnfache signal-to-noise ratio definiert. Dazu wurden die Detektorsignale einer Verdünnungsreihe von Kalibrierstandards ermittelt. Das Detektorsignal der niedrigsten vermessenen Konzentration diente der Berechnung der Bestimmungsgrenze nach folgender Formel:

$$\text{LOQ}=(10 \cdot x \cdot N) H_x$$

10: signal-to-noise ratio

X: bekannte Konzentration

N: noise (Rauschen der Grundlinie)

Hx: Höhe des Peaks der bekannten Konzentration

### 2.2.3.5 Wiederfindung

Mittels der Wiederfindungsrate (engl. recovery) wird überprüft, ob und in welchem Ausmaß bei der Probenaufarbeitung (Extraktionsverfahren, allgemeine Handhabung, Probeninjektion, etc.) ein Teil der zu untersuchenden Substanz verloren geht<sup>56</sup>. Eine hohe Wiederfindungsrate beweist eine hohe Extraktionseffektivität der verwendeten Methoden

Die Wiederfindungsrate  $W$  bezeichnet das prozentuelle Verhältnis zwischen Istwert, Mittelwert und Sollwert und errechnet sich folgendermaßen:

$$W = X / X_{\text{soll}} + 100$$

$X$ : arithmetischer Mittelwert

$X_{\text{soll}}$ : Sollwert

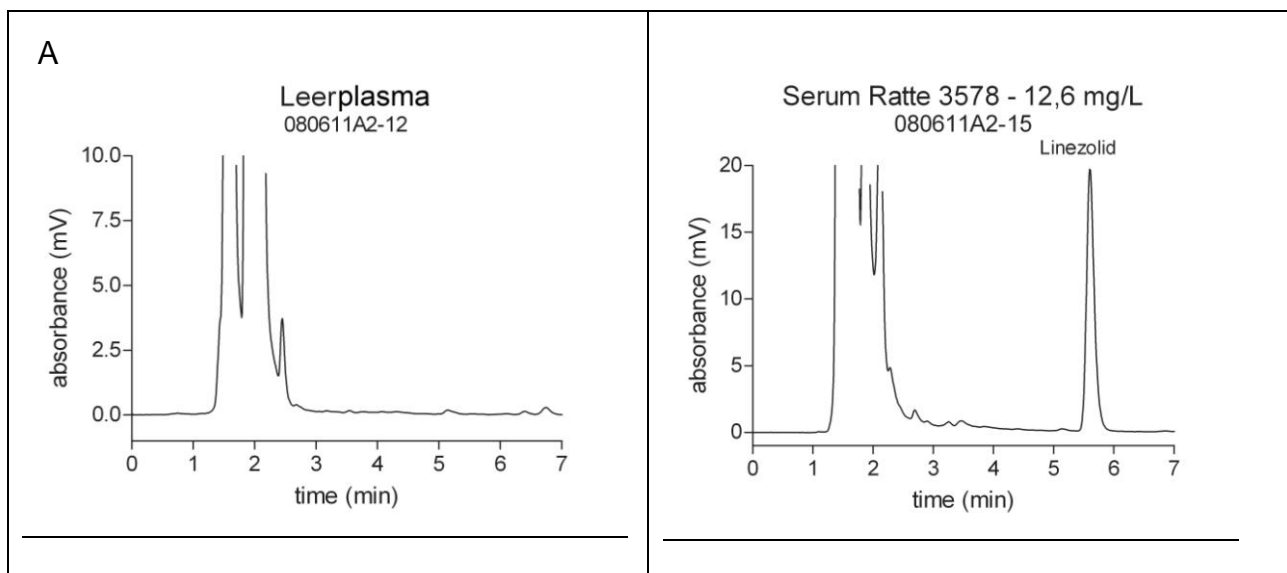
## 3. Ergebnisse

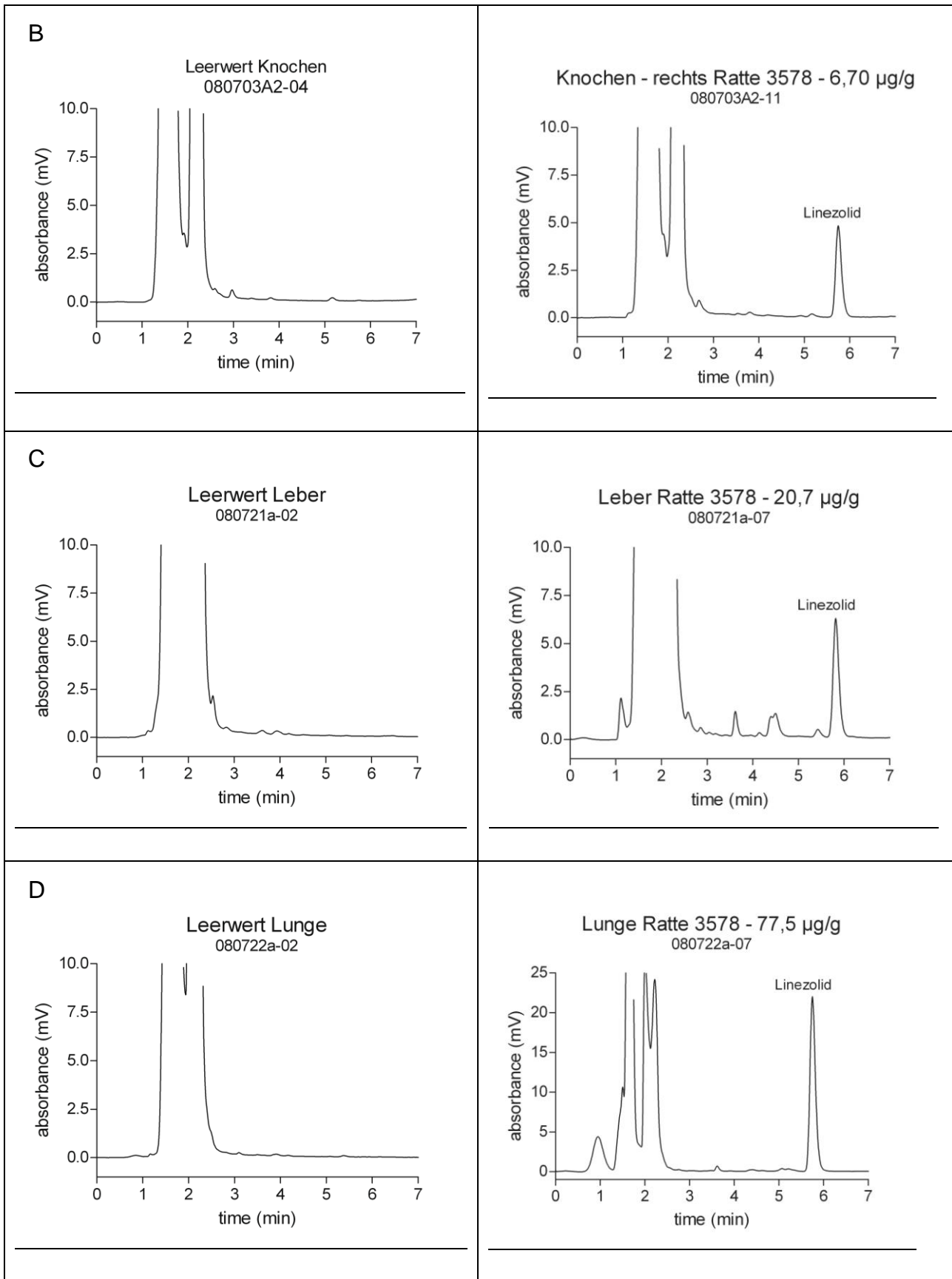
### 3.1. Analytische Kennzahlen der Bestimmung von Linezolid in biologischer Matrix

#### 3.1.1 Spezifität und Selektivität

Zum Nachweis der Selektivität und Spezifität wurde Leerplasma und -gewebe sowie mit Linezolid dotierte Proben analysiert. Dabei zeigte sich, dass Linezolid ohne Verfälschung durch Probeninhaltsstoffen (Spezifität) und ohne Störung bei ausreichender Trennung (Selektivität) im Chromatogramm erfasst wird. Linezolid eluierte nach 5,7 Minuten als vollständig von Begleitstoffen abgetrennter Peak (vgl. Abbildung 4).

Für diese Untersuchungen stand kein Leergewebe von Ratten zur Verfügung. Deshalb wurde humanes Leerplasma und Leergewebe vom Schwein verwendet. Die Selektivität und Spezifität wurde also streng genommen nur für diese Matrizes nachgewiesen. Der Vergleich des chromatographischen Hintergrunds zeigt aber, dass der chromatographische Hintergrund (Fingerprint) in den verschiedenen Matrizes vergleichbar war.





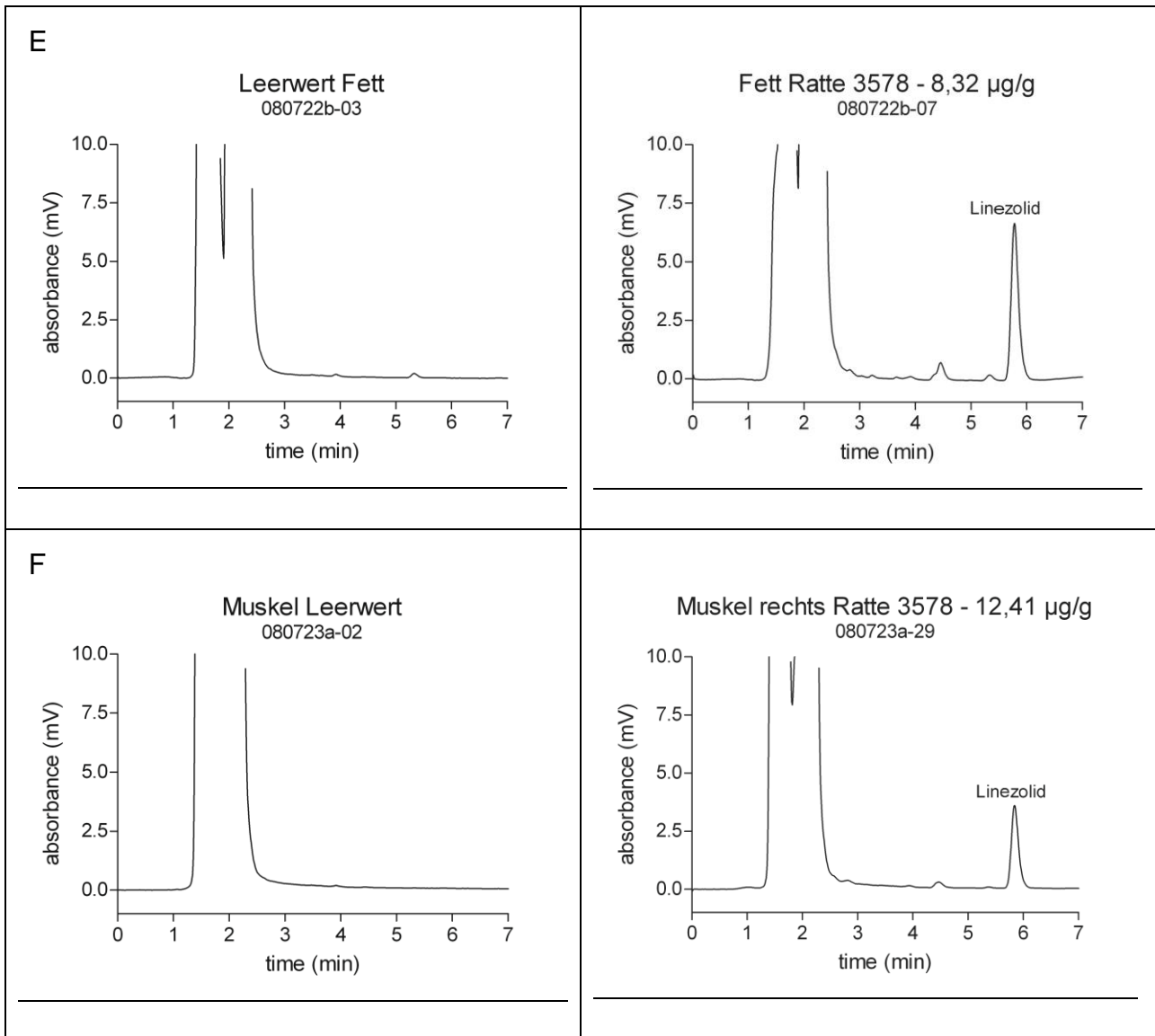


Abbildung. 4: Chromatogramme von A: Leerplasma und Leergewebe (Tier-Nr. A1), B: Leerwert Knochen und Knochen rechts (Tier-Nr. A1), C: Leerwert Leber und Leber (Tier-Nr. A1), D: Leerwert Lunge und Lunge (Tier-Nr. A1), E: Leerwert Fett und Fett (Tier-Nr. A1), F: Leerwert Muskel und Muskel rechts (Tier-Nr. A1). Retentionszeit von Linezolid ca. 5,7 Minuten.

### 3.1.2 Linearität

Um die Linearität von Linezolid im Plasma zu überprüfen wurden zwei Standardreihen mit je acht Messpunkten in Doppelbestimmung analysiert. Im Bereich 0,20 µg/ml bis 40,00 µg/ml wurde visuell und nach dem Regressionsmodell die Linearität nachgewiesen (vgl. Abbildung 5). Der Korrelationskoeffizient  $r$  betrug für die Linearität der Bestimmung von Linezolid im Plasma bei den beiden Standardreihen 0.99.

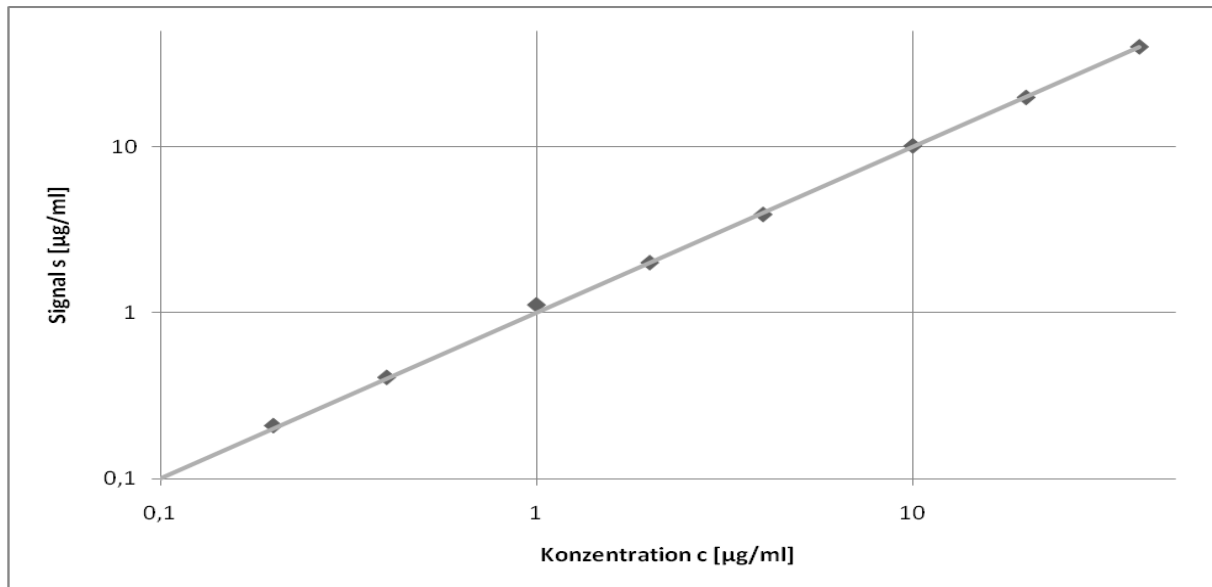


Abbildung 5: Linearität von Linezolid im Plasma im Bereich 0,20 µg/ml bis 40,00 µg/ml. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

Für die Überprüfung der Linearität im Knochen wurden ebenfalls zwei Standardreihen mit je 5 Konzentrationen in Doppelbestimmung durchgeführt. Hier wurde die Linearität mit einem Korrelationskoeffizient  $r=0,99$  im Bereich von 1,0 µg/ml bis 10,0 µg/ml gezeigt.

Für die anderen Gewebearten wurde eine abgekürzte Standardreihe mit nur jeweils zwei Messpunkten (hohe, niedrige Konzentration) in Doppelbestimmung analysiert.

### 3.1.3 Präzision

Die Präzision des HPLC-Verfahrens wurde aus den Standardreihen, die zur Linearitätsbestimmung verwendet wurden ermittelt. Es ergab sich für Plasma eine intra-Assay Varianz von 1,7 % in der ersten Doppelbestimmung und von 1,5 % in der zweiten Doppelbestimmung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 enthalten.

Sollwert [µg/ml]	Assay 1				Assay 2			
	X [µg/ml]	SD [µg/ml]	CV <sub>intra</sub> [%]	Wieder- findung	X [µg/ml]	SD [µg/ml]	CV <sub>intra</sub> [%]	Wieder- findung
0,20	0,21	0,004180	2,09	100,0	0,21	0,00252	1,2	105,0
0,40	0,41	0,005840	1,46	100,0	0,42	0,01050	2,5	105,0
1,00	1,11	0,066267	5,97	111,0	1,05	0,00630	0,6	105,0
2,00	2,01	0,024924	1,24	100,5	2,09	0,06479	3,1	104,5
4,00	3,92	0,015249	0,39	97,8	4,1	0,02870	0,7	102,5
10,00	10,14	0,074022	0,73	101,4	10,57	0,24311	2,3	105,7
20,00	19,85	0,099250	0,5	99,3	20,22	0,26286	1,3	101,1
40,00	40,04	0,412412	1,03	100,1	39,73	0,15892	0,4	99,3
MW			1,7	101,3			1,5	103,5

Tabelle 4: Messergebnisse Standardreihen zur Präzisionsbestimmung und Wiederfindung. MW=Mittelwert; X=ermittelte Wert; SD=Standardabweichung; CV<sub>intra</sub>=intra-Assay Varianz;

Für Knochengewebe ergab sich ein Variationskoeffizient von 3,7 % in der ersten und von 2,4 % in der zweiten Doppelbestimmung der Standardreihen. Anhand der zwei Messpunkte aus den anderen Gewebestandardreihen wurden folgende Variationskoeffizienten bestimmt: Leber 3,13 %, Lunge 2,55 %, Fett 5,24 % und Muskel 0,42 %.

### 3.1.4 Empfindlichkeit

Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) „on column“ ist diejenige injizierte Menge definiert, bei der das signal-to-noise (S/N) Verhältnis 3:1 ist. Sie lag für Linezolid bei 55 pg.

Die Bestimmungsgrenze (Limit of quantification, LOQ), d.h. die Menge Linezolid, die mit einer Präzision von 20% oder besser in der Matrix bestimmt werden kann wurde nicht ermittelt. Allgemein wird auch ein S/N Verhältnis von 10:1 als Näherungswert für die Bestimmungsgrenze akzeptiert. Für Linezolid kann man die Bestimmungsgrenze mit 0.2 µg/ml in Plasma und 1µg/g in Gewebe berechnen. Eine noch niedrigere Grenze könnte erreicht werden, wenn das Injektionsvolumen für die HPLC von 10 µl für Plasma bzw. 25 µl für Gewebe erhöht würde.

Es wurden keine Versuche durchgeführt, die niedrigste Bestimmungsgrenze zu ermitteln, weil keine sehr niedrigen Konzentrationen im Plasma oder Gewebe zu erwarten waren. Es wurde als Bestimmungsgrenze der niedrigste Kalibrierungspunkt für Linezolid im Plasma (0,2 µg/ml) und im Gewebe (1 µg/g) herangezogen. Alle getesteten Proben lagen auch über dem Kalibrierungsspunkt, so dass keine Messung aus der Analyse genommen werden musste.

### 3.1.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate (Mittelwert ± Standardabweichung) betrug im Plasma 101,9 ± 3,6% (n=4, vgl. Tabelle.4).

Die Wiederfindungsraten der Gewebeprouben sind in Tabelle 5 zusammengestellt:

<b>Knochen</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Fett</b>	<b>Muskel</b>
91,7%	94,1%	90,2%	97,5%	91,9%

Tabelle 5: Wiederfindungsrate von Linezolid im Gewebe (Mittelwert aus n=4 Messwerten)

## 3.2. Linezolidkonzentration im Plasma und Gewebe

Ein Tier starb während der Eingewöhnungsphase. Durch die Operation, in der Beobachtungszeit und während der Behandlung starb kein Tier. So konnten 17 Tiere (8 Gruppe A, 9 Gruppe B) in die Analyse einbezogen werden.

Keines der behandelten Tiere zeigte Anzeichen einer systemisch-septischen Reaktion. Am linken Femur fanden sich bei allen Tieren deutliche Zeichen einer Infektion. Es war ein deutlicher Eiterfluss und Knochendefekte zu erkennen. Die Implantate waren nicht disloziert.

Die Gewichtskontrollen spiegeln den Stress der Tiere postoperativ wieder. Vor der ersten Linezolidgabe (Tag Sieben postoperativ) wurde ein Gewichtsverlust (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) von  $20,0 \pm 26,95$  g ( $5,17 \pm 7,64$  %) ermittelt. Alle Tiere konnten den Gewichtsverlust während der Behandlungsphase (Tag Acht bis Tag 14 postoperativ) kompensieren und erreichten bis zur Tötung (Tag 14 postoperativ)  $99,73 \pm 5,06$  % des Ausgangsgewichtes. Kein Tier erfüllte die Abbruchkriterien, so dass kein Tier vorzeitig getötet werden musste.

### 3.2.1 Plasmakonzentration von Linezolid

Die Tiere wurden sieben Tage mit 25 bzw. 50 mg/kg KG behandelt und zwei Stunden nach der letzten Applikation getötet. Die Plasmakonzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) nach einer Dosis von 25 mg/kg KG (Gruppe A) betrug  $11,23 \pm 3,06$   $\mu\text{g/ml}$  und  $24,33 \pm 5,51$   $\mu\text{g/ml}$  nach einer Dosis von 50 mg/kg KG (Gruppe B). Die Einzelwerte können Tabelle 6 entnommen werden.

	<b>Dosis 25 mg/kg</b>		<b>Dosis 50 mg/kg</b>	
	<b>Tiernr.</b>	<b>C<sub>Plasma</sub> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Tiernr.</b>	<b>C<sub>Plasma</sub> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
	A1	12,58	B1	20,39
	A2	9,60	B2	26,98
	A3	9,47	B3	24,16
	A4	7,59	B4	23,04
	A5	10,75	B5	19,93
	A6	17,87	B6	25,63
	A7	11,39	B7	15,71
	A8	10,59	B8	34,55
			B9	28,61
<b>n</b>		<b>8</b>		<b>9</b>
<b>MW</b>		<b>11,23</b>		<b>24,33</b>
<b>SD</b>		<b>3,06</b>		<b>5,51</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>27</b>		<b>23</b>
<b>Median (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>		<b>10,67</b>		<b>24,16</b>
<b>Min (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>		<b>7,59</b>		<b>15,71</b>
<b>Max (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>		<b>17,87</b>		<b>34,55</b>

Tabelle 6: Plasmakonzentrationen von Linezolid im Plasma von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 25 bzw. 50 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal.  $c_{\text{Plasma}}$ =Plasmakonzentration; n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung; Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert

Die Plasmakonzentrationen waren nach der Linezolidgabe von 50 mg/kg KG etwa doppelt ( $54 \pm 14,7$  %) so hoch wie nach der Gabe von 25 mg/kg KG.

### 3.2.2 Konzentration im Gewebe

Gruppe A:

Die höchste durchschnittliche Linezolidkonzentration konnte in der Lunge mit 57,10 µg/g festgestellt werden. Gefolgt von Leber (19,10 µg/g), Muskel (rechts 11,30 µg/g, links 9,93 µg/g), Fett (7,14 µg/g) und Knochen (rechts 5,96 µg/g, links 6,71 µg/g). Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichung der verschiedenen Organe können Tabelle 7 entnommen werden.

<b>Tiernr.</b>	<b>Knochen rechts</b>	<b>Knochen links</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Fett</b>	<b>Muskel rechts</b>	<b>Muskel links</b>
<b>A1</b>	6,70	8,69	20,7	77,5	8,32	12,41	9,62
<b>A2</b>	4,47	4,31	17,8	29,5	3,58	12,37	6,84
<b>A3</b>	5,30	5,26	15,4	137,5 <sup>a</sup>	4,17	10,05	9,38
<b>A4</b>	3,48	5,16	13,1	96,9	3,07	6,20	6,63
<b>A5</b>	6,06	5,98	26,2	19,8	12,59	10,78	7,00
<b>A6</b>	9,47	12,50	25,0	50,6	12,55	15,86	18,70
<b>A7</b>	6,09	5,79	17,8	20,7	5,04	12,12	10,75
<b>A8</b>	6,14	5,99	17,0	12,3	7,79	10,61	10,52
<b>n</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>MW</b>	<b>5,96</b>	<b>6,71</b>	<b>19,1</b>	<b>57,1</b>	<b>7,14</b>	<b>11,30</b>	<b>9,93</b>
<b>SD</b>	<b>1,76</b>	<b>2,66</b>	<b>4,6</b>	<b>48,0</b>	<b>3,84</b>	<b>2,73</b>	<b>3,92</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>24</b>	<b>84</b>	<b>54</b>	<b>24</b>	<b>39</b>
<b>Median</b>	<b>6,07</b>	<b>5,88</b>	<b>17,8</b>	<b>40,0</b>	<b>6,41</b>	<b>11,45</b>	<b>9,50</b>
<b>Min</b>	<b>3,48</b>	<b>4,31</b>	<b>13,1</b>	<b>12,3</b>	<b>3,07</b>	<b>6,20</b>	<b>6,63</b>
<b>Max</b>	<b>9,47</b>	<b>12,50</b>	<b>26,20</b>	<b>149,9</b>	<b>12,59</b>	<b>15,86</b>	<b>18,70</b>
<b>P (li-re)</b>		<b>0,145<sup>b</sup></b>					<b>0,183<sup>b</sup></b>

Tabelle 7: Gewebekonzentrationen von Linezolid in µg/g von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 25 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal.

<sup>a</sup> Mittelwert aus Doppelbestimmung; Einzelwerte: 149,9, 125,2 µg/ml

<sup>b</sup> Kein signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)  
n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung;  
Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert; P=P-Wert

Gruppe B:

Die durchschnittlichen Konzentrationswerte von Linezolid sind in dieser Gruppe ähnlich verteilt. Die genauen Werte sind in Tabelle 8 dargestellt.

<b>Tiernr.</b>	<b>Knochen rechts</b>	<b>Knochen links</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Fett</b>	<b>Muskel rechts</b>	<b>Muskel links</b>
<b>B1</b>	9,58	10,50	30,3	103,9	12,00	18,60	18,99
<b>B2</b>	10,41	15,07	41,5	51,5 <sup>a</sup>	8,17	28,83	24,03
<b>B3</b>	11,25	13,49	34,5	54,5 <sup>a</sup>	15,13	20,52	26,02
<b>B4</b>	11,61	10,87	33,9	72,7	15,32	20,19	22,36
<b>B5</b>	10,89	14,95	30,7	27,5	14,42	15,95	21,05
<b>B6</b>	13,62	14,01	37,3	33,3	14,23	22,66	22,82
<b>B7</b>	7,71	12,28	27,1	49,2	5,99	23,15	12,20
<b>B8</b>	20,22	20,76	42,4	119,8	7,74	27,15	26,86
<b>B9</b>	15,50	18,67	43,8	80,2	24,37	27,15	26,68
<b>n</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>MW</b>	<b>12,31</b>	<b>14,51</b>	<b>35,7</b>	<b>65,5</b>	<b>13,04</b>	<b>22,69</b>	<b>22,33</b>
<b>SD</b>	<b>3,71</b>	<b>3,40</b>	<b>5,9</b>	<b>31,3</b>	<b>5,52</b>	<b>4,35</b>	<b>4,63</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>30</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>48</b>	<b>42</b>	<b>19</b>	<b>21</b>
<b>Median</b>	<b>11,25</b>	<b>14,01</b>	<b>34,5</b>	<b>51,8</b>	<b>14,23</b>	<b>22,66</b>	<b>22,82</b>
<b>Min</b>	<b>7,71</b>	<b>10,50</b>	<b>27,1</b>	<b>27,5</b>	<b>5,99</b>	<b>15,95</b>	<b>12,20</b>
<b>Max</b>	<b>20,22</b>	<b>20,76</b>	<b>43,8</b>	<b>119,8</b>	<b>24,37</b>	<b>28,83</b>	<b>26,86</b>
<b>P (li-re)</b>		<b>0,011<sup>c</sup></b>					<b>0,838<sup>b</sup></b>
<b>P (50-25)</b>	<b>0,003<sup>d</sup></b>	<b>0,002<sup>d</sup></b>	<b>0,001<sup>d</sup></b>	<b>0,760<sup>d</sup></b>	<b>0,029<sup>d</sup></b>	<b>0,000<sup>d</sup></b>	<b>0,001<sup>d</sup></b>

Tabelle 8: Gewebekonzentrationen von Linezolid in µg/g von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 50 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal.

<sup>a</sup> Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; Einzelwerte: B2:51,2, 51,9 µg/g; B3: 51,8, 57,2 µg/g

<sup>b</sup> Kein signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)

<sup>c</sup> Signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)

<sup>d</sup> Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und B (zweiseitiger, ungepaarter t-Test)

n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung; Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert; P=P-Wert

Im Lungengewebe der Ratte A3 wurde die höchste Konzentration gemessen, obwohl die Ratte zur Gruppe gehörte, die nur mit 25 mg/kg KG behandelt wurde. Es wurde deshalb ein zweites Aliquot des Gewebes sowie Gewebeproben der benachbarten Tiere B2 und B3 analysiert. Die Wiederholungsanalysen bestätigten das Ergebnis der ersten Analyse. Es ergab sich ein Quotient aus zweiter und erster Analyse von 98,4 %.

Die Gewebekonzentrationen waren bei der Gruppe B (50 mg/kg KG) etwa 50 % höher als im Gewebe der Gruppe A (25 mg/kg KG); in Lungengewebe streuten die Konzentrationen mehr

und die mittlere Konzentration war nur 13 % höher. Der Unterschied war in allen Geweben signifikant mit Ausnahme der Lunge.

### 3.2.3 Gewebe-Plasma-Relationen von Linezolid

Die Linezolidkonzentrationen im rechten Knochen betragen ca. 50 % (52,8 %, 50,2 %) der gleichzeitigen Plasmakonzentrationen. Im linken Knochen fanden sich etwas höhere (58,8 %, 60,4 %) Konzentrationsquotienten. Im Fettgewebe fand sich eine ähnliche Verteilung wie im Knochen (61,6 %, 54,6 %). Die Konzentrationen im Muskel waren sowohl im rechtem Muskelgewebe (101,4 %, 95,5 %) als auch im linken Muskelgewebe (87,2 %, 92,3 %) vergleichbar mit den Plasmakonzentrationen. Im Lebergewebe (173,3 %, 148,9 %) und im Lungengewebe (568,4 %, 270,9 %) zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen als im Plasma (vgl. Abbildung 6).

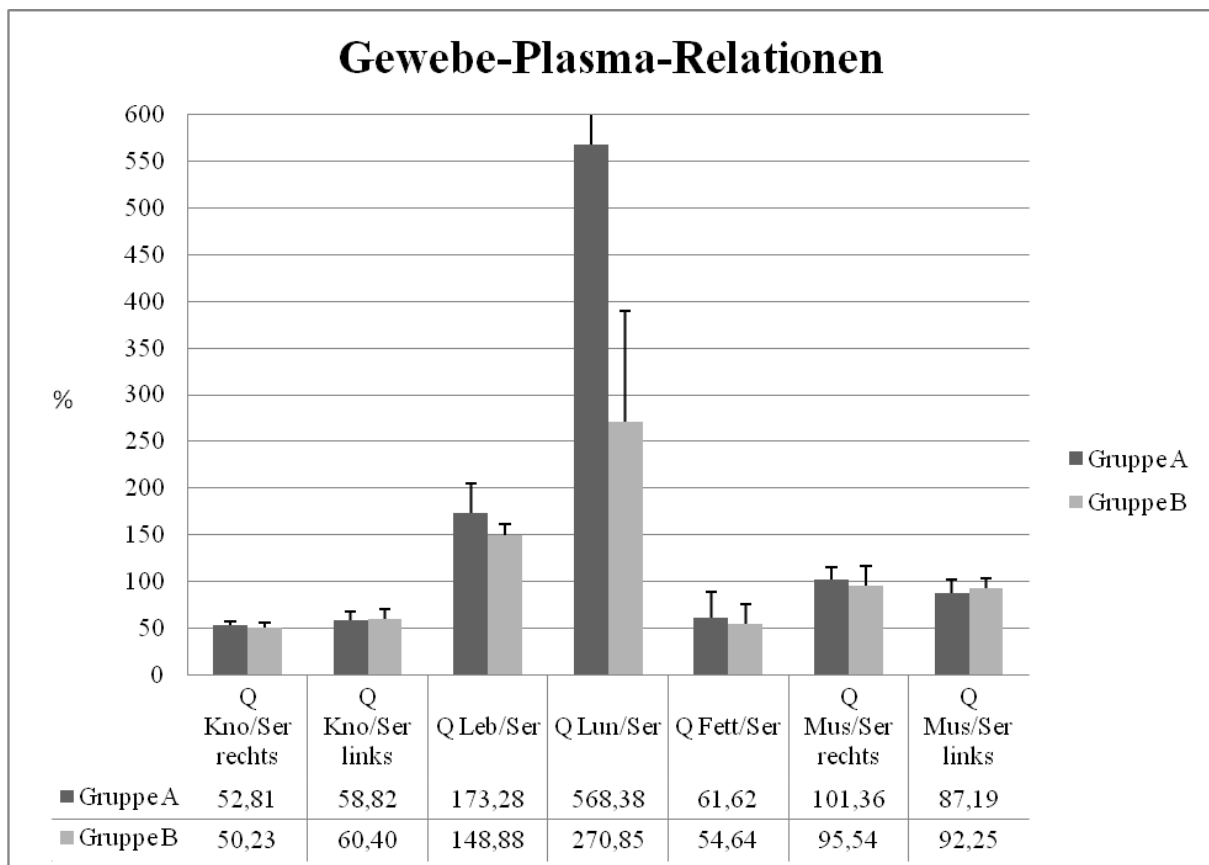


Abbildung 6: Gewebe-Plasma-Relation in % mit Standardabweichung. Verhältnis Mittelwerte der Gewebekonzentrationen zur Plasmakonzentration

### 3.2.4 Unterschied infizierte und nichtinfizierte Seite

Im Muskelgewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen linker infizierter und rechter nicht infizierter Seite. Im Knochen waren die Konzentrationen auf der infizierten Seite tendenziell höher. Ein signifikanter (zweiseitiger, gepaarter t-Test) Unterschied wurde in Gruppe B festgestellt ( $p=0,011$ ) (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 7).

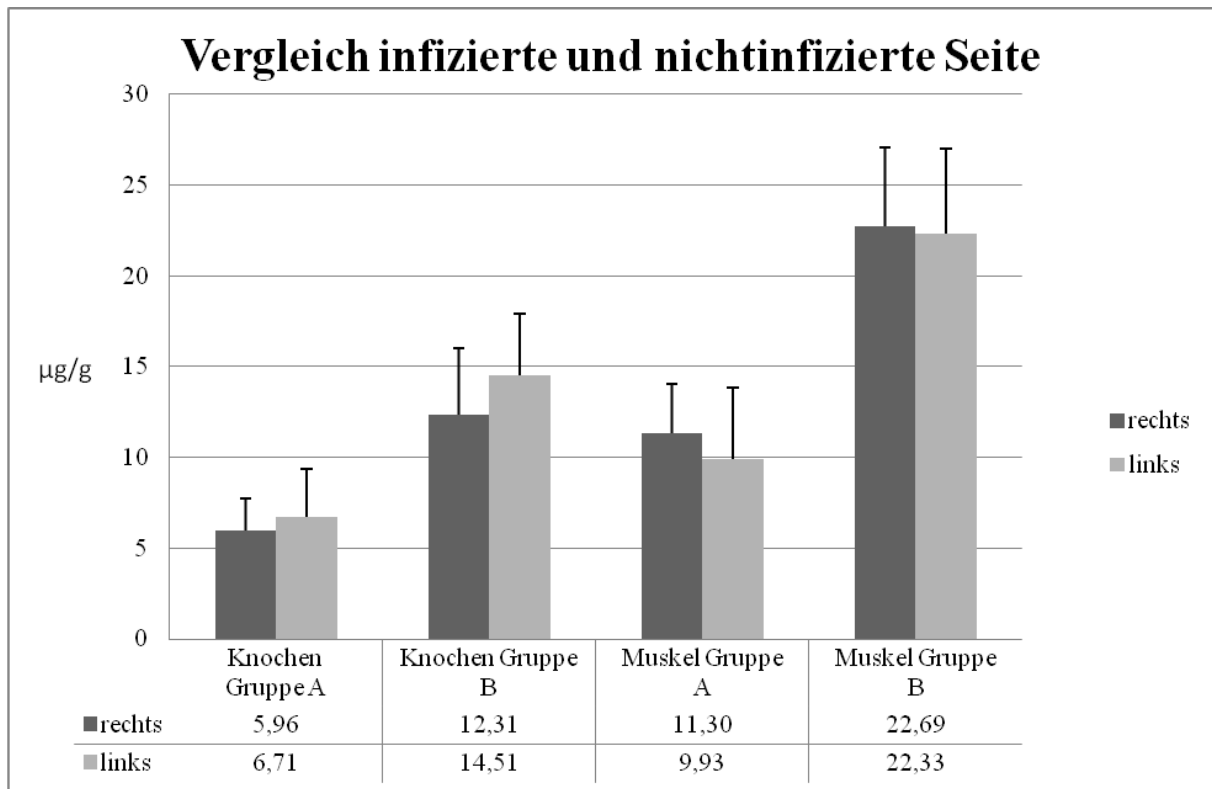


Abbildung 7: Vergleich infizierte (linke) und nichtinfizierter (rechte) Seite. Mittelwerte in  $\mu\text{g/g}$

### 3.2.5 Bezug zur minimalen Hemmkonzentration

Die Ergebnisse im Plasma lagen in beiden Gruppen deutlich über der mittleren Hemmkonzentration ( $\text{MIC}_{90}=4 \text{ mg/L}$  für MSSA und  $\text{MIC}_{90}=2 \text{ mg/L}$  für MRSA).

Im Gewebe lagen zwei Fettkonzentrationen (Tier-Nr. A2, A4) und die Konzentration im rechten Knochen einer Ratte (Tier-Nr. A4), beide aus Gruppe A, unter der  $\text{MIC}_{90}$  für MSSA. Alle andere Gewebekonzentrationen aus Gruppe A und alle Werte aus Gruppe B lagen über der  $\text{MIC}_{90}$  für MSSA und MRSA.

## 4. Diskussion

### 4.1. HPLC-Methode zur Bestimmung von Linezolid

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Linezolid in biologischen Matrices entwickelt und validiert. Die Methode erwies sich als präzise und geeignet zum empfindlichen Nachweis von Linezolid in Plasma und Gewebe von Ratten. In der Literatur sind mehrere HPLC-Methoden publiziert. Typischerweise werden vor der Injektion die Proteine mit Trichloressigsäure zum Teil in Kombination mit Acetonitril oder Methanol aus der Probe entfernt<sup>61-68</sup>. Die direkte Injektion von Plasma oder Urin über eine Säulenschaltung wurde jedoch auch beschrieben<sup>69</sup>. Für letztere Methode ist eine spezielle Apparatur nötig, wir haben uns deshalb in Anlehnung an eine publizierte Methode für die einfache Proteinentfernung durch Säurebehandlung mit einem Gemisch aus Trichloressigsäure und Methanol entschieden<sup>68</sup>. Zur Trennung wurden einheitlich reversed-phase Materialien verwendet und als Eluent wässrige Puffergemische von pH 3.7-5.0<sup>61</sup>, wobei Acetonitril oder Methanol als organischer Modifier verwendet wurde. Bei Vorversuchen mit einem Eluent mit einem pH-Wert von 3,7 koeluierte ein kleiner Peak mit Linezolid, weshalb bei dieser Arbeit der beschriebene Eluent mit einem pH-Wert von 4,7 verwendet wurde. Der niedrigste Kalibrierungspunkt der Standardkurve wurde als untere Bestimmungsgrenze definiert und lag im Plasma bei 0,2 µg/ml und im Gewebe bei 1 µg/g. Somit konnten Konzentrationen bestimmt werden, die deutlich unter den für Linezolid definierten Grenzwert der MIC<sub>90</sub> von 4 µg/ml für MSSA und 2 µg/ml für MRSA liegen<sup>28;28;43</sup>. Alle in Plasma oder Gewebe gemessenen Konzentrationen lagen deutlich darüber, weshalb es nicht notwendig war, die Bestimmungsgrenze, z.B. durch Injektion größerer Probenvolumina oder Aufkonzentrierung der Proben noch zu senken.

### 4.2. Anwendung des Tiermodells für Linezolid

Experimente an Nagetieren sind anerkannte und nützliche Modelle, um die Pathogenese von bakteriellen Infektionen und ihre Therapie zu evaluieren. Die komplexen pathophysiologischen Mechanismen und Reaktionen auf eine Entzündung können *in vitro* nicht simuliert werden. Implantatassoziierte Infektionen sind schwerwiegende und schwierig zu behandelnde Komplikationen. Für ihre effektive Behandlung ist der Einsatz von

Antibiotika notwendig. Um betroffene Patienten auch weiterhin optimal behandeln zu können, ist in Hinblick auf die ständig anwachsende Resistenzentwicklung, eine Überprüfung der Effektivität neuer Antibiotika unabdingbar.

An der in dieser Arbeit verwendeten Operationsmethode wurden in der Arbeitsgruppe bereits Experimente mit Moxifloxacin, Vancomycin und Rifampicin durchgeführt<sup>70</sup>. Um diese auch mit Linezolid weiterführen zu können, wurde die Quantifizierung von Linezolid in den verschiedenen Gewebearten durchgeführt. Ziel war es dabei herauszufinden in welcher Dosis und mit welchem Applikationsintervall Linezolid im Tiermodell verabreicht werden muss, um humane Bedingungen bei Standarddosierung am besten nachzuahmen. Verschiedene Aspekte wurden dafür berücksichtigt und werden im Folgenden unter Berücksichtigung der ermittelten Daten diskutiert.

#### 4.2.1 Verwendete Dosisschemata

In der Literatur sind im Tiermodell verschiedene Applikationsschemata für Linezolid beschrieben.

An Kaninchen wurde zur Behandlung einer Endokarditis Linezolid dreimal täglich per Os zu 25, 50 bzw. 75 mg/kg KG verabreicht<sup>71</sup>. Chiang et al.<sup>72</sup> verabreichten Kaninchen eine Dosis von 75 mg/kg KG dreimal täglich über fünf Tage p. o. und in einer weiteren Gruppe wechselte das Behandlungsschema am zweiten Tag auf eine zweimal tägliche Dosierung.

Eine Osteomyelitisbehandlung bei Ratten beschrieben Patel et al.<sup>73</sup>. Hier wurde Linezolid intraperitoneal in einer Dosis von 25 mg/kg KG zweimal bzw. dreimal täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen verabreicht. Gentry-Nielsen et al.<sup>74</sup> untersuchten die pharmakokinetische Eigenschaften und die Effektivität von Linezolid bei Pneumokokkenpneumonie im Vergleich zu Ceftriaxon<sup>74</sup>. Hier wurden ebenfalls die Dosierung von 25 bzw. 50 mg/kg KG zweimal täglich p. o. untersucht.

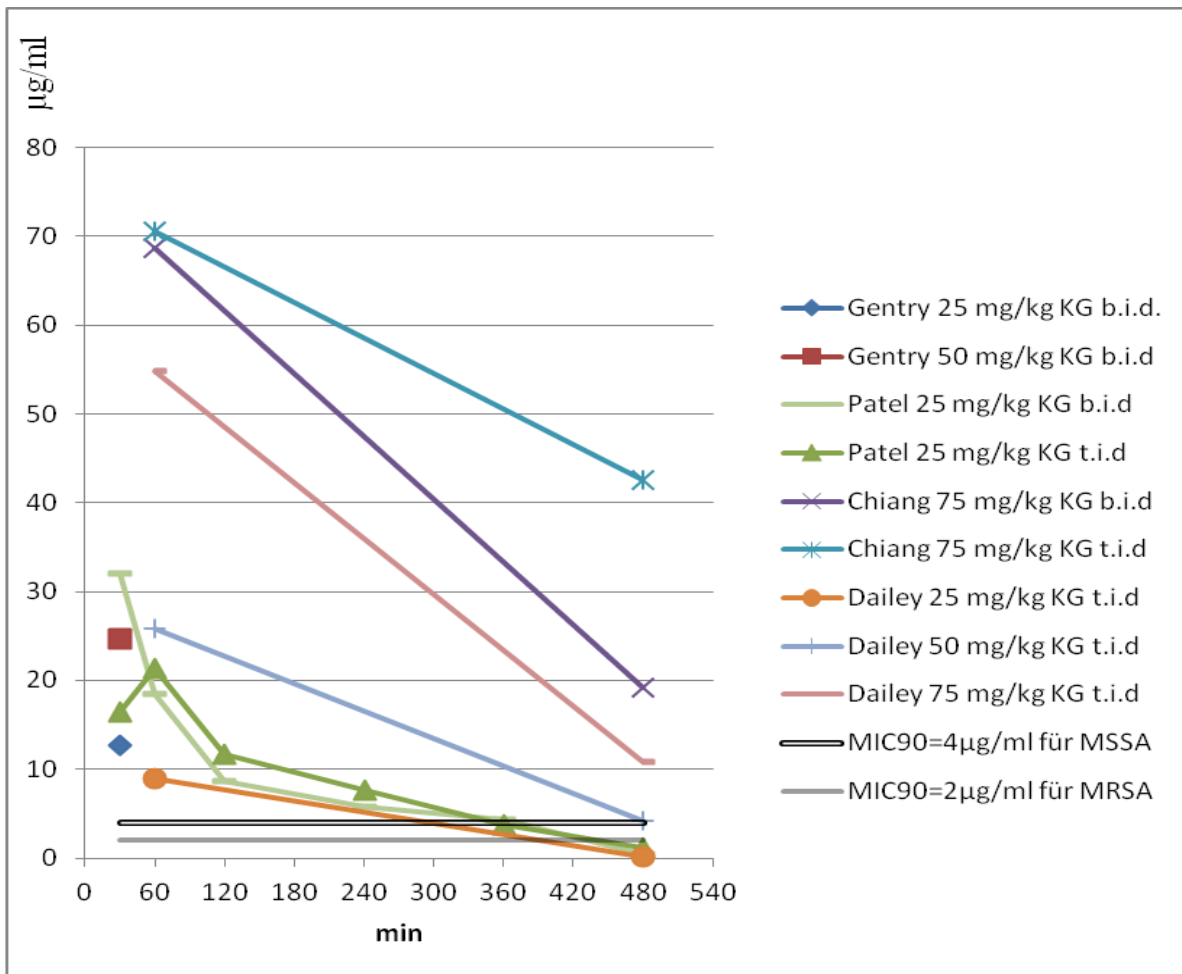


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$  aus Gentry-Nielsen et al.<sup>74</sup>, Patel et al.<sup>73</sup>, Chiang et al.<sup>72</sup>, Dailey et al.<sup>71</sup> im zeitlichen Verlauf zwischen 30 Minuten und acht Stunden. MIC=minimale Hemmkonzentration (Werte aus Gemell et al.<sup>43</sup>); t.i.d.: dreimal täglich, b.i.d.: zweimal täglich

Die intraperitoneale Verabreichung ist bei Ratten besser kontrollierbar und praktikabler, weshalb bei dieser Arbeit diese Applikationsform gewählt wurde. Aufgrund der in 1.3.2 beschriebenen Pharmakokinetik, sind die Ergebnisse gut mit denen anderer Applikationsformen vergleichbar.

Für diese Arbeit wurde eine zweimal tägliche Applikation ausgewählt. Die Applikationszeit wurde auf sieben Tage festgelegt. Neben der Dosis von 25 mg/kg KG wurde auch die Dosis von 50 mg/kg KG überprüft. Eine Dosis von 75 mg/kg KG war aufgrund des dann hohen Applikationsvolumens i. p. nicht durchführbar.

### 4.2.2 Ergebnisse im Vergleich

Die Plasmakonzentration zwei Stunden nach letzter Linezolidgabe in Gruppe A (11,23 µg/ml) ist mit dem Ergebnis nach dreimal täglicher Gabe von Patel et al. (11,7 µg/ml) fast identisch. Patel et al. ermittelten nach einer Stunde dabei ein fast doppelt so hohe Konzentration im Plasma (21,4 µg/ml). Gentry-Nielsen et al. beschreiben 30 Minuten nach letzter Dosisgabe ähnliche Werte wie in dieser Arbeit, bei gleichem Applikationsschema p. o.<sup>74</sup>. Dailey et al. ermittelten eine Stunde nach Verabreichung Plasmakonzentrationen von 9,0 µg/ml (25 mg/kg KG), 25,8 µg/ml (50 mg/kg KG) und 54,8 µg/ml (75 mg/kg KG). Hier sind die Konzentrationen deutlich geringer. Dies könnte an einer unterschiedlichen Pharmakodynamik bei Kaninchen liegen oder an der oralen Darreichungsform. Gegen Letzteres sprechen jedoch die Ergebnisse von Chiang et al., die eine Plasmakonzentration von 70,5 µg/ml (75 mg/kg KG) eine Stunde nach der letzten oralen Applikation ermittelten. Die ermittelten Werte der vorliegenden Arbeit stimmen damit gut mit den Befunden von Gentry-Nielsen et al. und Patel et al. überein.

Auch an Menschen gibt es Studien über die Konzentrationsverteilung von Linezolid nach der Gabe der Dosisempfehlung (600 g zweimal täglich). Rana et al.<sup>75</sup> beschrieben Konzentrationen, 90 Minuten nach letzter Applikation, im Plasma von 23,0 µg/ml, im Knochen von 8,49 µg/g und im Muskel von 18,51 µg/g. Dehghanyar et al.<sup>76</sup> zeigten um etwa 3 µg/ml bzw. µg/g niedrigere Werte im Plasma bzw. Muskel.

Diese Werte sind mit der Konzentration von 25 mg/kg KG in Ratten nicht zu erreichen. Um hier vergleichbare Werte zu erzeugen, sollte die höhere Konzentration von 50 mg/kg KG in Folgeversuche verwendet werden.

Die Plasma-Knochen-Relation, die die Verteilung ins Gewebe widerspiegelt, ist in dem hier verwendeten Modell (ca. 50-60% in beiden Gruppen) etwas höher als in humanen-Studien (43,6%<sup>77</sup>, 36,92 %<sup>75</sup>). Dies könnte auf die längere Applikationszeit zurückzuführen sein. Allerdings könnte auch die Infektion selbst dazu beitragen, dass höhere Knochenkonzentrationen erreicht werden. In den oben genannten Studien wurden gesunde Probanden untersucht. In unseren Untersuchungen zeigte sich in Gruppe B die größte Relation im linken Knochen (infizierte Seite) und im Vergleich zur rechten Seite fand sich eine signifikant höhere Linezolidkonzentration im Knochen.

### 4.2.3 Pharmakokinetik bei Ratten

Die größte und auch häufig vernachlässigte Einschränkung des Tiermodells bei Infektionen ist die unterschiedliche Pharmakokinetik bei den meisten Kleintieren im Vergleich zum Menschen<sup>4</sup>. Der größte Unterschied liegt dabei bei der schnelleren Elimination von Medikamenten bei Tieren<sup>78;79</sup>. Patel et al. zeigten diesen Effekt auch für Linezolid in Ratten. Die Plasmakonzentration fiel bei einer Konzentration nach zwei Stunden von 8,7 µg/ml auf 0,5 µg/ml nach acht Stunden (25 mg/kg KG b.i.d.)<sup>73</sup>. Chiang et al. und Daily et al. zeigten aber, dass der Konzentrationsabfall bei höherer Dosierung geringer ausfiel.

In Gruppe B erreichten wir zwei Stunden nach letzter Dosisapplikation etwas höhere Werte (24,33 µg/ml) als Patel et al. nach einer Stunde. Wie Dailey et al. zeigten, wird der Plasmaspiegel von Linezolid bei einer Gabe von 50 mg/kg KG ca. acht Stunden über der MIC<sub>90</sub> erreicht (vgl. Abbildung 8), obwohl die Konzentrationen im Plasma geringer waren.

Auch dieser Aspekt spricht für die Anwendung des Behandlungsschemas der Gruppe B.

### 4.2.4 Minimale Hemmkonzentration

Rana et al. und Dehghanyar et al. zeigten wie oben erwähnt, dass beim Menschen die MIC<sub>90</sub> für MSSA und MRSA sowohl im Plasma als auch im Gewebe überschritten wird. Durch die gute Plasma-Knochen-Relation auf der infizierten Seite, sollte dies auch im hier angewandten Tiermodell durch die zweimal tägliche Gabe der hohen Konzentration erreicht werden.

## 4.3. Folgeversuche

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Folgeversuche zur Bestimmung der Bakterienhemmung, wie sie bereits mit Moxifloxacin, Vancomycin und Rifampicin durchgeführt wurden, auch mit Linezolid praktikabel durchführbar sind. Dabei könnten sowohl MSSA als auch MRSA getestet werden. Sowohl die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Voraussetzungen sind dafür gegeben. Wie oben diskutiert sollte hierfür die Verabreichungskonzentration von 50mg/kg KG zweimal täglich gewählt werden.

Auch die in der Arbeit beschriebene HPLC-Methode zur Quantifizierung von Linezolid konnte gut validiert werden, so dass diese für weitere Versuche angewandt werden kann. Da

die Methode bei allen hier verwendeten Gewebearten gut anwendbar war, sollte diese auch für andere Gewebearten übertragbar sein. Auch die Analyse von humanen Plasma- und Gewebeprobe sollte mit dieser Methode möglich sein.

#### 4.3.1 Höhere Erfolgsraten mit Linezolid gegenüber Vancomycin bei MRSA-bedingten Pneumonie auf periprothetische Infektionen übertragbar

Daten aus einer großen internationalen klinischen Studie zeigten, dass die Therapie von nosokomialer MRSA-bedingten Pneumonie mit Linezolid, bezogen auf den primären Endpunkt, zu einer statistisch signifikanten höheren klinischen Erfolgsrate führt als eine Behandlung mit Vancomycin<sup>80</sup>. In Bezug auf den primären Endpunkt betrug die klinische Erfolgsrate bei Studienende in der Per-Protocol-Gruppe 57,6 % (95/165) bei den mit Linezolid behandelten Patienten und 46,6 % (81/174) bei den Patienten unter Vancomycin-Therapie. Diese Ergebnisse belegen die statistisch signifikant höhere klinische Erfolgsrate bei MRSA-bedingten Pneumonie von Linezolid gegenüber Vancomycin (95% CI 0,5%–21,6%; p=0,042).

Baldoni et al.<sup>81</sup> zeigten in einem Tiermodell, dass die Monotherapie mit Linezolid bei periprothetischen Infektionen (MRSA) fehlschlug. Die Daten zeigten eine Überlegenheit der Antibiotikakombination Linezolid und Rifampicin.

Auch John et al.<sup>82</sup> zeigten bei Fremdkörper assoziierten Infektionen eine Überlegenheit von Rifampicin. Bei der Monotherapie mit Rifampicin stellte die Bildung von rifampicinresistenten Keimen ein Problem dar (17 % in der planktonischen Phase und 25 % im Biofilm). Ein deutlicher Vorteil zeigte sich hier in der Kombinationstherapie. Die Kombination Rifampicin und Linezolid konnte die Resistenzbildung in der planktonischen Phase verhindern und die Rate im Biofilm auf 8 % reduzieren.

Wie diese Arbeit zeigt, ist die Linezolidkonzentration in der Lunge deutlich am höchsten. Dies könnte ein Grund für die Überlegenheit von Linezolid bei Pneumonie sein. Linezolid als Monotherapie scheint der Monotherapie von Rifampicin bei MRSA bedingten periprothetischen Infektionen unterlegen zu sein. Im Bezug auf die Resistenzbildung scheint die Kombinationstherapie mit Linezolid eine wichtige Rolle zu spielen. Die Folgeversuche werden zeigen, ob Linezolid alleine oder besser als Kombinationstherapie geeignet ist.

## 5. Zusammenfassung

Linezolid ist der erste Vertreter einer völlig neuen vollsynthetischen Stoffklasse der Antibiotika. Es zeigt eine gute Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien. Die Substanz wird in der Praxis bei Pneumonien sowie für die Therapie von schweren Haut- und Weichteilinfektionen, im Speziellen bei Infektionen die durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) oder Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) hervorgerufen werden, eingesetzt. Auch bei implantatassoziierten Infektionen spielen MRSA-Stämme eine immer größere Rolle. Ob Linezolid auch hier evidenzbasiert eingesetzt werden kann ist noch unklar und wird in Zukunft weiterer Forschung benötigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein Tiermodell zu entwickeln, um die Wirksamkeit von Linezolid bei implantatassoziierten Infektionen überprüfen zu können. Dazu wurde zunächst eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Linezolid in Plasma und Gewebe entwickelt und validiert. Die Methode zeichnete sich durch die Verwendung kleiner Probenvolumina und eine schnelle und einfache Probenaufbereitung aus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine tierexperimentelle Studie geplant und durchgeführt, in der Linezolidkonzentrationen in infizierten Ratten erreicht wurden, die mit humanen Plasma- und Gewebkonzentrationen nach Gabe der Dosisempfehlung (600 mg zweimal täglich) vergleichbar sind.

Zunächst wurde den Tieren durch ein standardisiertes Operationsverfahren ein Marknagel in den linken Femur implantiert und mit einer *S. aureus* Suspension beimpft. Anschließend wurden die Tiere randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Jede Gruppe wurde vom siebten bis 14. postoperativen Tag zweimal täglich mit 25 bzw. 50 mg/kg KG i. p. behandelt. Zwei Stunden nach der letzten Linezolidgabe wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet und Plasma sowie Gewebe (Knochen, Leber, Lunge, Fett, Muskel) entnommen.

Nach der Auswertung der Linezolidkonzentrationen mit Hilfe der HPLC zeigte sich, dass sich durch die Gabe von 50 mg/kg KG ein vergleichbarer Plasma- und Gewebsspiegel wie im Menschen erreichen lässt. Im infizierten Knochen war die Konzentration von Linezolid signifikant höher als im nicht-infizierten Knochen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Domagk, G.** 1935. Êin Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektion. Deutsche Medizinische Wochenschrift **61**:250.
2. **Abraham, E. P.** 1980. Fleming's discovery. Rev. Infect. Dis. **2**:140.
3. **Beam, T. R., Jr., D. N. Gilbert, and C. M. Kunin.** 1992. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. Clin. Infect. Dis. **15 Suppl 1**:S5-32.
4. **Zak, O., M. Sande, and T. O'reilly.** 1999. Introduction: The Role of Animal Models in the Evaluation of New Antibiotics, p. xxii. Academic Press, San Diego.
5. **Maathuis, P. G., D. Neut, H. J. Busscher, H. C. van der Mei, and J. R. van Horn.** 2005. Perioperative contamination in primary total hip arthroplasty. Clin. Orthop. Relat Res.136-139.
6. **Waldvogel, F. A. and A. L. Bisno.** 2000. Infections associated with indwelling medical devices. ASM Press, Washington, DC.
7. **Zimmerli, W.** 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. **20**:1045-1063.
8. **Gschwend, N.** 2002. Present state-of-the-art in elbow arthroplasty. Acta Orthop. Belg. **68**:100-117.
9. **SooHoo, N. F., D. S. Zingmond, and C. Y. Ko.** 2007. Comparison of reoperation rates following ankle arthrodesis and total ankle arthroplasty. J. Bone Joint Surg. Am. **89**:2143-2149.
10. **Gallo, J., M. Kolar, R. Novotny, P. Rihakova, and V. Ticha.** 2003. Pathogenesis of prosthesis-related infection. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub. **147**:27-35.
11. **Perdreau-Remington, F., D. Stefanik, G. Peters, C. Ludwig, J. Rutt, R. Wenzel, and G. Pulverer.** 1996. A four-year prospective study on microbial ecology of explanted prosthetic hips in 52 patients with "aseptic" prosthetic joint loosening. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15**:160-165.
12. **Nguyen, L. L., C. L. Nelson, M. Saccente, M. S. Smeltzer, D. L. Wassell, and S. G. McLaren.** 2002. Detecting bacterial colonization of implanted orthopaedic devices by ultrasonication. Clin. Orthop. Relat Res.29-37.
13. **Zimmerli, W., A. Trampuz, and P. E. Ochsner.** 2004. Prosthetic-joint infections. N. Engl. J. Med. **351**:1645-1654.

14. **Gristina, A.** 2004. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin. Orthop. Relat Res.*4-12.
15. **Shams, W. E. and R. P. Rapp.** 2004. Methicillin-resistant staphylococcal infections: an important consideration for orthopedic surgeons. *Orthopedics* **27**:565-568.
16. **Huang, S. S. and R. Platt.** 2003. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin. Infect. Dis.* **36**:281-285.
17. **Garrouste-Org, J. F. Timsit, H. Kallel, A. Ben Ali, M. F. Dumay, B. Paoli, B. Misset, and J. Carlet.** 2001. Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU patients: morbidity, mortality, and glycopeptide use. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**:687-692.
18. **Kresken, M.** 2003. [Bacterial resistance in Germany. How great is the danger?]. *Med. Monatsschr. Pharm.* **26**:38-44.
19. **European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)/National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).**EARSS resistance data. 2009. <http://www.rivm.nl/earss/database/>.
20. **Bozic, K. J. and M. D. Ries.** 2005. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**:1746-1751.
21. **Nixon, M., B. Jackson, P. Varghese, D. Jenkins, and G. Taylor.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopaedic wards: incidence, spread, mortality, cost and control. *J. Bone Joint Surg. Br.* **88**:812-817.
22. **Shukla, S., M. Nixon, M. Acharya, M. T. Korim, and R. Pandey.** 2009. Incidence of MRSA surgical-site infection in MRSA carriers in an orthopaedic trauma unit. *J. Bone Joint Surg. Br.* **91**:225-228.
23. **Donlan, R. M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:881-890.
24. **Patel, R.** 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat Res.*41-47.
25. **Horn, J., U. Schlegel, C. Krettek, and K. Ito.** 2005. Infection resistance of unreamed solid, hollow slotted and cannulated intramedullary nails: an in-vivo experimental comparison. *J. Orthop. Res.* **23**:810-815.
26. **Schlegel, U. and S. M. Perren.** 2006. Surgical aspects of infection involving osteosynthesis implants: implant design and resistance to local infection. *Injury* **37 Suppl 2**:S67-S73.
27. **Zimmerli, W., F. A. Waldvogel, P. Vaudaux, and U. E. Nydegger.** 1982. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J. Infect. Dis.* **146**:487-497.
28. **Pharmacia.** 2002. Zyvoxid® - Standardinformation für Krankenhausapotheker . Pharmazia GmbH, Erlangen.

29. **Stalker, D., C. Wajszczuk, and D. Batts.** 1997. Linezolid safety, tolerance, and pharmacokinetics after intravenous dosing twice daily for 7.5 days [abstract]. 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto.
30. **Welshman, I. R., T. A. Sisson, G. L. Jungbluth, D. J. Stalker, and N. K. Hopkins.** 2001. Linezolid absolute bioavailability and the effect of food on oral bioavailability. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**:91-97.
31. **Halle, E., J. Majcher-Peszynska, and B. Drewelow.** 2002. Linezolid: das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone . *Chemotherapie Journal* **1**:1-11.
32. **Diekema, D. I. and R. N. Jones.** 2000. Oxazolidinones: a review. *Drugs* **59**:7-16.
33. **Perry, C. M. and B. Jarvis.** 2001. Linezolid: a review of its use in the management of serious gram-positive infections. *Drugs* **61**:525-551.
34. **Slatter, J. G., D. J. Stalker, K. L. Feenstra, I. R. Welshman, J. B. Bruss, J. P. Sams, M. G. Johnson, P. E. Sanders, M. J. Hauer, P. E. Fagerness, R. P. Stryd, G. W. Peng, and E. M. Shobe.** 2001. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of [(14)C]linezolid to healthy human subjects. *Drug Metab Dispos.* **29**:1136-1145.
35. **Brier, M. E., D. J. Stalker, G. R. Aronoff, D. H. Batts, K. K. Ryan, M. O'Grady, N. K. Hopkins, and G. L. Jungbluth.** 2003. Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2775-2780.
36. **Wise, R., J. M. Andrews, F. J. Boswell, and J. P. Ashby.** 1998. The in-vitro activity of linezolid (U-100766) and tentative breakpoints. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:721-728.
37. **Jones, R. N., D. M. Johnson, and M. E. Erwin.** 1996. In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:720-726.
38. **Kloss, P., L. Xiong, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin.** 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* **294**:93-101.
39. **Swaney, S. M., H. Aoki, M. C. Ganoza, and D. L. Shinabarger.** 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3251-3255.
40. **Aoki, H., L. Ke, S. M. Poppe, T. J. Poel, E. A. Weaver, R. C. Gadwood, R. C. Thomas, D. L. Shinabarger, and M. C. Ganoza.** 2002. Oxazolidinone antibiotics target the P site on Escherichia coli ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1080-1085.
41. **Xiong, L., P. Kloss, S. Douthwaite, N. M. Andersen, S. Swaney, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin.** 2000. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of Escherichia coli reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J. Bacteriol.* **182**:5325-5331.

42. **Pfizer Pharma GmbH.** 2007. Zyvoxid® Fachinformation . Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe.
43. **Gemmell, C. G.** 2001. Susceptibility of a variety of clinical isolates to linezolid: a European inter-country comparison. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:47-52.
44. **Brickner, S. J., D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. A. Ulanowicz, S. A. Garmon, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, and G. E. Zurenko.** 1996. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J. Med. Chem.* **39**:673-679.
45. **Zurenko, G. E., B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, and S. J. Brickner.** 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:839-845.
46. **Erturan, Z. and M. Uzun.** 2005. In vitro activity of linezolid against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. *Int J. Antimicrob. Agents* **26**:78-80.
47. **Alcaide, F., L. Calatayud, M. Santin, and R. Martin.** 2004. Comparative in vitro activities of linezolid, telithromycin, clarithromycin, levofloxacin, moxifloxacin, and four conventional antimycobacterial drugs against Mycobacterium kansasii. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4562-4565.
48. **French, G.** 2003. Safety and tolerability of linezolid. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 2**:ii45-ii53.
49. **Abena, P. A., V. G. Mathieux, J. M. Scheiff, L. M. Michaux, and B. C. Vandercam.** 2001. Linezolid and reversible myelosuppression. *JAMA* **286**:1973.
50. **Green, S. L., J. C. Maddox, and E. D. Huttenbach.** 2001. Linezolid and reversible myelosuppression. *JAMA* **285**:1291.
51. **Gerson, S. L., S. L. Kaplan, J. B. Bruss, V. Le, F. M. Arellano, B. Hafkin, and D. J. Kuter.** 2002. Hematologic effects of linezolid: summary of clinical experience. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2723-2726.
52. **Hendershot, P. E., E. J. Antal, I. R. Welshman, D. H. Batts, and N. K. Hopkins.** 2001. Linezolid: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of coadministration with pseudoephedrine HCl, phenylpropanolamine HCl, and dextromethorpan HBr. *J. Clin. Pharmacol.* **41**:563-572.
53. **O'reilly, T. and J. T. Mader.** 1999. Rat Model of Bacterial Osteomyelitis of the Tibia, p. 560-575. Academic Press, San Diego.
54. **Zak, O. and M. A. Sande.** 1999. Handbook of animal models of infection. Academic Press, San Diego.
55. **Nasal, A., D. Siluk, and R. Kaliszan.** 2003. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.* **10**:381-426.

56. **Kromidas, S.** 2007. Methodenvalidierung in der Analytik. [http://www.novia.de/docs/Methodenvalidierung\\_in\\_der\\_Analytik.pdf](http://www.novia.de/docs/Methodenvalidierung_in_der_Analytik.pdf).
57. **Meyer, V.** 1999. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Otto Salle Verlag, Frankfurt/M.
58. **Peters, F. T., M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, and F. Mushoff.** 2004. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang C: Anforderungen and die Durchführung von Analysen. *Toxichem. and Krimtech.* **71**:146-154.
59. **Aderjan, R., T. Briellmann, T. Daldrup, U. Demme, K. Harzer, M. Herbold, H. Käferstein, G. Kauert, L. V. Meyer, M. Möller, F. Musshoff, and G. Schmitt.** 1996. Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensischtoxikologischen Untersuchungen. *Toxichem. and Krimtech.* **65**:2-8.
60. **Green, J. M.** 1996. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry* **68**:305A-309A.
61. **Borner, K., E. Borner, and H. Lode.** 2001. Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. *Int J. Antimicrob. Agents* **18**:253-258.
62. **Buerger, C., C. Joukhadar, M. Muller, and C. Kloft.** 2003. Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **796**:155-164.
63. **Guerrero, L., P. Martinez-Olondris, M. Rigol, M. Esperatti, C. Esquinas, N. Luque, R. Piner, A. Torres, and D. Soy.** 2010. Development and validation of a high performance liquid chromatography method to determine linezolid concentrations in pig pulmonary tissue. *Clin. Chem. Lab Med.* **48**:391-398.
64. **MacGowan, A. P.** 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 2**:ii17-ii25.
65. **Peng, G. W., R. P. Stryd, S. Murata, M. Igarashi, K. Chiba, H. Aoyama, M. Aoyama, T. Zenki, and N. Ozawa.** 1999. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20**:65-73.
66. **Sagirli, O., A. Onal, S. Toker, and A. Oztunc.** 2009. Determination of linezolid in human breast milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. AOAC Int* **92**:1658-1662.
67. **Tobin, C. M., J. Sunderland, L. O. White, and A. P. MacGowan.** 2001. A simple, isocratic high-performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:605-608.

68. **Boak, L. M., J. Li, R. L. Nation, and C. R. Rayner.** 2006. High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* **20**:782-786.
69. **Ehrlich, M., R. Trittler, F. D. Daschner, and K. Kummerer.** 2001. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **755**:373-377.
70. **Beckmann, J., F. Kees, J. Schaumburger, T. Kalteis, N. Lehn, J. Grifka, and K. Lerch.** 2007. Tissue concentrations of vancomycin and Moxifloxacin in periprosthetic infection in rats. *Acta Orthop.* **78**:766-773.
71. **Dailey, C. F., C. L. Dileto-Fang, L. V. Buchanan, M. P. Oramas-Shirey, D. H. Batts, C. W. Ford, and J. K. Gibson.** 2001. Efficacy of linezolid in treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2304-2308.
72. **Chiang, F. Y. and M. Climo.** 2003. Efficacy of linezolid alone or in combination with vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3002-3004.
73. **Patel, R., K. E. Piper, M. S. Rouse, and J. M. Steckelberg.** 2000. Linezolid therapy of *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3438-3440.
74. **Gentry-Nielsen, M. J., K. M. Olsen, and L. C. Preheim.** 2002. Pharmacodynamic activity and efficacy of linezolid in a rat model of pneumococcal pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1345-1351.
75. **Rana, B., I. Butcher, P. Grigoris, C. Murnaghan, R. A. Seaton, and C. M. Tobin.** 2002. Linezolid penetration into osteo-articular tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:747-750.
76. **Dehghanyar, P., C. Burger, M. Zeitlinger, F. Islinger, F. Kovar, M. Muller, C. Kloft, and C. Joukhadar.** 2005. Penetration of linezolid into soft tissues of healthy volunteers after single and multiple doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2367-2371.
77. **Metallidis, S., J. Nikolaidis, G. Lazaraki, E. Koumentaki, V. Gogou, D. Topsis, P. Nikolaidis, N. Charokopos, and G. Theodoridis.** 2007. Penetration of linezolid into sternal bone of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Int J. Antimicrob. Agents* **29**:742-744.
78. **O'reilly, T., R. Cleeland, and E. Squires.** 1996. Evaluation of Antimicrobials in Experimental Animal Infections, p. 599-759. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore.
79. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1-10.

80. **Kunkel, M. e. al.** 2010. Linezolid vs vancomycin in the treatment of nosocomial pneumonia due to proven methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ZEPHYR). IDSA October 2010.
81. **Baldoni, D., M. Haschke, Z. Rajacic, W. Zimmerli, and A. Trampuz.** 2009. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1142-1148.
82. **John, A. K., D. Baldoni, M. Haschke, K. Rentsch, P. Schaerli, W. Zimmerli, and A. Trampuz.** 2009. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2719-2724.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Area under the curve
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
ca.	cirka
CV	Variationskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
et al.	et allil
etc.	etcetera
evtl.	eventuell
Fa	Firma
g	Gramm
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography)
i.d.R.	in der Regel
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)

LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
Lux	Beleuchtungsstärke
MAO	Monoaminoxidase
MeCN	Acetonitril
mg	Milligramm
MIC-Wert	minimum inhibitory concentration = niedrigste Konzentration einer antibakteriellen Substanz, die die Vermehrung eines Bakterienstammes unter definierten Bedingungen verhindert
Min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin resistenter Staphylococcus epidermidis
MSSA	Methicillin sensibler Staphylococcus aureus
MSSE	Methicillin sensibler Staphylococcus epidermidis
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Qcm	Quadratzentimeter
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSD	relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
Staph.	Staphylococcus
TCA	Trichloressigsäure
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

UV	ultraviolett
Vgl.	vergleiche
VRE	Vancomycin-resistenten <i>Enterococcus faecium</i>
W	Wiederfindungsrate
w/v	Massenkonzentration
X	arithmetisches Mittel
X <sub>soll</sub>	Sollwert
z. B.	zum Beispiel

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Chemische Struktur von Linezolid und seiner Hauptmetaboliten, die durch oxidative Spaltung des Morpholin-Rings entstehen. In wässriger Lösung liegt ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen den Carbonsäuren und der Lacton- bzw. Lactam-Struktur vor.

Abbildung 2: Schema einer HPLC

Abbildung 3: Tissue-Pulverizer zum Zerkleinern tiefgefrorener Gewebe

Abbildung. 4: Chromatogramme von A: Leerplasma und Leergewebe (Tier-Nr. A1), B: Leerwert Knochen und Knochen rechts (Tier-Nr. A1), C: Leerwert Leber und Leber(Tier-Nr. A1), D: Leerwert Lunge und Lunge (Tier-Nr. A1), E: Leerwert Fett und Fett (Tier-Nr. A1), F: Leerwert Muskel und Muskel rechts (Tier-Nr. A1). Retentionszeit von Linezolid ca. 5,7 Minuten.

Abbildung 5: Linearität von Linezolid im Plasma im Bereich 0,20 µg/ml bis 40,00 µg/ml. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

Abbildung 6: Gewebe-Plasma-Relation in % mit Standardabweichung. Verhältnis Mittelwerte der Gewebskonzentrationen zur Plasmakonzentration

Abbildung 7: Vergleich infizierte (linke) und nichtinfizierter (rechte) Seite. Mittelwerte in µg/g

Abbildung 8: Plasmakonzentrationen in µg/ml aus Gentry-Nielsen et al. 74, Patel et al. 73, Chiang et al. 72, Dailey et al. 71 im zeitlichen Verlauf zwischen 30 Minuten und acht Stunden. MIC=minimale Hemmkonzentration (Werte aus Gemmell et al. 43); t.i.d.: dreimal täglich, b.i.d.: zweimal täglich

## 8.2. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration (MIC) in mg/L angegeben. Tabelle Modifiziert nach Gemzell et al. <sup>43</sup> MSSA=Methicillin sensibler *Staphylococcus aureus*, MRSA=Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*; MSSE= Methicillin sensibler *Staphylococcus epidermidis*; MRSE= Methicillin resistenter *Staphylococcus epidermidis*; MIC=minimale Hemmkonzentration

Tabelle 2: Chemikalien, Lösungen, Medikamente

Tabelle 3: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Messergebnisse Standardreihen zur Präzisionsbestimmung und Wiederfindung. MW=Mittelwert; X=ermittelte Wert; SD=Standardabweichung; CV<sub>intra</sub>=intra-Assay Varianz;

Tabelle 5: Wiederfindungsrate von Linezolid im Gewebe (Mittelwert aus n=4 Messwerten)

Tabelle 6: Plasmakonzentrationen von Linezolid im Plasma von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 25 bzw. 50 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal. c<sub>Plasma</sub>=Plasmakonzentration; n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung; Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert

Tabelle 7: Gewebekonzentrationen von Linezolid in µg/g von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 25 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal.

<sup>a</sup> Mittelwert aus Doppelbestimmung; Einzelwerte: 149,9, 125,2µg/ml

<sup>b</sup> Kein signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)

n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung; Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert; P=P-Wert

Tabelle 8: Gewebekonzentrationen von Linezolid in µg/g von Ratten nach siebentägiger Behandlung mit 50 mg/kg KG Linezolid intraperitoneal.

<sup>a</sup> Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; Einzelwerte: B2:51,2, 51,9 µg/g; B3: 51,8, 57,2 µg/g

<sup>b</sup> Kein signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)

<sup>c</sup> Signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Seite (zweiseitiger, gepaarter t-Test)

d Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und B (zweiseitiger, ungepaarter t-Test)

n=Probenanzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; RSD=relative Standardabweichung; Median=Zentralwert; Min=minimaler Wert, Max=maximaler Wert; P=P-Wert

## 9. Curriculum vitae

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Michael Bauer
	Geburtsdatum:	30.01.1981
	Geburtsort:	Regensburg
<u>Schulbildung:</u>	09/1987-07/1991	Grundschule Hainsacker
	09/1991-06/2000	Privat-Gymnasium Pindl
<u>Zivildienst:</u>	10/2000-08/2001	Krankenhaus St. Josef Regensburg
<u>Beruf:</u>	04/2002-09/2004	Werkstudent, OSRAM Regensburg
<u>Hochschulstudium:</u>	10/2004-11/2010	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
	08/2006	1. Ärztliche Prüfung
	10/2010	2. Ärztliche Prüfung
<u>Famulaturen:</u>	03/2007	Innere Medizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
	08/2007	Radiologie, Universitätsklinikum Regensburg
	03/2008	Anästhesie, Krankenhaus St. Josef Regensburg
	09/2008 und 03/2009	HNO, Praxis Dr. Eichelberg Regensburg

<u>PJ:</u>	08/2009-10/2009	Innere Medizin, Concord Hospital, University of Sydney
	10/2009-12/2009	Innere Medizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
	12/2009-04/2010	Chirurgie, Krankenhaus St. Josef Regensburg
	04/2010-08/2010	Anästhesie, Klinikum St. Marien Amberg
<u>Zusatzqualifikation:</u>	11/2008-02/2009	Ultraschallseminar Abdomen, Universitätsklinikum Regensburg
	11/2008-02/2009	Strahlenschutz für Ärzte nach Röntgenverordnung für Röntgendiagnostik und –therapie, Universitätsklinikum Regensburg
<u>Facharztausbildung:</u>	seit 01/2011	Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum St. Marien Amberg

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Grifka für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung durchführen zu können. Sowie Herrn PD Dr. med. Thomas Kalteis für das mit der Überlassung dieses Themas in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Dr. med. Jens Schaumburger danke ich herzlich für die exzellente Betreuung, die Ausdauer mich immer wieder voranzutreiben und meine häufigen Fragen zu beantworten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frieder Kees vom pharmakologischen Institut der Universität Regensburg für die Mithilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Vielen Dank für die Bereitstellung der Laborräume.

Dem Team des Tierstalls unter Leitung von Herrn Engelbert Meier danke ich für die herausragende Betreuung der Versuchstiere.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Mitarbeit meiner Mitdoktoranden, mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Christine Scheuerer.

Meinen Eltern gilt der besondere Dank, mich während der Zeit meines Studiums und der Doktorarbeit finanziell und besonders aber ideell unterstützt zu haben. Danken möchte ich auch meiner Schwester, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Bruder und allen meinen guten Freunde danke ich dafür, dass sie während der Studien- und Promotionszeit dafür gesorgt haben, dass ich nicht vergesse „zu leben“ und immer aufbauende Worte für mich haben. Vielen lieben Dank!