

**Entwicklung eines mathematischen Modells
zur Vorhersage
der Wirkung von Antibiotika**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Antina Barger

aus

Neuenhaus

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann
2. Referent: Prof. Dr. W. Alt

Tag der Promotion: 16. Januar 2004

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Beurteilung und Vorhersage der antibakteriellen Wirkung in der Antibiotikatherapie	1
1.2 Mathematische Modelle zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika.....	4
1.2.1 E_{\max} Modelle/ Dosis-Wirkungs-Modelle.....	4
1.2.2 Mathematische Modelle zur Beschreibung der Absterbekinetik.....	5
1.2.2.1 Modell „Nolting“	5
1.2.2.2 Modell „Yano“	6
1.2.2.3 Modell „Schuck“	9
1.2.2.4 Modell „Mouton“	10
1.3 Bakterien.....	11
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.4 Antibiotika.....	12
1.4.1 Chinolone.....	12
1.4.2 Aminoglykoside.....	14
1.4.3 β -Laktame.....	15
1.5 Persistenz von Bakterien.....	15
1.6 Zielsetzung.....	18
2. Material & Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Bakterienstämme.....	20
2.1.2 Antibiotika.....	20
2.1.3 Nährmedien und Lösungen.....	20
2.1.4 Geräte und sonstige Materialien.....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Übernachtkultur.....	21
2.2.2 Dauerkultur.....	22
2.2.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration.....	22
2.2.4 Keimzahlbestimmung.....	22
2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Antibiotika.....	23

2.2.6	Bachtkultur.....	24
2.2.7	In-vitro Modell.....	24
2.2.7.1	Aufbau des in-vitro Modells nach Löwdin.....	24
2.2.7.2	Versuchsdurchführung im in-vitro Modell nach Löwdin.....	25
2.2.7.3	Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung ohne Resorption im Ein-Kompartiment- Modell.....	26
2.2.8	Ermittlung der Anzahl persistierender Bakterien.....	27
2.2.9	Nachweis von Alarmonen im Kulturmedium.....	27
2.2.10	Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung.....	28
2.2.11	Versuchsauswertung.....	29
2.2.12	Simulation und Anpassung der mathematischen Modelle.....	32
2.2.12.1	Simulation der mathematischen Modelle.....	32
2.2.12.2	Anpassung der mathematischen Modelle.....	32
3.	Ergebnisse.....	37
3.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration.....	37
3.2	Bestimmung der antibakteriellen Wirkung in der Batchkultur.....	37
3.2.1	Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>E. coli</i>	37
3.2.2	Antibakterielle Wirkung von Moxifloxacin auf <i>E. coli</i>	38
3.2.3	Antibakterielle Wirkung von Tobramycin auf <i>E. coli</i>	39
3.2.4	Antibakterielle Wirkung von Ampicillin auf <i>E. coli</i>	40
3.2.5	Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>S. aureus</i>	41
3.3	In-vitro Modell.....	42
3.3.1	Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>E. coli</i> im in-vitro Modell.....	42
3.3.2	Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>S.aureus</i> im in-vitro Modell.....	43
3.4	Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung.....	43
3.5	Berechnung der pharmakokinetischen/ pharmakodynamischen Parameter und der pharmkologischen Indices.....	45
3.6	Mathematische Modellierung und dadurch angeregte Versuche.....	48
3.6.1	Anpassung der mathematischen Modelle.....	48
3.6.1.1	Parameterabschätzung.....	48

3.6.2	E_{\max} Modelle.....	51
3.6.3	Modell „Nolting“.....	53
3.6.4	Modell „Heterogene Population“.....	54
3.6.4.1	Annahmen des Modells „Heterogene Population“.....	54
3.6.4.2	Ermittlung der Anzahl persistierender Bakterien.....	56
3.6.4.3	Anpassung des Modells „Heterogene Population“.....	57
3.6.5	Modell „Alarmon“.....	58
3.6.5.1	Annahmen des Modells „Alarmon“.....	58
3.6.5.2	Bildung von Alarmonen in einer antibiotikumbehandelten Kultur.....	59
3.6.5.3	Anpassung des Modells „Alarmon“.....	60
3.6.6	Modell „Yano“.....	61
3.6.6.1	Anpassung des Modells „Yano“.....	61
3.6.6.2	Konzentrationsbestimmung von Ciprofloxacin.....	62
3.6.7	Modell „Schuck“.....	63
3.6.8	Modell „Mouton“.....	65
3.6.9	Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“.....	66
3.6.9.1	Annahmen des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“.....	66
3.6.9.2	Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“.....	68
3.6.9.3	Verallgemeinerung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“.....	72
3.6.9.3.1	<i>Escherichia coli</i> – Ciprofloxacin.....	72
3.6.9.3.2	<i>Escherichia coli</i> – Moxifloxacin.....	73
3.6.9.3.3	<i>Escherichia coli</i> – Tobramycin.....	74
3.6.9.3.4	<i>Escherichia coli</i> – Ampicillin.....	75
3.6.9.3.5	<i>Staphylococcus aureus</i> – Ciprofloxacin.....	76
3.6.9.4	Anwendung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten im in-vitro Modell.....	77
3.6.9.4.1	<i>Escherichia coli</i> – Ciprofloxacin.....	77
3.6.9.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i> – Ciprofloxacin.....	79
3.6.10	Modelle im Überblick.....	81

4. Diskussion.....	88
4.1 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung in der Batchkultur.....	88
4.1.1 Bakterizide Wirkungsmuster.....	88
4.1.1.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>E. coli</i>	89
4.1.1.2 Antibakterielle Wirkung von Moxifloxacin auf <i>E. coli</i>	90
4.1.1.3 Antibakterielle Wirkung von Tobramycin auf <i>E. coli</i>	90
4.1.1.4 Antibakterielle Wirkung von Ampicillin auf <i>E. coli</i>	91
4.1.1.5 Einteilung in bakterizide Wirkungsmuster.....	91
4.1.2 Antibakterielle Wirkung von Ciprofoxacin auf <i>S. aureus</i>	91
4.2 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung im in-vitro Modell.....	92
4.2.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>E. coli</i>	92
4.2.2 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf <i>S. aureus</i>	94
4.3 Persistenz von Bakterien.....	94
4.4 Vorhersage der antibakteriellen Wirkung mittels pharmakologischer Indices.....	95
4.5 Mathematische Modelle.....	98
4.5.1 Parameterabschätzung.....	98
4.5.2 E _{max} Modelle.....	101
4.5.3 Modell „Nolting“.....	102
4.5.4 Modell „Heterogene Population“.....	103
4.5.5 Modell „Alarmon“.....	104
4.5.6 Modell „Yano“.....	106
4.5.7 Modell „Schuck“.....	106
4.5.8 Modell „Mouton“.....	107
4.5.9 Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“.....	108
4.5.10 Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“.....	111
4.5.11 Modelle im Überblick.....	113
4.6 Ausblick.....	114
5. Zusammenfassung.....	115
6. Literaturverzeichnis.....	117
7. Anhang.....	125
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	125

7.2	Parameterverzeichnis der mathematischen Modelle.....	127
7.3	Bestimmung der Wachstumsrate und der Absterberate.....	131
	7.3.1 Absterberate.....	131
	7.3.2 Wachstumsrate.....	131
7.4	Vereinfachung der experimentellen Daten.....	132
7.5	Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ incl. Austausch zwischen den Teilpopulationen N_1 und N_2	133
7.6	Danksagung.....	134

1. Einleitung

Antibiotika stellen eine der wichtigsten Arzneimittelgruppen dar, mit denen sich lebensbedrohliche Infektionskrankheiten kausal therapieren lassen. Die Wirkung eines Antibiotikums ist von der Wechselwirkung zwischen Antibiotikum und der bakteriellen Zielstruktur und den daraus resultierenden Effekten abhängig. Aufgrund der Interaktion zwischen Antibiotikum und bakteriellem Rezeptor wird eine Reaktionskaskade ausgelöst, die zum reversiblen Wachstumsstopp (bakteriostatische Wirkung) oder zur irreversiblen Abtötung der Zellen (bakterizide Wirkung) führt. Diese Folgen der Wechselwirkungen zwischen Zielstruktur und Antibiotikum sind für den klinischen Erfolg entscheidend [Heisig *et al.* 2001].

Für die Vorhersage der Wirkung von einzelnen Antibiotikaklassen wurden mathematische Modelle entwickelt, die es ermöglichen, das Absterbeverhalten von einer Spezies von Infektionserregern nach Einwirkung dieses Antibiotikums zu berechnen [Mouton, 2003; Nolting *et al.* 1996; Yano *et al.* 1998]. Eine Übertragung dieser mathematischen Modelle auf andere Antibiotikaklassen und Infektionserreger ist bisher nur sehr eingeschränkt möglich.

Das entwickelte mathematische Modell soll die Vorhersage über die antibakterielle Wirkung von Antibiotika aus unterschiedlichen Klassen auf verschiedene Erreger ermöglichen.

1.1 Beurteilung und Vorhersage der antibakteriellen Wirkung in der Antibiotikatherapie

Die therapeutische Wirkung eines Antibiotikums, die zusammen mit dem Immunsystem die Heilung einer Infektionskrankheit bewirkt, ist von dessen Pharmakologie abhängig. Die Pharmakologie der Antibiotika wird nach Craig in die Teilgebiete **Pharmakokinetik (PK)** und **Pharmakodynamik (PD)** unterteilt [Craig, 1995].

Zum Vergleich der Antibiotikawirkung und auch zur Vorhersage des Therapieerfolges werden häufig **Pharmakologische Indices** verwendet, die eine Kombination aus einem pharmakokinetischen (PK) und einem pharmakodynamischen (PD) Parameter darstellen [Mouton *et al.* 2002]. Das Verhältnis aus einem PK-Parameter und einem PD-Parameter ist zu einer Zahl zusammen gefasst, welche die Wirkung eines Antibiotikums im Körper beschreiben soll.

Die **Pharmakokinetik** beschreibt dabei den Konzentrations-Zeit-Verlauf eines Antibiotikums im Organismus. Üblicherweise wird die Pharmakokinetik eines Antibiotikums im Blutserum gemessen. Anhand der gemessenen Konzentrationen und dem daraus resultierenden Kurvenverlauf werden pharmakokinetische Parameter ermittelt. Der Parameter **AUC** (= **area under the curve**) ist das Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 Stunden und gibt

Auskunft über die zur Verfügung stehende Substanzmenge im Körper. Ein weiterer häufig verwendeter pharmakokinetischer Parameter ist C_{\max} , die höchste Konzentration, die im Referenz-Kompartiment, üblicherweise im Blutserum, während des Applikationsintervalls erreicht wird [Mouton *et al.* 2002].

Die **Pharmakodynamik** beschreibt die antibakterielle Wirkung des Antibiotikums. Im Gegensatz zu anderen Arzneimitteln, die an zelluläre Strukturen des Wirtsorganismus binden, ist die Wirkung des Antibiotikums von der Wechselwirkung zwischen Antibiotikum und dem bakteriellen Rezeptor und den daraus resultierenden Effekten abhängig [Wiedemann *et al.* 1990]. Der am häufigsten verwendete pharmakodynamische Parameter zur Ermittlung der antibakteriellen Wirkung ist die **minimale Hemmkonzentration (MHK)**. Sie ist die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die ein sichtbares Wachstum eines Bakterienstammes verhindert. Die Bestimmung der MHK erfolgt nach einer 18-24-stündigen Inkubation bei 37 °C bei einem Inokulum von $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ KBE/mL [Deutsches Institut für Normung e.V., 2000]. Es handelt sich somit um eine Endpunktbestimmung, die keine Aussage über das antibakterielle Geschehen während der 18-24-stündigen Inkubationsphase zulässt. Dabei kann bei gleicher MHK die Wirkung des Antibiotikums auch innerhalb einer Substanzklasse unterschiedlich sein. Zum Beispiel zeigt Erythromycin eine bakteriostatische und Telithromycin eine bakterizide Wirkung. Beide Substanzen gehören zu der Antibiotikaklasse der Makrolide. Des Weiteren kann bei gleicher MHK die Effektivität gegenüber Bakterien verschiedener Spezies völlig unterschiedlich sein, und die MHK kann stark differieren, je nachdem, ob die Bestimmung im Blutplasma, im Urin oder aber in Bouillon erfolgte. Die Milieubedingungen, wie z. B. Nährstoffangebot oder pH-Wert in-vivo, entsprechen nicht den in-vitro Bedingungen und können zu großen Änderungen in der MHK führen [Amsterdam, 1996]. Trotzdem ist die MHK als pharmakodynamische Größe in den häufig verwendeten pharmakologischen Indices enthalten.

Bei Überschreitung eines Mindestwertes sollen Pharmakologische Indices einen Erfolg in der Antibiotikatherapie vorhersagen. Grundlage hierfür liefern experimentelle Daten aus in-vitro Modellen, Tiermodellen oder klinischen Studien. Es wird dabei die Höhe des jeweiligen Index berechnet, bei der ein Absterben der Bakterien erreicht wurde, oder - im Fall der klinischen Studien - sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Therapieerfolg einstellte.

Die Antibiotikaklassen der Chinolone und der Aminoglykoside zeigen mit zunehmender Dosis eine Steigerung der Wirkung. Bei diesen sogenannten konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotika werden häufig die pharmakologischen Indices C_{\max}/MHK und AUC/MHK verwendet. Dagegen zeigen die Substanzklassen der β -Laktame, Glykopeptide, Makrolide und Oxazolidinone ab einer bestimmten Antibiotikum-Konzentration, die häufig bei dem 2- bis 4-

fachen der MHK des jeweiligen Erregers liegt, keine Steigerung der Absterberate [Ambrose *et al.* 2000]. Der Index $T_{>MHK}$ (=kumulativer Prozentsatz der Zeit über 24 Stunden, in der die Antibiotikumkonzentration über der MHK des Erregers liegt) [Mouton *et al.* 2002] wird häufig für diese zeitabhängig wirkenden Antibiotika verwendet.

Schentag *et al.* [Schentag *et al.* 2001] sind der Meinung, dass der Index AUC/MHK für alle Antibiotikaklassen und für alle Erreger anwendbar ist. Die Dosis des Antibiotikums sollte danach so gewählt werden, dass in der Therapie mindestens ein AUC/MHK-Verhältnis von 125 [h^{-1}] erreicht wird. Jacobs *et al.* [Jacobs, 2001] vertreten die Auffassung, dass bei leichten Infektionen ein AUC/MHK-Verhältnis von 25 [h^{-1}] ausreicht, um einen Therapieerfolg zu garantieren. Hyatt *et al.* sind der Ansicht, dass ein AUC/MHK-Verhältnis von 350 – 500 [h^{-1}] nötig ist, um einen Erfolg in der Therapie zu gewährleisten [Hyatt *et al.* 1994]. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass je nach Autor die PK/PD-Grenzwerte, die einen Therapieerfolg vorhersagen sollen, sehr unterschiedlich sind. Dies gilt auch für die anderen pharmakologischen Indices C_{max}/MHK und $T_{>MHK}$.

Somit herrschen in der Literatur recht widersprüchliche Meinungen über die Höhe des Mindestwertes der pharmakologischen Indices vor, die einen Erfolg in der Antibiotikatherapie garantieren sollen. Zusätzlich wird häufig die Verwendung der MHK als pharmakodynamischer Parameter in den pharmakologischen Indices aufgrund der oben genannten Gründe kritisiert [Nolting *et al.* 1996; Schuck *et al.* 2002; Wiedemann *et al.* 2003].

Eine bessere Aussage über die antibakterielle Wirkung eines Antibiotikums als die MHK liefern Absterbekinetiken eines Erregers, die nach der Einwirkung des Antibiotikums ermittelt werden. Sie ermöglichen, im Gegensatz zur MHK, eine Aussage über die Wirkung des Antibiotikums in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Ermittlung des Absterbeverhaltens von Bakterien kann bei konstanten Antibiotikakonzentrationen in der Batchkultur erfolgen, oder aber bei sich definiert periodisch ändernden Antibiotikakonzentrationen im in-vitro Modell. Pharmakologische in-vitro Modelle ermöglichen die Simulation der humanen Pharmakokinetik bei gleichzeitiger Bestimmung des Absterbeverhaltens der Bakterien [Grasso *et al.* 1978].

Mit Hilfe der ermittelten Absterbekinetiken können pharmakodynamische Parameter berechnet werden, wie z. B. die maximale Keimzahlreduktion R_{max} , die initiale Abtötung nach 2 Stunden R_{2h} und der AAC-Wert (=area above the curve). Der AAC-Wert ist ein relatives Maß für die Zahl der abgestorbenen Bakterien und wird mittels Integration der Fläche über der Absterbekinetik berechnet. Dabei werden Flächen unterhalb der Inokulumlinie positiv bewertet, da sie das Absterben der Bakterien repräsentieren, und Flächen oberhalb dieser Linie werden

negativ bewertet, da sie bakterielles Wachstum über das Ausgangsinokulum hinaus anzeigen (vergl. Abschnitt 2.2.10) [Kratz *et al.* 1992b; Rustige *et al.* 1990]. Diese pharmakodynamischen Parameter können für die Entwicklung von mathematischen Modellen in der Antibiotikatherapie herangezogen werden.

1.2 Mathematische Modelle zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika

Die mathematische Modellierung der Wirkung eines Antibiotikums auf einen Erreger in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums ermöglicht die Vorhersage der Wirkung des Antibiotikums auf den Erreger [Bourne, 1995]. Des Weiteren bietet sie den Vorteil, dass man durch die Kombination mit der humanen Pharmakokinetik Absterbekinetiken der Bakterien bei sich ändernden Konzentrationen berechnen kann. Die Berechnung der Wirkung eines Antibiotikums auf einen Erreger während der Einwirkung des Antibiotikums ermöglicht die Optimierung von Dosierungen und fördert somit den rationalen Einsatz von Antibiotika.

1.2.1 E_{\max} Modelle/ Dosis-Wirkungs-Modelle

Die Korrelation der Dosis bzw. der Konzentration eines Arzneistoffes, z. B. im Serum, mit der Wirkung eines Arzneistoffs, ist bekannt als Dosis- bzw. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung [Mutschler *et al.* 2001; Jaehde *et al.* 1998]. Häufig ist eine hyperbolische Beziehung (d. h. monoton steigende Funktion mit gleichmäßiger Sättigung) zwischen der Konzentration und der Wirkung zu beobachten, die durch das E_{\max} -Modell (1.1) beschrieben werden kann [Derendorf *et al.* 2002]. Das E_{\max} -Modell berechnet den Effekt eines Arzneistoffes in Abhängigkeit von seiner Konzentration. Der Effekt bzw. die Wirkung eines Antibiotikums kann mit Hilfe des R_{\max} , des AAC-Wertes (siehe oben) oder aber als die Veränderung der Keimzahl in Abhängigkeit von der Zeit zusammengefasst werden.

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (1.1)$$

E_{\max} -Modell [Derendorf *et al.* 2002]; E=Effekt, E_{\max} =maximaler Effekt, C=Konzentration des Antibiotikums, EC_{50} =Konzentration des Antibiotikums, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist

In der Gleichung (1.1) bezeichnet E_{\max} die maximal erreichbare Wirkung, und EC_{50} ist die Konzentration, bei der die Hälfte dieser maximalen Wirkung beobachtet wird. Die

Konzentrations-Wirkungs-Kurve wird häufig halblogarithmisch dargestellt (Effekt linear, Konzentration logarithmisch). Bei dieser Darstellung ist der Kurvenverlauf S-förmig.

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^n}{EC_{50}^n + C^n} \quad (1.2)$$

Sigmoidales E_{\max} -Modell [Derendorf *et al.* 2002]; E=Effekt, E_{\max} =maximaler Effekt, C=Konzentration des Antibiotikums, n=Hill-Faktor, EC_{50} =Konzentration des Antibiotikums, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist

Eine Verfeinerung des E_{\max} -Modells ist das **Sigmoidale E_{\max} -Modell** (1.2), bei dem ein Exponent n (Hill Faktor, Slope Faktor) die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve modifiziert [Derendorf *et al.* 2002].

Die Steigung im linearen Teil der logarithmischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist direkt proportional zum Hill-Faktor. Ein hoher Hill-Faktor bedeutet einen Alles-oder-Nichts-Effekt, d. h. die Kurve ist sehr steil. Bei einem niedrigen Hill-Faktor reagiert die Wirkung nur geringfügig auf eine Konzentrationsveränderungen, hier ist die Kurve flach. Ist der Hill-Faktor gleich 1, wird das Sigmoidale E_{\max} -Modell wieder zum E_{\max} -Modell (Gleichung 1.1).

1.2.2 Mathematische Modelle zur Beschreibung der Absterbekinetik

Der Kurvenverlauf einer Absterbekinetik nach der Einwirkung eines Antibiotikums ermöglicht eine bessere Aussage über die Wirksamkeit einer Substanz als einzelne pharmakodynamische Parameter wie die MHK. Absterbekinetiken geben im Gegensatz zu pharmakodynamischen Parametern Auskunft über das Absterbeverhalten eines Erregers in Abhängigkeit von der Zeit. Sie liefern somit eine genaue Aussage über die Wirkung eines Antibiotikums zu einer bestimmten Einwirkungszeit, wie z. B. über die initiale Abtötungsphase oder über ein terminales Wiederanwachsen der Bakterien. Aus diesem Grund werden Absterbekinetiken als Basis für die Entwicklung von mathematischen Modellen herangezogen.

Die folgenden mathematischen Modelle (Abschnitt 1.2.2.1 –1.2.2.4) ermöglichen aber aufgrund von Limitierungen im Modell keine universelle Anwendung und Vorhersage der Wirkung von Antibiotika.

1.2.2.1 Modell „Nolting“

In Untersuchungen von Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] wurde das Absterbeverhalten von *Escherichia coli* (*E. coli*) nach Einwirkung des β -Laktam-Antibiotikums Piperacillin bei

konstanten und fluktuierenden Piperacillinkonzentrationen in der Batchkultur und im in-vitro Modell bestimmt. Anhand der experimentell ermittelten Absterbekurven wurde versucht, das Absterbeverhalten von *E. coli* mittels eines mathematischen Modells zu beschreiben. Dieses (Gleichung (1.3)) ermöglicht die Berechnung der Keimzahlveränderung von *E. coli* in Abhängigkeit von der Zeit bei unterschiedlichen Piperacillinkonzentrationen.

$$\frac{dN}{dt} = \left(k - \frac{k_{\max} \cdot C(t)}{EC_{50} + C(t)} \right) \cdot (1 - e^{-zt}) \cdot N \quad (1.3)$$

Modifiziertes E_{\max} -Modell nach Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996]; N=Bakterienanzahl, t=Zeit, k= bakterielle Wachstumsrate, k_{\max} =maximale Absterberate, C(t)=Konzentration des Antibiotikums, EC_{50} =Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist, z=Geschwindigkeitskonstante für die Wachstumsverzögerung (lag-Zeit) der Bakterien

Das Modell besteht aus drei Termen. Der Term k steht für die bakterielle Wachstumsrate, die nicht als von der Konzentration des Antibiotikums oder von der Bakterienanzahl N abhängig angenommen wird. Der zweite Term ist das E_{\max} -Modell, welches die Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung des Antibiotikums beschreibt, k_{\max} steht für die maximale bakterielle Absterberate und EC_{50} beschreibt die Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist. Der dritte Term $(1-e^{-zt})$ stellt die bakterielle Wachstumsverzögerung dar. Die Autoren zeigen, dass das Modell das Absterbeverhalten von *E. coli* durch das Antibiotikum in Abhängigkeit von der Zeit beschreiben kann. Allerdings erfolgte keine globale Optimierung des mathematischen Modells an die experimentellen Daten. Für jede Konzentration werden unterschiedliche Größen der Parameter in dem Modell berechnet, die zum Teil extrem variieren. Zum Beispiel schwankt der Parameter für die maximale Wachstumsrate k zwischen 0,94 und 2,8, also annähernd um den Faktor 3, obwohl diese in allen Versuchen konstant sein sollte. Des Weiteren ermöglicht das Modell nicht bei allen eingesetzten Konzentrationen die genaue Berechnung der experimentell bestimmten Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Piperacillin.

1.2.2.2 Modell „Yano“

Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998] untersuchten das Absterbeverhalten in der Batchkultur von *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nach Einwirkung der β -Laktam-Antibiotika Meropenem, Imipenem, Cefpirom,

Ceftazidim und einem neuem Carbapenem (S-4661). Die experimentell ermittelten Absterbekinetiken dienten als Grundlage für das folgende mathematische Modell (1.4 – 1.7), das die Berechnung des Absterbeverhaltens der Erreger ermöglicht.

$$X_{total} = X_1 + X_2 \quad (1.4)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = \beta \cdot X_1 \cdot (B_{max} - X_1) - \frac{k_{max} \cdot C(t)}{KC_{50} + C(t)} - k_1 \cdot X_1 + k_2 \cdot X_2 \quad (1.5)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_1 \cdot X_1 - k_2 \cdot X_2 \quad (1.6)$$

$$\frac{dC}{dt} = -k_d \cdot C(t) \quad (1.7)$$

Logistisches Wachstums-Modell nach Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998]; X_{total} =Anzahl der Bakterien in der gesamten Population, t =Zeit, X_1 =Anzahl der Bakterien der Teilpopulation X_1 , X_2 =Anzahl der Bakterien der Teilpopulation X_2 , β =bakterielle Wachstumsrate, B_{max} =maximale Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der Kultur, k_{max} =maximale Absterberate, KC_{50} = Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist, $C(t)$ =Konzentration des Antibiotikums, k_1 und k_2 =Transferraten zwischen den Populationen X_1 und X_2 , k_d =Zerfallsrate des Antibiotikums

Das mathematische Modell von Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998] beruht auf der Annahme, dass die gesamte Population X_{total} (dabei entspricht X_{total} der Gesamtheit der koloniebildenden Einheiten, die im Experiment bestimmt wurden) aus den zwei Teilpopulationen X_1 und X_2 besteht (1.4). Die Population X_1 ist in der Lage zu wachsen und zu sterben (1.5). Der Term $\beta \cdot X_1 \cdot (B_{max} - X_1)$ beschreibt das logistische Wachstum von X_1 . Dieses erfolgt unabhängig von der Konzentration des Antibiotikums und ist durch B_{max} , der maximalen Anzahl von koloniebildenden Einheiten in einer Kultur, limitiert. Wird dieser Term durch B_{max} dividiert, erhält man den Term $\mu_{max} \cdot X_1 \cdot (1 - X_1/B_{max})$, wobei $\mu_{max} = \beta/B_{max}$ ist. Diese Ausdrucksform des logistischen Wachstums bietet den Vorteil, dass μ_{max} unabhängig von B_{max} ist, während β von B_{max} abhängig ist [Yano *et al.* 1998]. Der zweite Term in Gleichung (1.5) beschreibt die antibakterielle Wirkung des Antibiotikums auf die Population X_1 . k_{max} steht für die maximale Absterberate, und KC_{50} beschreibt die Konzentration, die für 50 % der maximalen Wirkung nötig ist. Der dritte Term in (1.5) beschreibt den Austausch zwischen den Populationen X_1 und X_2 , der über die zwei Transferraten k_1 und k_2 erfolgt.

Die Population X_2 in Gleichung (1.6) wächst nicht und stirbt auch nicht. Sie „lebt“ und „stirbt“ nur vom Austausch mit der Population X_1 . Die Population X_2 könnte somit ein Ruhestadium von

X_1 sein. Zusätzlich beinhaltet das Modell die Annahme, dass ein exponentieller Zerfall des Antibiotikums mit der Zerfallsrate k_d während der Einwirkungszeit des Antibiotikums auf die Bakterien erfolgt (1.7). Diese Annahme wurde aber nicht experimentell bestätigt. Aus Herstellerangaben ist zu entnehmen, dass die Antibiotika Meropenem, Cefpirom, Cefprozidim und S-4661 mindestens 24 h bei 20 °C stabil sind [www.medizinimdialog.com. 2003]. Des Weiteren wurden für die Entwicklung des Modells experimentelle Daten herangezogen, die pro Absterbekurve drei oder vier, höchstens fünf Messpunkte über einen Zeitraum von 22 Stunden enthalten. Diese Messpunkte wurden innerhalb der ersten 3 Stunden sowie nach 22 Stunden Einwirkung des Antibiotikums gemessen. Aufgrund der fehlenden Messpunkte zwischen 3 und 22 Stunden ist kein Vergleich zwischen berechneten Kurvenverläufen und experimentellen Daten möglich.

1.2.2.3 Modell „Schuck“

Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] dienten als experimentelle Grundlage des mathematischen Modells von Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002]. Firsov *et al.* untersuchten bei abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell das Absterbeverhalten von *Escherichia coli*.

Basierend auf diesen experimentellen Daten entwickelten Schuck *et al.* das Modell „Adaptive Resistenz“ (1.8 – 1.10), das aus drei Gleichungen besteht. Gleichung (1.8) ermöglicht die Berechnung der Keimzahlveränderung von *E. coli* in Abhängigkeit von der Zeit bei unterschiedlichen Ciprofloxacinkonzentrationen.

$$\frac{dN}{dt} = \left(k - \frac{\left(k_1 \cdot \left(1 - \frac{C_r}{IC_{50} + C_r} \right) + k_2 \right) \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N \cdot (1 - e^{-z \cdot t}) \quad (1.8)$$

$$C_r = C_0 \cdot \left(e^{-k_e \cdot (t - t_{lag})} - e^{-\alpha(t - t_{lag})} \right) \quad (1.9)$$

$$C = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (1.10)$$

Modell Adaptive Resistenz nach Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002]; N=Bakterienanzahl; t=Zeit; EC₅₀=Konzentration, die den halbmaximalen Effekt bewirkt; IC₅₀=Konzentration, die den halbmaximalen Adaptierungseffekt bewirkt; k=Wachstumsrate; k₁=maximale Absterberate für initiales Absterben; k₂=permanente maximale Absterberate; C_r=Antibiotikumkonzentration, die die adaptive Resistenz induziert; C=aktive Antibiotikumkonzentration; z=Anpassungsfaktor für Wachstumsverzögerung (lag-Phase) der Bakterien; C₀=initiale Antibiotikumkonzentration; t_{lag}=initialer Zeitfaktor für Wachstumsverzögerung (lag-Zeit); α=Rate, die die abnehmende adaptive Resistenz beschreibt; k_e=Eliminationskonstante des Antibiotikums

Der Term k in Gleichung (1.8) beschreibt die bakterielle Wachstumsrate, die unabhängig von der Konzentration des Antibiotikums ist. Die Absterberate wird durch den zweiten Term beschrieben. Sie nimmt mit steigenden Antibiotikakonzentrationen zu und sättigt sich bei der maximalen Absterberate, die durch den folgenden Term beschrieben wird:

$$k_{\max} = \left(k_1 \cdot \left(1 - \frac{C_r}{IC_{50} + C_r} \right) + k_2 \right)$$

Die maximale Absterberate ist abhängig von C_r und den Parametern k_1 und k_2 , die für die initiale und die permanente Absterberate stehen. C_r beschreibt die Konzentration, die eine adaptive Resistenz der Bakterien an das Antibiotikum auslöst. Sie ist nicht konstant, sondern kann mittels Gleichung (1.9) berechnet werden. Die Konzentration C_r ist abhängig von der initialen Ciprofloxacinkonzentration im Experiment C_0 , von k_e , der Eliminationsratenkonstanten, die die Elimination des Antibiotikums im Experiment beschreibt, und von der Konstante α , der Rate, welche eine gewisse adaptive Resistenz beschreibt (siehe auch Abschnitt 3.6.7).

IC_{50} in Gleichung (1.8) beschreibt die Konzentration, die für die halbmaximale adaptive Resistenz nötig ist. Der dritte Term $(1-e^{-z \cdot t})$ in Gleichung (1.8) stellt die bakterielle Wachstumsverzögerung dar. Der im Experiment simulierte Konzentrations-Zeit-Verlauf kann mit Hilfe von Gleichung (1.10) berechnet werden. Das Antibiotikum wurde zum Zeitpunkt $t=0$ appliziert und mit einer Kinetik 1. Ordnung eliminiert.

1.2.2.4 Modell „Mouton“

Mouton untersuchte die Wirkung von konstanten Meropenem- und Tobramycinkonzentrationen gegenüber *P. aeruginosa* [Mouton, 2003]. Die experimentell ermittelten Absterbekinetiken dienten als Grundlage für das mathematische Modell „Mouton“ in Gleichung (1.11).

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) - k_{\max} \cdot \frac{C^n}{EC_{50}^n + C^n} \cdot N \quad (1.11)$$

Modifiziertes Sigmoidales E_{\max} -Modell nach Mouton [Mouton, 2003]; N =Bakterienanzahl, μ =maximale spezifische Wachstumsrate, N_{\max} =maximale Bakterienanzahl in der Bakterienkultur (Kapazität), k_{\max} =maximaler Effekt, C =Konzentration des Antibiotikums, n =Hill-Faktor, EC_{50} = Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist

Das Modell „Mouton“ (1.11) beinhaltet nur eine Population, die Gesamtpopulation N . Neben dem Sigmoidalen E_{\max} -Modell für die Absterberate zeigt das Modell noch einen zusätzlichen Term, der das Wachstum der Bakterien darstellt. μ steht für das bakterielle Wachstum, das unabhängig von den Antibiotikakonzentrationen ist. Der Term $(1-N/N_{\max})$ drückt das logistische Wachstum der bakteriellen Kultur aus, d. h. die Bakterienanzahl der Kultur wird durch die maximale Bakterienanzahl N_{\max} in der Kultur limitiert, wie dies auch in dem Modell „Yano“ erfolgt.

Mouton konnte zeigen, dass mit Hilfe des mathematischen Modells das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* bei konstanten Konzentrationen von Tobramycin und von Meropenem darstellbar

ist. Der Hill-Faktor variiert je nach Antibiotikum. Bei Meropenem wurde ein hoher Hill-Faktor von 3,5 [$\Delta\text{KBE}\cdot\text{L}/\text{mg}$] bestimmt, währenddessen bei dem konzentrationsabhängig wirkendem Antibiotikum Tobramycin nur ein Hill-Faktor von 0,71 [$\Delta\text{KBE}\cdot\text{L}/\text{mg}$] bestimmt wurde.

1.3. Bakterien

Die Entwicklung des in dieser Arbeit vorgestellten mathematischen Modells soll zunächst mit Hilfe der Wirkung von Antibiotika auf *E. coli* erfolgen. Anschließend soll überprüft werden, ob das mathematische Modell auf *S. aureus*, einem gram-positiven Infektionserreger, angewendet werden kann.

1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist taxonomisch der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet. Die Enterobacteriaceae sind gram-negative, peritrich begeißelte Stäbchen, die fakultativ anaerob sind, d. h. sie können durch Atmung, aber auch durch Gärung Energie gewinnen [Schlegel, 1992].

Das Grundgerüst der gram-negativen Zellwand von *E. coli* bildet das Heteropolymer Peptidoglykan, welches auch als Murein bezeichnet wird. 75-80 % des Mureins der gram-negativen Zellwand besteht aus nur einer Mureinschicht, die restlichen 20-25 % bestehen aus drei Mureinschichten [Labischinski *et al.* 1991]. Der Mureinschicht ist eine äußere Membran aufgelagert, die über Lipoproteine in dem Peptidoglykan verankert ist. Die äußere Membran gram-negativer Bakterien besteht aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden und integralen Membranproteinen, und stellt für viele Antibiotika eine Permeabilitätsbarriere dar [Nikaido *et al.* 1985].

Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Häufig von *E. coli* verursachte Erkrankungen sind extraintestinale Infektionen, wie die der Harnwege und des Respirationstraktes. Weiterhin ist er ein möglicher Erreger von Wundinfektionen und Septikämien. Darmpathogene *E. coli* verursachen intestinale Infekte [Kayser *et al.* 1998].

1.3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind gram-positive, sich in Haufen und Trauben anordnende Kokken, die sich aerob und anaerob kultivieren lassen. Taxonomisch gehören sie zur Familie der Micrococcaceae. Sie sind kleine kugelig-ovale Zellen, die unbeweglich sind. Die Gattung *Staphylococcus* enthält 30 Spezies und Subspezies. Dabei ist für die Humanmedizin *Staphylococcus aureus* die wichtigste Spezies [Kayser *et al.* 1998].

Das Mureinnetz der gram-positiven Bakterien kann bis zu 40 Schichten dick sein. Im Gegensatz zu den gram-negativen Bakterien fehlt die äußere Membran, und an das Peptidoglykan sind lineare Teichonsäuren, Polysaccharide und zellwandassoziierte Proteine gebunden. In der Zellmembran sind Lipoteichonsäuren verankert, die die gesamte Mureinschicht durchziehen [Brock *et al.* 2002].

Als natürlicher Besiedler von Haut und Schleimhäuten ist *S. aureus* häufiger Verursacher von Wundinfektionen, Furunkeln, Sinusitiden und Otitis media. Infektionen durch *S. aureus* werden durch eine Reihe von extrazellulären Enzymen und Exotoxinen bestimmt, die Lebensmittelintoxikationen und das Toxische-Schock-Syndrom verursachen können [Kayser *et al.* 1998]. Besondere Bedeutung kommt dieser Spezies vor allem durch die methicillin-resistenten *S.-aureus*-Stämme (MRSA), als Verursacher von nosokomialen Infektionen, zu. Da MRSA-Stämme häufig Multiresistenzen aufweisen, stellen sie ein besonderes Problem bei der Therapie der durch sie verursachten Infektionen dar [Simon *et al.* 1997].

1.4 Antibiotika

Die Entwicklung des mathematischen Modells soll zunächst für die Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* erfolgen. Ciprofloxacin ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Chinolone. Des Weiteren soll die Anwendbarkeit des Modells auf die Wirkung von Moxifloxacin (ebenfalls aus der Klasse Chinolone), von Tobramycin, aus der Klasse der Aminoglykoside, und von Ampicillin, aus der Klasse der β -Laktame, auf *E. coli* untersucht werden.

1.4.1 Chinolone

Molekulare Wirkung von Chinolonen

Die Chinolone sind eine Gruppe von hochwirksamen Antibiotika. Diese totalsynthetischen antibakteriellen Arzneimittel nehmen heute sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin eine wichtige Stellung ein [Petersen, 2001]. Die primäre, d. h. empfindlichere, bakterielle Zielstruktur der Chinolone ist bei gram-negativen Bakterien die Gyrase und bei gram-positiven Bakterien meistens die Topoisomerase IV [Belland *et al.* 1994; Ferrero *et al.* 1994; Hoshino *et al.* 1994]. Die Gyrase besteht aus zwei A und zwei B Untereinheiten und wird auch als Topoisomerase II bezeichnet. Sie katalysiert unter Verbrauch von Energie in Form von ATP die Verdrillung (negative Überspiralisierung) der beiden umeinander gewundenen DNA-Stränge. Aufgrund von Platzlimitierung liegt die bakterielle DNA in einer kompakten Form in der Bakterienzelle vor. Ein weiteres Enzym, die Topoisomerase I, ermöglicht dann die

Zugänglichkeit der DNA für Replikations-, Transkriptions- oder Rekombinationsvorgänge [Vosberg, 1985; Watt *et al.* 1994].

Die Topoisomerase IV ist bei gram-positiven Bakterien die primäre und bei gram-negativen Bakterien die sekundäre Zielstruktur der Chinolone [Belland *et al.* 1994; Ferrero *et al.* 1994; Hoshino *et al.* 1994]. Die Topoisomerase IV hat sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der räumlichen Struktur große Ähnlichkeit mit der Gyrase. Topoisomerasen IV haben die Aufgabe, replizierte Tochterchromosomen zu trennen (Decatenierung). Bei der Replikation hängen die Tochterchromosomen wie Kettenglieder ineinander. Die Topoisomerase IV führt einen temporären Doppelstrangbruch ein, um die DNA-Moleküle voneinander zu trennen [Khodursky *et al.* 1995].

In-vitro Untersuchungen zeigen, dass Chinolone auch an reine DNA binden. Diese Bindung ist aber schwach und unspezifisch und benötigt Mg^{2+} -Ionen zur Stabilisierung [Gormley *et al.* 1996; Tornaletti *et al.* 1988]. Die Chinolon-Moleküle binden nicht an die isolierte Gyrase allein, sondern nur an den Gyrase-DNA-Komplex. Die Gyrase-DNA-Komplex-Bindung ist im Gegensatz zur Bindung an reine DNA spezifisch, wird aber auch durch Mg^{2+} -Ionen stabilisiert [Fan *et al.* 1995].

Chinolone fixieren den Gyrase-DNA-Komplex, nachdem das Enzym kovalent mit der DNA verbunden ist. An dieser Stelle werden Polymerasen, Enzyme, die für die DNA-Transkription und -Replikation zuständig sind, gestoppt. Dies löst in der Zelle Stressreaktionen wie die SOS-Antwort aus. Daraufhin wird die Zellteilung unterbrochen und die SOS-Reparatur eingeleitet. Chinolone bewirken eine dauerhafte Induktion der SOS-Antwort, da die Schädigung der DNA durch die SOS-Reparatur nicht behoben werden kann [Mizushima *et al.* 1997]. Die dauerhafte Induktion der SOS-Antwort führt schließlich zur Filamentierung der Membran und zur Lyse der Zelle [Diver *et al.* 1986]. Diese Reaktionskaskade wurde von Lewis als eine Art „Selbstmordprogramm“ der Zelle bezeichnet, und endet in einem „programmierten“ Zelltod [Lewis, 2000].

Ciprofloxacin und Moxifloxacin

Ciprofloxacin und Moxifloxacin sind Antibiotika aus der Gruppe der Chinolone, die ein breites Wirkungsspektrum besitzen und deshalb vor allem auch bei schweren Infektionen eingesetzt werden. Sie wirken bakterizid und besitzen eine konzentrationsabhängige Wirkung, d. h. bei Steigerung der Dosis ist auch eine Steigerung der Wirkung zu beobachten.

Indikationsgebiete von Ciprofloxacin sind vor allem Infektionen der Harnwege und des Mittelohrs. Zum Teil wird Ciprofloxacin auch bei Infektionen der Nasennebenhöhlen, der

Augen, der Nieren und der Atemwege eingesetzt. Moxifloxacin wird zur Behandlung der akuten Exazerbation der chronischen Bronchitis, bei ambulant erworbenen Pneumonien und bei bakteriellen Sinusitiden appliziert.

1.4.2 Aminoglykoside

Molekulare Wirkung der Aminoglykoside

Aminoglykoside binden nach der Anreicherung in der Bakterienzelle irreversibel an die 30S-Untereinheit der Ribosomen. Einerseits hat diese Bindung eine Blockade der Initiationsphase der Proteinsynthese zur Folge. Andererseits wird durch die Bindung an die 30S-Untereinheit von bereits elongierender Ribosomen die Proteinsynthese verlangsamt und es kommt zum „misreading“, d. h. Falschablesung von mRNA-Codons während der Translation. Fehlerhafte Proteine, sogenannte „Nonsense“-Proteine, werden gebildet. Geringe Aminoglykosidkonzentrationen wirken überwiegend auf elongierende Ribosomen und verursachen Ablesefehler während der Translation. Hohe Konzentrationen wirken auf alle Ribosomen, so dass es zusätzlich zur Blockade der Proteinsynthese kommt [Davis, 1988].

Die falschtranslatierten Membranproteine setzen sich in der Zellmembran fest und bilden dort unspezifische Membrankanäle, die eine Veränderung in der Membranpermeabilität bewirken. Irreversible Membranschädigungen und die komplette Hemmung der Proteinsynthese führen schließlich zum Zelltod [Mutschler *et al.* 2001].

Tobramycin

Tobramycin wird aus Kulturfiltraten von *Streptomyces tenebrarius* isoliert und zeigt wie alle Aminoglykoside eine konzentrationsabhängige Wirkung. Das antibakterielle Wirkspektrum ist breit und hat einen Schwerpunkt im gram-negativen Bereich. Besonders gut wirksam ist Tobramycin gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Aus diesem Grund wird Tobramycin häufig zur Langzeitbehandlung von chronischen Infektionen der Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit Mukoviszidose eingesetzt.

1.4.3 β -Laktame

Molekulare Wirkung der β -Laktame

β -Laktam-Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese in wachsenden Bakterienzellen, indem sie an sogenannte Penicillin-Binde-Proteine (PBPs) binden. Die PBPs sind Enzyme (Trans-, DD-Carboxy- und DD-Endopeptidasen), die an den terminalen Schritten der Peptidoglykansynthese

beteiligt sind und außen an der Cytoplasmamembran haften. Sie verknüpfen Peptidseitenketten des Peptidoglykans und beeinflussen dadurch den Grad der Quervernetzung. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der β -Laktame zu den Zellwandbausteinen binden sie kovalent an das aktive Zentrum der PBPs und blockieren diese reversibel. Durch die Hemmung kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellwandsynthese und -abbau. Dies führt zur Bakteriolyse [Höltje *et al.* 2001].

Verschiedene β -Laktame können morphologische Veränderungen in Bakterien auslösen. Geringe Konzentrationen können ein abnormales Wachstum wie Filamentbildung von *E. coli* induzieren, während höhere Konzentrationen einen Wachstumsstillstand verursachen, dem eine baldige Lyse folgt [Giesbrecht *et al.* 1998].

Ampicillin

Ampicillin, ein β -Laktam-Antibiotikum, wird als Breitspektrum-Penicillin bezeichnet. Durch die synthetische Änderung des Benzylpenicillins zum Ampicillin sind ein erweitertes Wirkungsspektrum und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften entstanden. Ampicillin zeigt eine zeitabhängige Wirkung, d. h. ab einer bestimmten Antibiotikakonzentration ist keine Steigerung der Absterberate zu beobachten. Indikationengebiete von Ampicillin sind vor allem Infektionen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs, der Atemwege und des Magen-Darm-Trakts.

1.5 Persistenz von Bakterien

Während der Einwirkung von Antibiotika auf einen Erreger wurden immer wieder ungewöhnliche Phänomene beobachtet.

Die Beobachtung, dass ein geringer Anteil der Zellen des Inokulums (normalerweise weniger als 0,1 %) durch das Antibiotikum nicht abgetötet wird, obwohl die Konzentration des Antibiotikums eine letale Wirkung haben sollte, ist als „Persistenz“-Phänomen bekannt. Dieses Phänomen wurde vor allem bei β -Laktamen beobachtet. Werden die persistierenden Zellen subkultiviert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum getestet, erscheinen die Zellen genauso sensibel wie das Originalisolat [Amsterdam, 1996].

Schon 1944 beobachteten Bigger *et al.* [Bigger, 1944], dass ein geringer Anteil (eine Wahrscheinlichkeit von 10^{-6}) der Staphylokokken nach Einwirkung von Penicillin überlebt. Diese sogenannten Persister zeigen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Penicillin keinen Unterschied zu nicht-persistierenden Zellen. Somit wurde ausgeschlossen, dass es sich

hierbei um die Selektion resistenter Mutanten handelt. Die molekulare Ursache der Persistenz ist noch ungeklärt.

Eine mögliche Erklärung ist, dass diese sogenannten Persister metabolisch inaktive Zellen sind. Während der Einwirkung des Antibiotikums wachsen die persistierenden Zellen nicht und sterben deshalb auch nicht durch β -Laktam-Antibiotika [Amsterdam, 1996]. Die Existenz von persistierenden Bakterien wurde auch nach Einwirkung von Chinolonen beobachtet [Wolfson *et al.* 1989].

Untersuchungen von Kratz zeigen eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Wachstumsrate von *E. coli* und der bakteriziden Wirkung von Ciprofloxacin [Kratz, 1992a]. Die Existenz von Persistern nach Einwirkung von Chinolonen könnte sich auch durch ruhende Zellen erklären lassen. Ruhende Zellen führen keine Replikation durch, so dass die Gyrase nur in sehr geringen Ausmaß an die DNA bindet und somit nur sehr begrenzt eine Zielstruktur für die Chinolone vorhanden ist.

Möglich wäre auch, dass den persistierenden Bakterien Regulatormoleküle fehlen, welche für die Induktion des Zelltods notwendig sind. Die Sequenz von Prozessen, die zum Zelltod führt, ist an der Stelle blockiert, für die keine einzige Kopie des für diesen Schritt regulierenden Moleküls in der Zelle vorliegt. Da Regulatormoleküle oft nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen [Moyed *et al.* 1983], kann es bei der Zellteilung mit einer geringen Wahrscheinlichkeit zu einer kopienlosen Tochterzelle kommen (bei Poisson-Verteilung mit Mittelwert von 10 Kopien pro Tochterzelle ist $p=5 \times 10^{-5}$). Sie können aus diesem Grund den Zelltod nicht einleiten oder durchführen, obwohl sie genetisch keine Veränderung zu nicht-persistierenden Zellen aufweisen [Lewis, 2000]. Bei einer ausreichend großen Population würde es dann immer Zellen geben, die aufgrund von fehlenden Regulatormolekülen zu Persistern werden. Allerdings müsste die Anzahl der Persister dann unabhängig vom Antibiotikum und von der Konzentration des Antibiotikums sein.

Die Existenz eines programmierten Zelltods bei Bakterien ist umstritten, da ein Nutzen für einzellige Organismen zunächst nicht ersichtlich scheint. Bei vielzelligen Organismen dient der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, zur Eradikation von Zellen, die geplant im Zuge der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus oder ungeplant im Falle einer aufgetretenen Schädigung einer Zelle, auf jeden Fall im Interesse des gesamten Organismus eliminiert werden müssen. Sowohl äußere als auch intrazelluläre Faktoren können den programmierten Zelltod induzieren, und er dient der Entwicklung und dem Überleben des Makroorganismus [Metzstein *et al.* 1998].

Einzelne Bakterienzellen leben und sterben aber häufig in räumlich strukturierten Populationen (z. B. in Biofilmen) zusammen mit „Geschwisterzellen“ in Form von Mikrokolonien [Costerton *et al.* 1999]. Bei Berücksichtigung dieser räumlichen Struktur von Populationen könnte ebenso der Nutzen eines programmierten Zelltods ersichtlich werden. Geschädigte oder infizierte Zellen würden sich „opfern“ im Interesse der Erhaltung eines fehlerfreien Erbguts oder der Eindämmung einer Infektion der Nachbarzelle, die mit hoher Wahrscheinlichkeit „Geschwisterzellen“ sind. Durch einen programmierten Zelltod könnte zum Beispiel die Verbreitung einer viralen Infektion unterbunden werden, indem die infizierten Zellen den programmierten Zelltod einleiten und somit die nicht-infizierten Zellen schützen [Lewis, 2000]. Allerdings müssten die infizierten Zellen den programmierten Zelltod frühzeitig, bevor die Viren infektionstüchtig sind, bewirken.

Bei sporenbildenden Bakterien erlaubt ein programmierter Zelltod der Mutterzelle die Freisetzung der Spore, die von der Mutterzelle umgeben ist. Die Autolyse der Mutterzelle erfolgt mittels der Autolysine. Diese sind von der Zelle selbst gebildete Enzyme, die durch die Hydrolyse der Bakterienzellwand die Zellyse und somit den Zelltod bewirken.

Wahrscheinlich ist der am häufigsten beobachtete Prozess des programmierten Zelltods bei Bakterien die Autolyse der Zellen nach Antibiotikaexposition [Lewis, 2000]. Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Antibiotika die Autolysinproduktion von *Streptococcus pneumoniae*, einem gram-positiven Bakterium, induzieren können, wodurch die Zelle einen programmierten Zelltod auslöst [Novak *et al.* 1999]. Antibiotika, welche die Proteinsynthese inhibieren, können die Produktion von Autolysinen verhindern. Aufgrund der fehlenden Autolysine könnte es dann nicht zum programmierten Zelltod kommen. Da auch gram-negative Bakterien wie *E. coli* Autolysine produzieren, könnten Antibiotika wie die Chinolone den programmierten Zelltod bei gram-negativen Bakterien auslösen, indem diese Antibiotika durch die SOS-Antwort die Autolyse der Zelle einleiten [Vincent *et al.* 1991].

Eine weitere Alternative bzgl. der Existenz von persistierenden Bakterien könnte sein, dass die Persistier Zellbestandteile der abgestorbenen Zellen (Alarmone) wahrnehmen, die zur Inhibierung oder zum Abbrechen eines programmierten Zelltods führen. Dadurch wäre ein Mechanismus gegeben, der einen Teil der Population vor dem Zelltod schützt, ohne dass die überlebenden Zellen Mutanten wären, die einen programmierten Zelltod nicht einleiten können [Lengeler *et al.* 1999; Rowbury, 2001].

Untersuchungen von Nikolaev *et al.* [Nikolaev, 1996] zeigen, dass das Wachstum von *E. coli* in Gegenwart von Tetracyklinen zur Bildung von unidentifizierten Komponenten im Medium führt, die einen Teil der Population vor der Wachstumsinhibition durch das Antibiotikum schützen.

Hauptunterschied dieser Hypothese zur Entstehung von Persistenz zu den vorangegangenen ist, dass die Nachkommen der persistierenden Bakterien, die durch Alarmone vor dem Zelltod bewahrt würden, ebenfalls keinen programmierten Zelltod einleiten könnten, falls sie weiterhin in Gegenwart dieser Alarmone wachsen. In diesem Falle wäre ein Wachstum in Anwesenheit des Antibiotikums möglich.

Dagegen wären die Nachkommen der Persister, die aufgrund einer geringen Wahrscheinlichkeit keine zelltod-induzierenden Regulatormoleküle besitzen, selbst keine Persister. Die Nachkommen würden wieder zelltod-induzierende Regulatormoleküle produzieren, und könnten deshalb nicht in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen.

Das Auftreten einer geringen Zahl von persistierenden Bakterien während einer Infektion ist bei Patienten mit intaktem Immunsystem eher ein untergeordnetes Problem. Die Persister werden, solange sie für Makrophagen, die Fress-Zellen des Immunsystems, frei zugänglich sind, von diesen eliminiert werden. Problematisch ist die Zunahme immunsupprimierter Patienten (zum Beispiel durch AIDS oder medikamentöse Behandlung), da hier die persistierenden Bakterien zu chronischen Infektionen mit letalen Folgen führen könnten. Die Existenz von Persistern erschwert die Antibiotikatherapie und macht die Vorhersage über einen Therapieerfolg eines Antibiotikums schwierig.

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll ein mathematisches Modell entwickelt werden, das auf experimentell ermittelten Daten basiert und die antibakterielle Wirkung von Antibiotika auf eine Population von Bakterien vorhersagt.

Zunächst soll die Wirkung von unterschiedlichen konstanten Konzentrationen der konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotika Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tobramycin, sowie von dem zeitabhängig wirkenden Antibiotikum Ampicillin auf *Escherichia coli* untersucht werden.

Die Absterbekurven von *Escherichia coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin sollen zur Überprüfung, ob bestehende mathematischen Modelle das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur vorhersagen können, herangezogen werden. Die Überprüfung der bestehenden mathematischen Modelle soll zusätzlich Erkenntnisse liefern, welche mathematischen Terme für die Entwicklung des mathematischen Modells nötig sind. Zur Entwicklung des mathematischen Modells sollen auch die Absterbekurven von *Escherichia coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin herangezogen werden. Dabei soll das Modell die experimentell ermittelten Daten befriedigend beschreiben.

Abschließend soll überprüft werden, ob das mathematische Modell auch die Wirkung der anderen Antibiotika beschreiben kann. Die Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen auf *Staphylococcus aureus* soll zeigen, ob das mathematische Modell auch auf andere Bakterienspezies anwendbar ist.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob das Modell das Absterbeverhalten der Bakterien bei abnehmenden Konzentrationen im in-vitro Modell korrekt vorhersagen kann.

Die Entwicklung eines mathematischen Modells liefert ein verbessertes Verständnis über beteiligte Mechanismen und ermöglicht die Vorhersage der antibakteriellen Wirkung eines Antibiotikums auf eine Bakterienpopulation. Die Vorhersage der Wirkung von Antibiotika ist von großer Bedeutung für die Optimierung von Dosierungen in der Antibiotikatherapie, da durch einen rationalen Einsatz von Antibiotika der zunehmenden Resistenzentwicklung entgegen gewirkt werden kann.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Stammsammlung der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn enthalten.

Es handelt sich hierbei um die klinischen Isolate *Escherichia coli* W3110 und *Staphylococcus aureus* III-03-35.

Für die Konzentrationsbestimmung von Ciprofloxacin im in-vitro Modell wurde der Stamm *Klebsiella pneumoniae* IV-02-03 verwendet.

Die Stämme werden nach der Entnahme aus der Dauerkultur (vergl. 2.2.2) auf Chinablau-Laktose-Agar angezogen und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.1.2 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika wurden freundlicherweise von den Herstellern (siehe Tabelle 2.1) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotika-Klasse	Antibiotikum	Hersteller
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
	Moxifloxacin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Penicilline	Ampicillin	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Aminoglykoside	Tobramycin	Eli Lilly, Bad Homburg, Deutschland

Die Antibiotika wurden für die Versuche in sterilem, destilliertem Wasser gelöst.

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

Sämtliche Nährmedien werden nach der Einwaage (nach Herstellerangaben) in Aqua dem. gelöst und 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 2.2 Nährmedien und Chemikalien

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschrift
Chinablau-Laktose-Agar	Oxoid, Basingstoke, England
Müller-Hinton-Bouillon	Difco, Detroit, MI, USA
Antibiotika-Agar Nr.1	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 2.3 Verwendete Geräte und andere Materialien

Geräte bzw. Materialien	Hersteller
Einmalfilterhalter	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Membranfilter, Porengröße 0,45µm	Satorius, Göttingen, Deutschland
Glasfiber Mikrofilter 47 mm	Whatman International, Maidstone, England
Peristaltikpumpe IPN	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Kolbenhubpipetten, Gilson variabel	Abimed, Göttingen, Deutschland
Kolbenhubpipetten, feststehend	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektralphotometer Hitachi 150 – 200	Hitachi, Tokio, Japan
Bellco Spinner Flasks 1967, 25ml mit Glasgewinde GL45	Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland Glasbläserei Eich, Bonn, Deutschland
Teflonfiltrationsuntereinheit mit Saugolive	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Lochsieb, teflonisiert, GV 050/1/03	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Teflonschlauch Ø 0,5 mm	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Pumpschlauch, Innen-Ø 2,29 mm Tygon R3607 Farbkodierung purple/black	VWR International, Langenfeld, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Übernachtskultur

Zur Herstellung der Übernachtskultur werden ein bis drei Kolonien des verwendeten Bakterienstamms von einer Nähragarplatte abgenommen, in 4,5 mL Müller-Hinton-Bouillon resuspendiert und für 12 bis 16 Stunden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Dauerkultur

Der Bakterienstamm wird auf einer Nähragarplatte angeimpft und 12 bis 16 Stunden inkubiert. Zur Herstellung der Dauerkulturen werden N1-Nährmedium mit 85 % Glycerin 1:2 gemischt. 1 mL des Glycerin-Nährmedium-Gemischs wird in sterile Dauerkulturröhrchen mit Glasperlen pipettiert. 5 –10 Kolonien des Bakterienstamms werden von der Nähragarplatte genommen und in das Glycerin-Nährmedium-Gemischs gegeben. Nach guter Durchmischung wird das Glycerin-Nährmedium-Gemisch abpipettiert, und die Dauerkulturröhrchen mit den Glasperlen werden anschließend bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.2.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt die geringste gemessene Antibiotikakonzentration an, welche das sichtbare Wachstum von Bakterien in einem flüssigen oder festen Medium hemmt, und ist somit ein Maß für die Empfindlichkeit eines Bakterienstammes gegenüber einem Antibiotikum.

Die MHK-Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Mikrodilution nach DIN 58940. Die Antibiotika werden in sterilem, demineralisiertem Wasser gelöst und in geometrischer Reihe verdünnt. Anschließend werden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit je $50\text{ }\mu\text{L}$ der zu untersuchenden Bakteriensuspension (ca. 5×10^5 KBE/ml) beimpft.

Zur Herstellung des Inokulums werden die zu testenden Bakterienstämme auf Chinablau-Laktose-Agar angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Mit vereinzelt Kolonien der Übernachtskultur (ÜN) wird ein McFarland-Standard von 0,5 ($\text{OD}_{560} = 0,120\text{ nm}$; $\pm 0,02$) in 0,9% NaCl-Lösung eingestellt, und $10\text{ }\mu\text{L}$ der eingestellten Bakteriensuspension werden in 10 mL Müller-Hinton Bouillion überführt.

Die Platten wurden 18 – 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet und das Wachstum anschließend visuell bestimmt.

Zur Überprüfung der Resistenzentwicklung wird bei allen in der Batchkultur und im in-vitro Modell durchgeführten Versuchen vorher und nachher die MHK des Testkeims bestimmt. Dabei wird die ÜN für die MHK Bestimmung mit den Bakterien angeimpft, die zum Zeitpunkt $t=0\text{ h}$ und $t=24\text{ h}$ aus dem Absterbeversuch entnommen wurden.

2.2.4 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt über die Erfassung der Lebendkeimzahl. Die zu untersuchenden Proben werden entsprechend der erwarteten Zellzahl über mehrere Zehnerpotenzen 1:10 mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Anschließend werden $50\text{ }\mu\text{L}$

jeder Verdünnung auf Chinablau-Laktose-Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation über 24 bis 48 Stunden bei 37 °C werden die gebildeten Kolonien gezählt und als KBE/mL angegeben. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei ca. 200 KBE/mL.

Liegt die erwartete Keimzahl unter 200 KBE/mL, so werden 500 bis 1000 µL der unverdünnten oder 0,5 bis 2 mL der verdünnten Probe durch einen Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Der Filter wird mit 50 mL 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und auf Chinablau-Laktose-Agar inkubiert. Damit kann die Nachweisgrenze auf 1 - 2 KBE/mL gesenkt werden.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Antibiotika

Die Überprüfung der eingesetzten Ciprofloxacinkonzentrationen in den Versuchen erfolgt mit Hilfe des Agardiffusionstests. Die Proben, deren Ciprofloxacingehalt bestimmt werden soll, werden bis zur Bestimmung bei -20 °C gelagert.

Sterile Glasplatten mit einer Grundfläche von 14 x 24 cm werden mit 74 mL heißem, flüssigem Agar befüllt. Nach dem Erstarren werden die Platten mit einer Suspension des Indikatorstamms *K. pneumoniae* IV-2-3 gleichmäßig überschichtet, der Überstand verworfen. Zur Herstellung der Suspension werden vereinzelte Kolonien der Übernachtskultur (ÜN) resuspendiert und zu einem McFarland-Standard von 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \text{ nm} ; \pm 0,02$) in 0,9 % NaCl-Lösung eingestellt.

Nachdem der Agar erstarrt ist, und die Bakteriensuspension eingezogen ist, werden in jede Platte 32 Löcher mit einem Durchmesser von 6 mm gestanzt, und der überschüssige Agar wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden werden zunächst je 30 µL von bekannten Ciprofloxacinkonzentrationen (0,6/ 0,3/ 0,15/ 0,0725 mg/L) nach einem randomisierten Schema in diese Löcher pipettiert. Die restlichen Löcher werden mit den zu untersuchenden Proben befüllt, die nach der erwarteten Konzentration vor dem Auftragen verdünnt werden. Sowohl die Standardkonzentrationen als auch die Proben werden pro Konzentration bzw. pro Probe dreimal auf jede Platte aufgetragen. Die befüllten Platten werden abgedeckt und 18 bis 24 h bei 37 °C inkubiert.

Durch Diffusion des Antibiotikums in den umliegenden Agar bilden sich während der Inkubationszeit im geschlossenen Bakterienrasen Hemmhöfe um die Löcher. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Antibiotikumkonzentration und den Hemmhofdurchmessern.

Durch Auftragen der Logarithmen der Standardkonzentrationen gegen die entsprechenden gemittelten Durchmesser erhält man eine Kalibriergerade, über die die Konzentrationen der getesteten Proben abgelesen werden können. Für die Proben werden maximal 10 %

durchschnittliche Abweichung vom Sollwert toleriert. Bei Überschreitung dieser Grenzen wird der Versuch wiederholt.

2.2.6 Batchkultur

In der Batchkultur wird das Absterbeverhalten des Testbakteriums bei konstanten Antibiotikumkonzentrationen untersucht, die bei *E. coli* von der 0,5-fachen bis zur 32-fachen MHK (Ausnahme Ciprofloxacin: von der 0,25-fachen bis zur 32-fachen MHK) und bei *S. aureus* von der 0,5-fachen bis zur 32-fachen der MHK verdoppelt wurden.

750 μL einer Übernachtskultur von *E. coli* bzw. 1 mL einer Übernachtskultur von *S. aureus* werden in 100 mL Müller-Hinton-Bouillon gegeben und eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln vorinkubiert, so dass nach einer Stunde ein Ausgangsinokulum von 5×10^6 bis 1×10^7 KBE/mL entsteht. Zu diesem Zeitpunkt ($t=0$) wird die erste Probe gezogen und das Antibiotikum in der gewünschten Konzentration dazugegeben. Weitere Proben für die Keimzahlbestimmung werden zu den Zeitpunkten $t=0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6$ und 24 h gezogen. Die Wasserbadtemperatur von 37 °C wurde über den gesamten Versuchszeitraum aufrecht erhalten.

2.2.7 In-vitro Modell

2.2.7.1 Aufbau des in-vitro Modells nach Löwdin

Das in-vitro Modell nach Löwdin *et al.* [Löwdin *et al.* 1996] besteht aus einem Reservoirgefäß und dem Zentralkompartiment (siehe Abbildung 2.1). In dem Zentralkompartiment sind die Bakterien enthalten und hier werden die Konzentrations-Zeit-Verläufe simuliert. Das Reservoirgefäß enthält frisches Nährmedium ohne Antibiotikum, welches über ein Schlauchsystem in das Zentralkompartiment gepumpt wird. Das Zentralkompartiment besteht aus einem Glasaufsatz mit zwei Armen und einem Kunststofffuß. Ein Arm dient dem Zufluß von frischem Nährmedium aus dem Reservoirgefäß, der andere Seitenarm dient der Zufuhr von Antibiotika und zur Entnahme der Proben mit Hilfe einer Spritze. Zwischen dem Glasaufsatz und dem Kunststofffuß wird ein Glasfaser Mikrofilter und ein Nitrat-Cellulosefilter (Porengröße 0,45 μm) eingespannt. Der Nitrat-Cellulosefilter verhindert das Auswaschen der Bakterien, und der Glasfaser Mikrofilter dient als Vorfilter und verhindert das Verstopfen des Nitrat-Cellulosefilters. Die gesamte Apparatur wird im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch Injektion des Antibiotikums in das Zentralkompartiment wird die maximale Konzentration zum Zeitpunkt $t=0$ h erreicht. Durch den kontinuierlichen Zufluss von frischem Nährmedium und dem

gleichzeitigem Abfluss des Antibiotikums aus dem Zentralkompartiment wird das Antibiotikum nach einer Kinetik 1. Ordnung eliminiert.

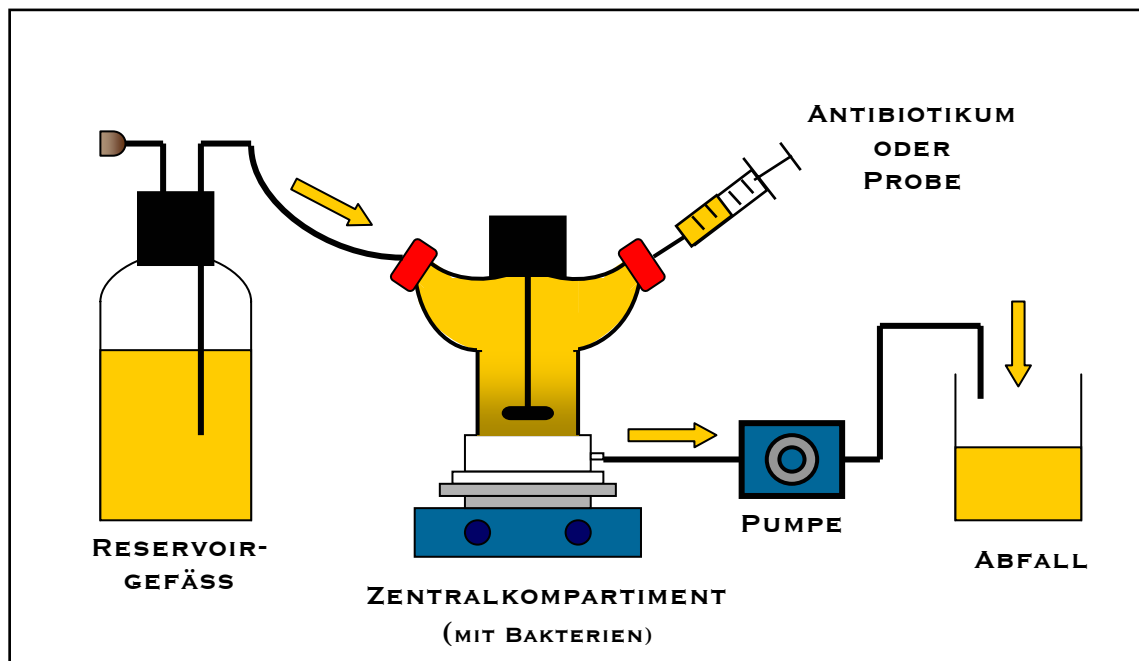


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des in-vitro Modells nach Löwdin *et al.* [Löwdin *et al.* 1996]

2.2.7.2 Versuchsdurchführung im in-vitro Modell nach Löwdin

Vor Beginn des Experiments werden alle Nährmedien, Schläuche, das Reservoirgefäß sowie das Zentralkompartiment (Glasaufsatz und Kunststofffuß) sterilisiert durch Autoklavieren. Unter aseptischen Bedingungen wird der sterile Membran- und Glasfaser Mikrofilter unmittelbar vor Versuchsbeginn zwischen dem Glasaufsatz und dem Kunststofffuß eingespannt. Anschließend wird das Zentralkompartiment mit 120 mL Müller-Hinton-Bouillon gefüllt und mit 200 μL der Übernachtskultur des zu untersuchenden Erregers beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter Rühren wird so ein Inokulum von $5,5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ KBE/mL zum Zeitpunkt $t = 0$ h erhalten. Anschließend wird mit einer Spritze das Antibiotikum per Injektion in das Zentralkompartiment injiziert. Durch Zufluss von Nährmedium aus dem Reservoirgefäß wird das Antibiotikum ausgewaschen. Proben werden nach $t=0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12$ und 24 h genommen, und die Lebendkeimzahl sowie die Antibiotikumkonzentration werden bestimmt. Die MHK wird für alle im in-vitro Modell getesteten Bakterienstämme bei $t=0$ und 24 h bestimmt.

2.2.7.3 Simulation der Pharmakokinetik nach Einmaldosierung ohne Resorption im Ein-Kompartiment-Modell

Der simulierte Konzentrations-Zeit-Verlauf im in-vitro Modell entspricht der Azneistoffkonzentration im Plasma nach intravenöser Bolusinjektion (Gleichung 2.1) [Derendorf *et al.* 2002]. Eine Bolusinjektion ist eine rasche Injektion der gesamten Dosis.

$$C = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (2.1)$$

C =Antibiotikumkonzentration; t =Zeit; C_0 =Konzentration des Antibiotikums zum Zeitpunkt $t=0$; k_e =Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

Das Antibiotikum wird mit einer Kinetik erster Ordnung (Gleichung 2.1) und der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante $k_e = 0,17 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ (entspricht der Halbwertszeit von $t_{1/2} = 4 \text{ h}$) [Firsov *et al.* 1998] eliminiert. Dabei werden bei *E. coli* Initialkonzentrationen von 0,625 mg/L bis 4 mg/L (2, 4, 8, ..., 128-x MHK, die sich jeweils verdoppeln) und bei *S. aureus* von 0,25 bis 8 mg/L (1, 2, 4, ..., 32-x MHK, die sich jeweils verdoppeln) gewählt. Die Simulation der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_e wird im in-vitro Modell mit Hilfe der Flussrate (FR) über die peristaltische Pumpe gesteuert. Die resultierende Flussrate ist von k_e und von V , dem Volumen des Zentralkompartiments, abhängig und ergibt sich wie folgt:

$$k_e \text{ [min}^{-1}\text{]} = FR \text{ [mL/min]} / V \text{ [mL]} \quad (2.2)$$

FR=Flussrate; k_e =Eliminationsgeschwindigkeitskonstante; V =Volumen des Zentralkompartiments

Die Einstellung der Peristaltikpumpe ergibt sich für alle Flussraten aus der Kalibrierung (2.3).

$$\text{Einstellung der Flussrate}^1 = 19,26 \cdot FR - 0,53 \quad (2.3)$$

FR=Flussrate; ¹für den Pumpschlauch Tygon R3607, Farbkodierung purple/black (vergl. Tab. 2.3)

2.2.8 Ermittlung der Anzahl persistierender Bakterien

Durch Variation der Höhe des Ausgangsinokulums wird untersucht, wie hoch die Anzahl der persistierenden Bakterien in der Batchkultur ist.

Die Übernachtskultur (ÜN) wird mit Müller-Hinton-Bouillon zunächst 1:2 verdünnt. Von der Verdünnung werden dann 100 µL, 200 µL, 300 µL usw. bis 1000 µL mit Müller-Hinton Bouillon auf 5 mL aufgefüllt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad wird in den Ansätzen ein Ausgangsinokulum von 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 usw. bis 1×10^8 KBE/mL erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wird zunächst eine Probe für die Keimzahlbestimmung entnommen, dann wird Ciprofloxacin zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 mg/L (32-x MHK) im Ansatz vorherrscht. Die Ansätze werden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 4 Stunden erfolgt die Keimzahlbestimmung der 10 Ansätze. Alle 10 Ansätze werden dreifach bestimmt. Für die Versuchsauswertung wird der Prozentsatz der überlebenden Bakterien vom Ausgangsinokulum berechnet und gegenüber dem Ausgangsinokulum aufgetragen (Mittelwerte von jeweils 3 Bestimmungen).

2.2.9 Nachweis von Alarmonen im Kulturmedium

In der Batchkultur wird untersucht, ob in dem Kulturüberstand einer antibiotikumbehandelten Bakterienkultur Alarmone nachweisbar sind. Durch die Einwirkung von 0,5x-MHK Ciprofloxacin auf eine Übernachtskultur von *E. coli* setzen die lysierten Zellen möglicherweise einen Botenstoff (Alarmon) in das Kulturmedium frei, der einen Einfluss auf die noch lebenden Zellen hat.

Um dies zu überprüfen wird eine Kultur von *E. coli* angeimpft und bis zu einer Keimzahl von 1×10^7 KBE/mL herangezogen. Dann erfolgt die Zugabe von 0,0156 mg/L Ciprofloxacin (Endkonzentration: 0,5x-MHK) und im Anschluss eine 14-stündige Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Neben dieser antibiotikumbehandelten Übernachtskultur (=ÜN+CIP) werden zwei weitere Übernachtskulturen ohne Antibiotikum (=ÜN-CIP, angesetzt wie in Abschnitt 2.2.1) angeimpft und ebenfalls 14 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wird ÜN+CIP und ÜN-CIP 15 Minuten bei 4000 g und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand der Kulturen wird mit 21 g/L Müller-Hinton Bouillon versetzt und sterilfiltriert. Bis zur Verwendung werden die Überstände bei 4 °C gelagert.

Die zweite ÜN-CIP wird 1:20 in Müller-Hinton-Bouillon verdünnt, und 5 x 10 mL werden 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird eine Probe für die Keimzahlbestimmung gezogen, danach erfolgt die Zugabe von Ciprofloxacin, von Müller-

Hinton-Bouillon und von den auf 4 °C gekühlten Übernachtkulturüberständen. Dabei werden die einzelnen Ansätze nach dem folgenden Schema erstellt:

- Ansatz 1: K (Kontrolle) = 10 mL vorinkubierte Bakterienkultur + 10 mL Müller-Hinton-Bouillon
- Ansatz 2: K+ÜN-CIP = 10 mL vorinkubierte Bakterienkultur + 10 mL ÜN-CIP (Übernachtkulturüberstand ohne Ciprofloxacin behandelt)
- Ansatz 3: AB+ÜN-CIP = 10 mL vorinkubierte Bakterienkultur + 9,9 mL ÜN-CIP + 0,1 mL 6,25 mg/L Ciprofloxacin (Endkonzentration im Ansatz 1-x MHK)
- Ansatz 4: AB+ÜN+CIP = 10 mL vorinkubierte Bakterienkultur + 9,9 mL ÜN+CIP (Übernachtkulturüberstand mit Ciprofloxacin behandelt und enthält somit bereits eine Konzentration von 0,5-x MHK) + 0,1 mL 3,125 mg/L Ciprofloxacin (entspricht einer Konzentration von 0,5-x MHK, und somit wird im Ansatz eine Endkonzentration von 1-x MHK erreicht)
- Ansatz 5: AB (Antibiotikum)=10 mL vorinkubierte Bakterienkultur + 9,9 mL Müller-Hinton-Bouillon + 0,1 mL 6,25 mg/L Ciprofloxacin (Endkonzentration im Ansatz 1-x MHK)

Jeder Ansatz wird zweimal angesetzt, und bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h wurden Proben für die Keimzahlbestimmung gezogen. Der Mittelwert der Keimzahl aus dem Doppeltansatz wird berechnet, logarithmiert (\log_{10}) und gegenüber der Zeit aufgetragen.

2.2.10 Ermittlung des Fehler bei der Keimzahlbestimmung

Zur Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung wird in der Batchkultur das Wachstumsverhalten von *E. coli* ohne Antibiotikum, sowie das Absterbeverhalten von *E. coli* während der Einwirkung von 16-x MHK Ciprofloxacin untersucht. Dabei werden beide Ansätze 10-fach angesetzt.

75 µL der Übernachtkultur von *E. coli* wird in 10 mL Müller-Hinton-Bouillon gegeben und eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, so dass ein Ausgangsinokulum von 5×10^6 bis 1×10^7 KBE/ml entsteht. Zu diesem Zeitpunkt $t = 0$ h wird die erste Probe gezogen und das Antibiotikum in der gewünschten Konzentration dazugegeben. Weitere Proben für die

Keimzahlbestimmung werden zu den Zeitpunkten $t = 3; 6$ und 24 h gezogen. Die Wasserbadtemperatur von 37 °C wird über den gesamten Versuchszeitraum aufrecht erhalten. Der Logarithmus (\log_{10}) der Keimzahl wird gegenüber der Zeit aufgetragen, und der Mittelwert sowie die Standardabweichung vom Mittelwert werden berechnet.

Vereinfachung der experimentellen Daten

Einzelne Messpunkte werden aus den Absterbekurven von *E. coli* entfernt, da sie für den an manchen Stellen „zackigen“ Kurvenverlauf von *E. coli* verantwortlich waren. Der Kurvenverlauf wird an diesen Stellen in derart vereinfacht, dass durch Interpolation ein neuer Messpunkt berechnet wird. Für die Interpolation werden die Messpunkte vor und nach dem eliminierten Messpunkt herangezogen. Dabei mussten die durch Interpolation berechneten Messpunkte innerhalb der experimentell bestimmten mittleren Standardabweichung, die durch die Keimzahlbestimmung auftreten kann, liegen.

2.2.11 Versuchsauswertung

Absterbekinetiken

Die experimentell bestimmten Keimzahlen werden logarithmiert (\log_{10}). Anschließend wird die Differenz zum Logarithmus des Ausgangsinokulums gebildet, und diese in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Berechnung des pharmakokinetischen Parameters AUC

Zur Berechnung des pharmakokinetischen Parameters AUC_{24} (Fläche unter der Konzentrationszeitkurve) wird die Trapezregel (Gleichung 2.4) verwendet:

$$AUC_{24} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{i-1} + C_i}{2} \cdot (t_i - t_{i-1}) + \frac{C_n}{\lambda_z} \quad (2.4)$$

AUC=Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve; C=Antibiotikumkonzentration;
t=Zeit; λ_z =terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

Die Fläche der Konzentrations-Zeitkurve wird hierdurch in einzelne Trapeze eingeteilt, und deren Flächen werden anschließend addiert [Jaehde *et al.* 1998].

Bestimmung der pharmakodynamischen Parameter

Zur Ermittlung der Effektivität eines Antibiotikums gegenüber dem Erreger wurden die pharmakodynamischen Parameter AAC, R_{\max} und R_{2h} aus der Absterbekinetik bestimmt.

1. Die Fläche über der Absterbekinetik AAC (=area above the curve) [$\log \Delta$ KBE/mL \times h] berechnet sich, analog zur AUC, mit Hilfe der Trapezregel [Rustige *et al.* 1990]. Dabei werden Flächen unterhalb der Inokulumlinie (Nulllinie) positiv bewertet, da sie durch das Absterben der Bakterien entstehen. Flächen oberhalb der Nulllinie werden negativ bewertet, da sie das bakterielle Wachstum über das Ausgangsinokulum anzeigen (Abbildung 2.2).

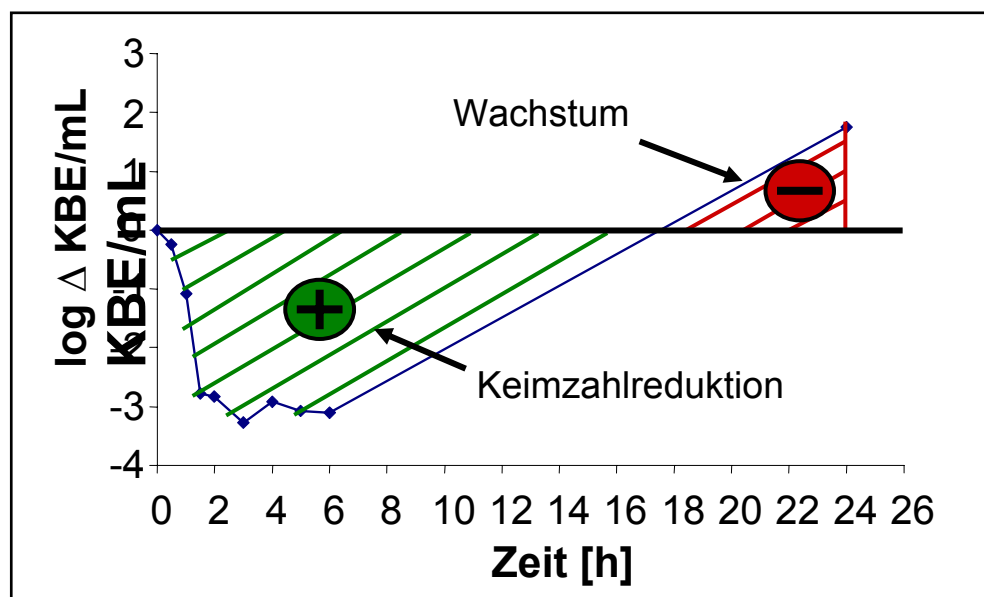


Abbildung 2.2: Graphische Darstellung des AAC-Wertes (Fläche oberhalb der Absterbekinetik)

2. Die maximale Keimzahlreduktion R_{\max} [$\log \Delta$ KBE/mL] wird direkt aus der Absterbekinetik als Differenz zum Ausgangsinokulum abgelesen (Abbildung 2.3).
3. Zur Beschreibung der initialen Abtötungsgeschwindigkeit wird der Parameter R_{2h} [$\log \Delta$ KBE/mL] bestimmt. R_{2h} beschreibt die Keimzahlreduktion als Differenz zum Ausgangsinokulum, die nach 2 Stunden Einwirkung des Antibiotikums erreicht wird (Abbildung 2.3).

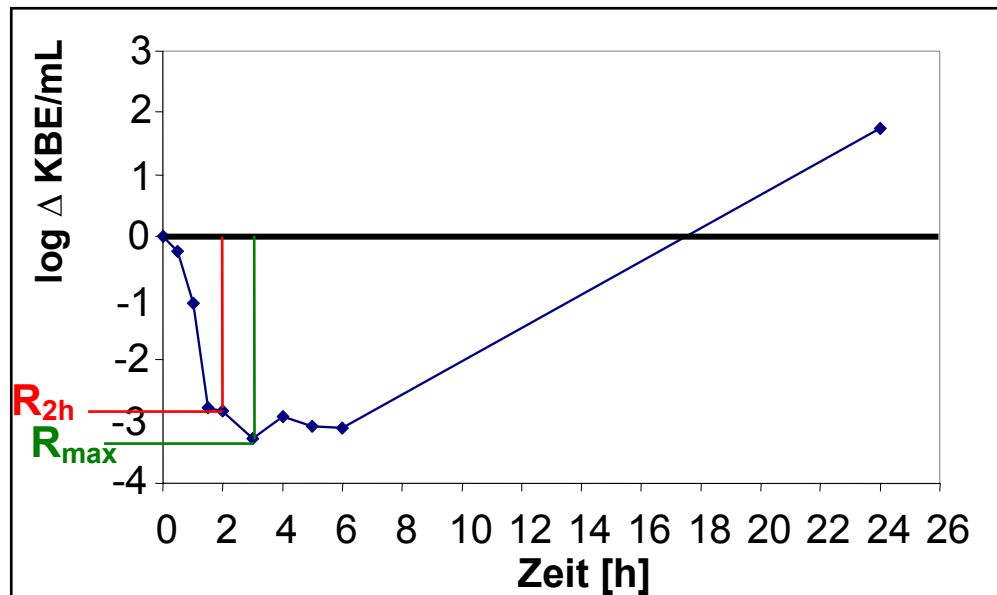


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der maximalen Keimzahlreduktion, R_{\max} , und der Keimzahlreduktion nach 2 Stunden R_{2h}

Bestimmung der pharmakologischen Indizes

Die pharmakologischen Indizes sind eine Kombination aus einem pharmakokinetischen und einem pharmakodynamischen Parameter. Die in dieser Arbeit verwendeten pharmakologischen Indizes wurden wie folgt berechnet:

AUC/MHK [h]

Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 Stunden dividiert durch die MHK des Erregers [Mouton *et al.* 2002].

C_{\max} /MHK [dimensionslos]

Maximale Plasmakonzentration C_{\max} dividiert durch die MHK des Erregers [Mouton *et al.* 2002].

$T_{>MHK}$ [%]

Kumulativer Prozentsatz der Zeit über 24 Stunden, in der die Antibiotikum-Konzentration über der MHK des Erregers liegt [Mouton *et al.* 2002].

2.2.12 Simulation und Anpassung der mathematischen Modelle

Die Simulation und die Anpassung der mathematischen Modelle erfolgt mit dem Programm MATLAB® Version 6.1 von The MathWorks, Inc., Natick, MA 01760-2098, U.S. [The MathWorks, 2000a].

2.2.12.1 Simulation der mathematischen Modelle

Die mathematischen Modelle werden als nicht-lineare Differentialgleichungen beschrieben. Das Lösen der Differentialgleichungen erfolgt in MATLAB mit der Funktion „ode45“ (ode für ordinary differential equation). Der MATLAB ode solver „ode45“ verwendet den Runge-Kutta-Algorithmus [The MathWorks, 2000a].

2.2.12.2 Anpassung der mathematischen Modelle

Parameteroptimierung

Die Optimierung der mathematischen Modelle erfolgt mit Hilfe der Parameteroptimierung. Unter einem *Parameter* versteht man eine charakteristische Konstante eines betrachteten Modellsystems. Durch Veränderung der Werte der Parameter erfolgt die Anpassung des mathematischen Modells an die experimentellen Daten. Dabei wird die Summe der quadrierten Residuen minimiert (Residuen = Abweichungen der Modelldaten von den Originaldaten) verwendet. Diese Funktion liefert durch das Quadrieren besonders große Werte im Falle großer Abweichungen, also schlechter Anpassung, und sehr kleine Werte im Fall geringer Abweichung, also guter Anpassung. Dabei wird die „Landschaft“ der Modell-Parameter auch als *Suchraum* bezeichnet. Diese Methode wird als nicht-lineare kleinste-Quadrate Daten-Regression bezeichnet.

Für jeden Parametersatz wird die Summe der Fehlerquadrate F berechnet.

$$F = \sum (f(t) - e(t))^2 \quad (2.5)$$

F =Fehlerquadrat, $f(t)$ =Ausgaben des Modells; $e(t)$ =experimentelle Daten

Die Größe des Fehlerquadrats ist abhängig von der Anzahl der Messpunkte und der Anzahl der Parameter in dem Modell. Damit ein Vergleich der unterschiedlichen mathematischen Modelle möglich ist, wird die Standardabweichung der Residuen S berechnet (Gleichung 2.6).

$$S = \sqrt{\frac{F}{n-P}} \quad (2.6)$$

S=Standardabweichung der Residuen; F=Fehlerquadrat; n=Anzahl der Messpunkte;
P=Anzahl der Parameter

Die Standardabweichung der Residuen berücksichtigt, im Gegensatz zur Summe der quadrierten Residuen, die Anzahl der experimentellen Messpunkte und die Anzahl der Parameter in den mathematischen Modellen. Somit ist ein Vergleich der Optimierungsergebnisse der einzelnen Modelle möglich.

Parameterabschätzung mittels Gauss-Newton Methode

Um eine ungefähre Vorstellung von der Parametergrößenordnung zu bekommen, dienen ausgewählte Bereiche der Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur zur Parameter-Schätzung.

Zur Ermittlung der Parameter μ_{\max} (=maximal spezifische Wachstumsrate) und N_{\max} (=maximale Bakterienanzahl in einer Kultur) können die experimentellen Daten der Wachstumskontrollen ohne Antibiotikum aus Abschnitt 3.4 hergezogen werden. Für die Anpassung der Gleichung (3.1), die das Wachstum einer bakteriellen Kultur ohne Antibiotikum beschreibt, an die experimentellen Daten dient die Funktion „nlinfit“ in MATLAB. Die Funktion „nlinfit“ verwendet für die nicht-lineare kleinste-Quadrate Daten-Regression die Gauss-Newton-Methode [The MathWorks, 2000b].

Zur Ermittlung von μ_{\max} und a (=Inhibierungskonstante) wird die Wachstumsrate WR bestimmt (siehe auch Abschnitt 3.6.1.1). WR ist die Steigung des steigenden Teils der Absterbekurven. Zur Ermittlung der WR werden je nach Konzentration 2 bis 5 Messpunkt (siehe Anhang 7.3) verwendet, und diese werden mit Hilfe von linearer Regression an die folgende Gleichung angepasst:

$$y = WR \cdot x + b$$

Zur Ermittlung von E_{\max} (=maximaler Effekt) und EC_{50} (=Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist) wird die Absterberate AR bestimmt, die Steigung aus dem sinkenden Ast der Absterbekurven. Hier werden auch je nach Konzentration 2 bis 5 Messpunkte (siehe Anhang 7.3) verwendet, und diese werden mit Hilfe von linearer Regression an die folgende Gleichung angepasst:

$$y = AR \cdot x + b$$

Die so bestimmten Wachstums- und Absterberaten werden als Funktion der Konzentration aufgetragen und in MATLAB mit der Funktion „nlinfit“ an die Gleichungen (3.2) und (3.3) angepasst [The MathWorks. 2000b]. Die in dieser Arbeit entwickelten mathematischen Modelle enthalten Wachstumsraten, die durch Gleichung (3.2) beschrieben werden. Die Wachstumsraten zeigen einen exponentiellen Abfall bei steigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Absterberaten, die in den entwickelten mathematischen Modellen in dieser Arbeit enthalten sind, werden durch Gleichung (3.3) beschrieben. Diese Absterberaten steigen mit steigender Antibiotikakonzentration an, und sättigen sich bei höheren Konzentrationen ab.

Optimierung der E_{max} -Modelle mittels der Gauss-Newton-Methode

Für die Anpassung des E_{max} -Modells an die pharmakodynamischen Parameter AAC und R_{max} (vergl. 2.2.10), werden die AAC und die R_{max} -Werte in Relation zur Wachstumskontrolle gesetzt. Das heißt, der AAC-Wert bzw. R_{max} -Wert der Wachstumskontrolle wird auf null gesetzt und die Differenz wird zu den anderen AAC-Werten bzw. R_{max} -Werten addiert. Diese relativen AAC- bzw. R_{max} -Werte werden in den E_{max} -Modellen mit Hilfe der Funktion „nlinfit“ in MATLAB optimiert [The MathWorks, 2000b].

Optimierung der mathematischen Modelle zur Beschreibung der Absterbekinetik mittels der Nelder-Mead Simplex-Methode

Die Anpassung der mathematischen Modelle, die eine Vorhersage der Absterbekinetik ermöglichen sollen, an die experimentell ermittelten Daten erfolgt mit der Nelder-Mead-Simplex-Methode. Die Simplex-Methode wird verwendet, um lokale Optima in einem Suchraum zu finden. Der Simplex-Algorithmus verwendet die kleinste geschlossene geometrische Figur, die ausreicht, um die Steigung in einem Gebiet zu ermitteln, z. B. für die Höhe einer Oberfläche in einem zweidimensionalen Suchraum (=zwei Parameter), ein Dreieck. Wird nun ein Dreieck auf die Oberfläche in den zweidimensionalen Suchraum gelegt, so kann man anhand der „Höhe“ der drei Eckpunkte des Dreiecks leicht die Richtung bergab, also zum lokalen Minimum abschätzen. Ein neues Simplex wird durch Austausch der höchsten Ecke des alten mit dem durch den Richtungsvektor festgelegten Punkt ermittelt. Sobald das Minimum erreicht ist, wird die Prozedur abgebrochen. Der Nachteil von solchen lokalen Optimierungsverfahren ist, dass keine Garantie besteht, auch das globale Optimum zu finden.

Zu Beginn der Modelloptimierung wird ein niedrig dimensionaler Suchraum ausgewählt, d. h. es werden nur ein oder zwei Parameter durch die Simplex-Methode variiert (nur ein oder zwei

Parameter werden für die Optimierung freigegeben), alle anderen Parameter werden konstant gehalten. Welche Parameter konstant gehalten werden, und welche von vornherein variiert werden, erfolgt aufgrund des mathematischen Modells (vergl. 3.6.3 – 3.6.9). Nach dem ersten Suchlauf werden jeweils ein oder zwei weitere Parameter zur Optimierung freigegeben, so dass beim letzten Suchlauf alle Parameter durch die Simplex Methode optimiert werden können.

Um ein globales Optimum zu finden, erfolgen mehrere Suchläufe mit unterschiedlichen Ausgangspunkten. Wenn das gleiche Optimum gefunden wird, ist davon auszugehen, dass das globale Optimum gefunden wurde.

Die Funktion „fminsearch“ in MATLAB wird für die Optimierung der mathematischen Modelle mittels Nelder-Mead Simplex Methode verwendet. Die Funktion „fminsearch“ ist eine direkte Suchmethode für multidimensionale, nicht-lineare Optimierungen [Coleman *et al.* 1999].

Der schematische Aufbau eines Hilfsprogramms, das durch die Funktion „fminsearch“ aufgerufen wird, hat folgenden Aufbau:

Dateiname (Parameterstartwerte)

1. Einlesen der experimentellen Daten von einer Datei
2. Simulation des mathematischen Modells mit „ode45“ bei gegebenen Parametersatz
3. Runden des berechneten Ergebnisses
4. Logarithmieren des Ergebnisses
5. Berechnung der Fehlerquadrate

Zunächst werden Startwerte für die Parameter festgelegt. Dabei ist es wichtig, dass alle Parameter die gleiche Größenordnung besitzen, deshalb werden große und kleine Parameterwerte logarithmiert. Mit diesen Parameterstartwerten wird das Programm aufgerufen, welches als erstes die Datei mit den experimentellen Daten einliest (Schritt 1). In dieser Datei sind die Absterbekinetiken (Zeitreihen der Bakterienanzahl N [KBE/mL] absolute Größe und *nicht* als $[\log \text{ KBE/mL}]$), die Messzeitpunkte t und die eingesetzten Konzentrationen C des Antibiotikums enthalten. Die Lösung der Differentialgleichung des Modells wird mit der Funktion „ode45“ berechnet (Schritt 2). Als Startwerte von N für die Lösung $N(t)$ werden die Messpunkte zum Zeitpunkt $t = 0$ h gewählt. Die Funktion „ode45“ ruft ein Programm auf, welches die Differentialgleichungen des mathematischen Modells implementiert, und berechnet den Kurvenverlauf des mathematischen Modells mit den Parameterstartwerten. Die Lösung wird gerundet (Schritt 3), mit der Funktion „deval“ in MATLAB wird das Ergebnis von „ode45“ für die Zeitpunkte t interpoliert, und anschließend wird N logarithmiert (\log_{10}) (Schritt 4). Die

Abweichung der experimentellen Daten von den berechneten Daten wird berechnet (Schritt 5), quadriert und summiert und an die Funktion „fminsearch“ geleitet. Die Funktion minimiert die Summe der Fehlerquadrate durch Variation der Parameterwerte wie oben beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Abschätzung der antibakteriellen Effektivität erfolgte durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Es wurde die Empfindlichkeit von *Escherichia coli* W3110 gegenüber den Antibiotika Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Tobramycin und von *Staphylococcus aureus* III-03-35 gegenüber Ciprofloxacin untersucht (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: MHK-Werte der untersuchten Antibiotika

Antibiotikum	<i>Escherichia coli</i> W3110 [mg/L]	<i>Staph. aureus</i> III-03-35 [mg/L]
Ciprofloxacin	0,031	0,25
Moxifloxacin	0,063	n. b.
Tobramycin	1	n. b.
Ampicillin	2	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

3.2 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung in der Batchkultur

3.2.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli*

In der Batchkultur wurde das zeitabhängige Absterbeverhalten von *E. coli* bei verschiedenen konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen untersucht. Abbildung 3.1 zeigt das Absterbeverhalten von *E. coli* unter Einwirkung von Ciprofloxacin.

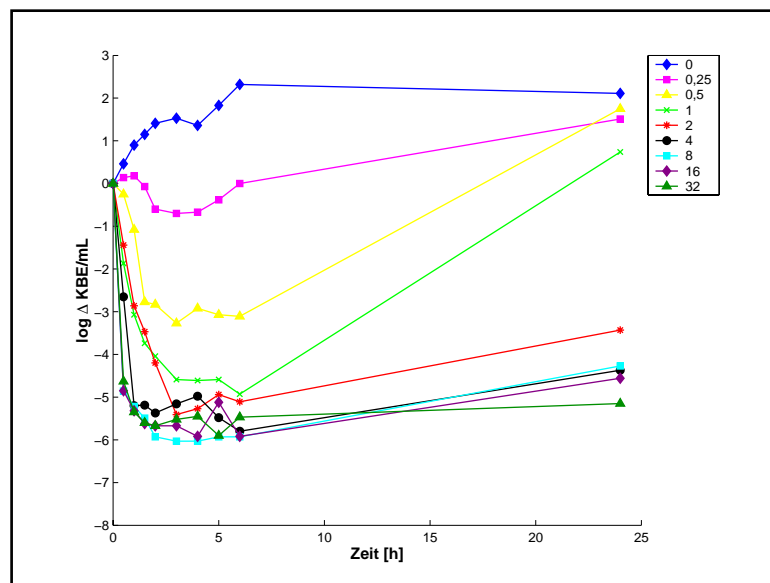


Abbildung 3.1: Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentrationen als Vielfaches der MHK

Mit zunehmender Konzentration ist eine zunehmende antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin zu beobachten, die initiale Abtötungsgeschwindigkeit kann von der 0,25- bis zur 8-fachen MHK gesteigert werden, und ab der 8-fachen MHK tritt eine Sättigung ein. Da ein Ausgangsinokulum von 10^7 KBE/mL gewählt wurde, ist eine maximale Keimzahlreduktion von 7 [$\log \Delta$ KBE] möglich.

Bei allen Konzentrationen ist ein zum Teil starkes Wiederauwachen der Bakterien zu beobachten. Konzentrationen von bis zu 1-x MHK zeigen ein Wachstum der Bakterien über das Ausgangsinokulum hinaus auf 10^8 KBE/mL, und bei hohen und konstant bleibenden Ciprofloxacin-Konzentrationen tritt keine vollständige Abtötung der Kultur ein. Eine gewisse Anzahl der Bakterien überlebt bzw. persistiert und ist zu geringfügigem Wachstum auf $10^1 - 10^2$ KBE/mL fähig.

Die Bestimmung der MHK von zufällig ausgewählten Kolonien, die nach Ausplattieren der Versuchskulturen nach Ende des Versuchs erhalten wurden, zeigten keine Veränderung in ihrer Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin. Dies trifft auch für die im folgenden ausgewählten Kolonien für die Bestimmung der MHK von Moxifloxacin, von Tobramycin, von Ampicillin und von Ciprofloxacin gegenüber *S. aureus* zu (3.2.2 – 3.2.5).

3.2.2 Antibakterielle Wirkung von Moxifloxacin auf *E. coli*

Untersuchungen des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach der Einwirkung von konstanten Moxifloxacin-Konzentrationen in der Batchkultur (Abb. 3.2) zeigen eine zunehmende Wirkung bei zunehmender Konzentration von Moxifloxacin auf *E. coli*. Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit kann von der 1- bis zur 4-fachen MHK deutlich gesteigert werden, ist allerdings ab der 8-fachen MHK bis zur 32-fachen MHK kaum noch steigerbar.

Die maximale Keimzahlreduktion nimmt bis zum 4-fachen der MHK bei jeder Verdopplung der Konzentration um 1-2 Zehnerpotenzen zu, ab der 8- bis zur 32-fachen MHK kann diese nur noch um jeweils eine halbe Zehnerpotenz gesteigert werden. Das Wiederauwachen der Bakterien über das Ausgangsinokulum hinaus auf mehr als 10^8 KBE/mL kann bis zur 1-fachen MHK beobachtet werden, bei der 2-fachen MHK wachsen die Bakterien bis zur Höhe des Ausgangsinokulums von 10^7 KBE/mL wieder an. Ab der 4-fachen MHK bleibt die Keimzahl ab Stunde 6 konstant.

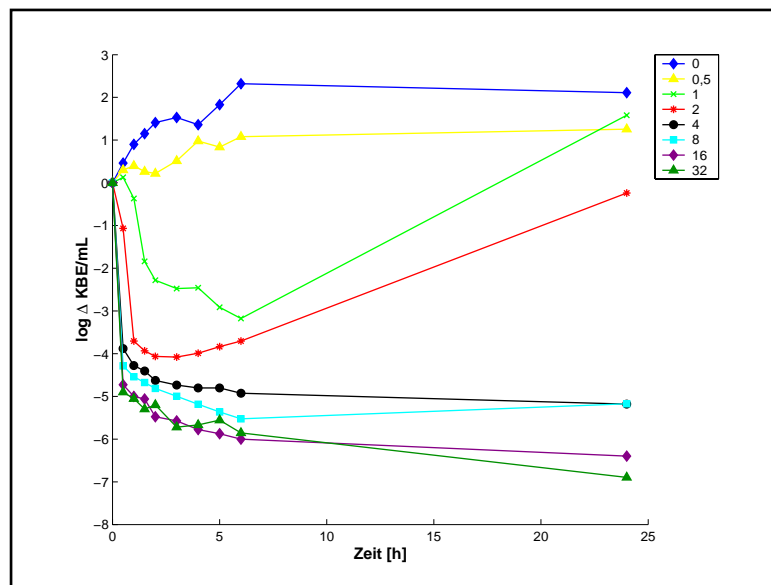


Abbildung 3.2: Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von konstanten Moxifloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Moxifloxacinkonzentrationen als ein Vielfaches der MHK

3.2.3 Antibakterielle Wirkung von Tobramycin auf *E. coli*

In Abbildung 3.3 ist das Absterbeverhalten in der Batchkultur von *E. coli* gegenüber konstanten Tobramycinkonzentrationen dargestellt. Tobramycin zeigt eine deutlich sichtbare konzentrationsabhängige Wirkung auf *E. coli*. Jede Konzentrationserhöhung zeigt auch eine Zunahme in der Wirkung.

Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Wirkstoffkonzentration deutlich zu. Die maximale Keimzahlreduktion erhöht sich mit jeder Zunahme der Antibiotikumkonzentration um ungefähr eine Zehnerpotenz, bei der 32-fachen MHK fällt die Keimzahl ab Stunde 4 sogar unter die Nachweisgrenze von 1 KBE/mL. Bis zur 2-fachen MHK wachsen die Keime über das Ausgangsinokulum hinaus wieder an.

Bei der 4- und der 8-fachen MHK wachsen die Bakterien noch um ungefähr eine Zehnerpotenz zwischen Stunde 6 und Stunde 24, die Keimzahl liegt aber um 3 bzw. 5 Zehnerpotenzen niedriger als das Ausgangsinokulum von ca. 10^7 KBE/mL. Bei der 16-fachen MHK bleibt die Keimzahl ab Stunde 4 konstant.

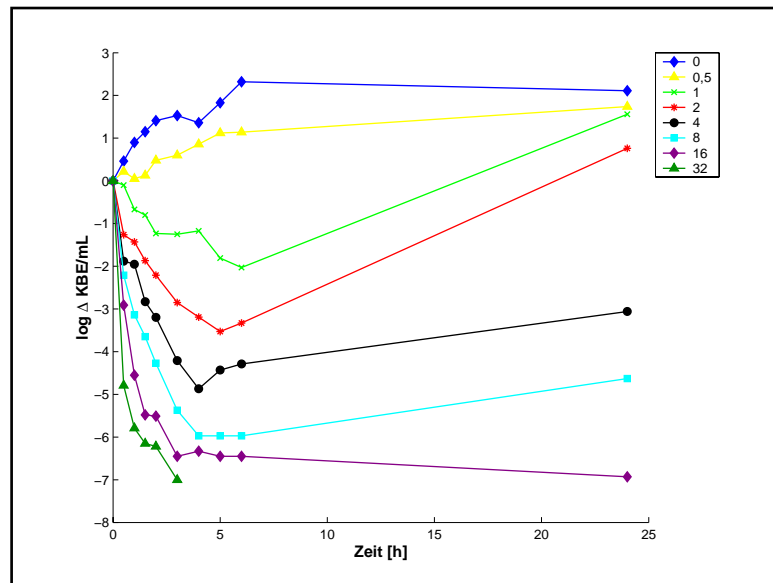


Abbildung 3.3: Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von konstanten Tobramycinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Tobramycinkonzentrationen als Vielfaches der MHK

3.2.4 Antibakterielle Wirkung von Ampicillin auf *E. coli*

Das zeitabhängige Absterbeverhalten von *E. coli* gegenüber verschiedenen konstanten Ampicillinkonzentrationen wurde untersucht und ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

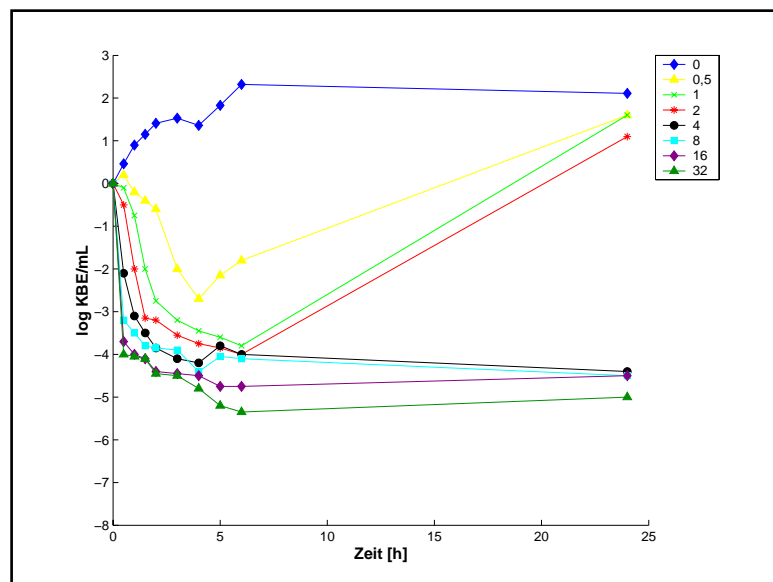


Abbildung 3.4: Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von konstanten Ampicillinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ampicillinkonzentrationen als Vielfaches der MHK

Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit nimmt von der 0,5 bis zur 16-fachen MHK zu. Die 32-fache MHK zeigt im Vergleich zur 16-fachen MHK keinen Unterschied in der initialen Abtötungsgeschwindigkeit. Bis zur 2-fachen MHK ist ein Wiederanwachsen der Bakterien über das Ausgangsinokulum hinaus zu beobachten, ab der 4-fachen MHK bleibt die Keimzahl ab Stunde 6 etwa konstant.

3.2.5 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus*

Die Absterbekinetiken von *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur (Abb. 3.5) zeigen, dass Ciprofloxacin eine geringere Effektivität gegenüber gram-positiven Bakterien besitzt. Ciprofloxacin zeigt auch eine konzentrationsabhängige Wirkung auf *S. aureus*. Eine Konzentration, die der halben MHK von *S. aureus* entspricht, zeigt keinen Einfluß auf das Wachstum von *S. aureus*. Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit kann von der 1- bis zur 4-fachen MHK gesteigert werden, allerdings ist die initiale Abtötung geringer als bei *E. coli* (siehe Tab. 3.2, Seite 10).

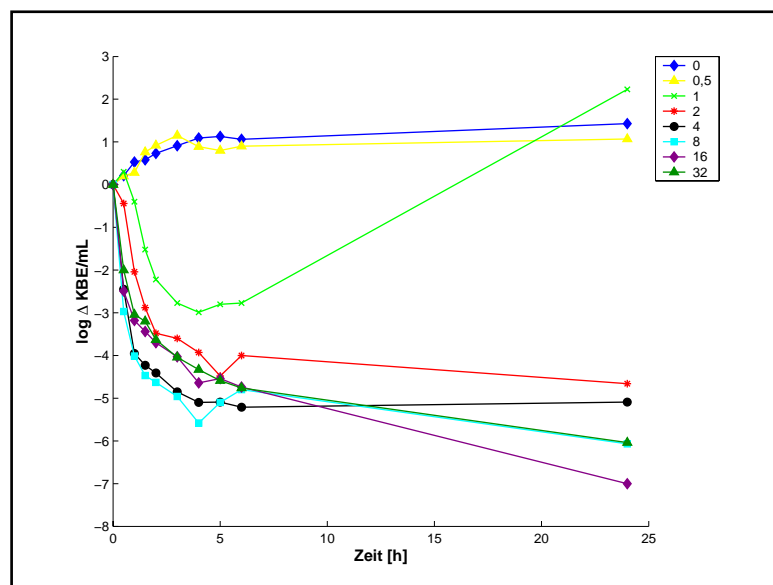


Abbildung 3.5: Absterbekinetiken von *S. aureus* unter Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentrationen als Vielfaches der MHK

Auffällig ist, dass die höchste eingesetzte Konzentration (32-fach MHK) bei *S. aureus* eine geringere antibakterielle Wirkung zeigt, als die Konzentrationen der 8- und 16-fachen MHK. Ein Wiederanwachsen der Bakterien ist nur bei der MHK entsprechenden Konzentration zu beobachten. Im Gegensatz zu *E. coli* zeigen Ansätze mit höheren Konzentrationen nicht einmal ein geringfügiges Wiederanwachsen von *S. aureus*.

Wie auch bei *E. coli* wird keine Sterilität in der Kultur erreicht, eine geringe Anzahl der Bakterien persistiert. Die Ermittlung der MHK von diesen persistierenden Bakterien zeigte keine Veränderung in der Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin.

3.3 In-vitro Modell

3.3.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *Escherichia coli* im in-vitro Modell

Die antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* im in-vitro Modell (Abb. 3.6) ist aufgrund der Verdünnung der Konzentration des Antibiotikums während des Versuch deutlich schlechter als in der Batchkultur. Die Initialkonzentration von dem 2-fachen der MHK zeigt überhaupt keine antibakterielle Wirkung auf *E. coli*. Das Wachstumsverhalten bei dieser Konzentration ist nahezu identisch mit dem Wachstumsverhalten ohne Antibiotikum. Höhere Konzentrationen zeigen schon bei geringfügiger Konzentrationserhöhung eine enorme Steigerung der Wirksamkeit von Ciprofloxacin auf *E. coli*. Der Konzentrationsbereich, in dem diese Wirkungssteigerung zu beobachten ist, ist sehr eng, und liegt zwischen 0,0625 mg/L (2x-MHK) und 0,25 mg/L (8x-MHK). Ab einer Initialkonzentration, die dem 8-fachen der MHK von *E. coli* entspricht, ist nur noch eine geringfügige Steigerung in der Wirkung zu beobachten. Dies wird anhand der AAC-Werte, die zwischen 113 und 140 liegen, und der maximalen Keimzahlreduktion von 6 bis 7 log Δ KBE ersichtlich (siehe Tab.3.2, Seite 10).

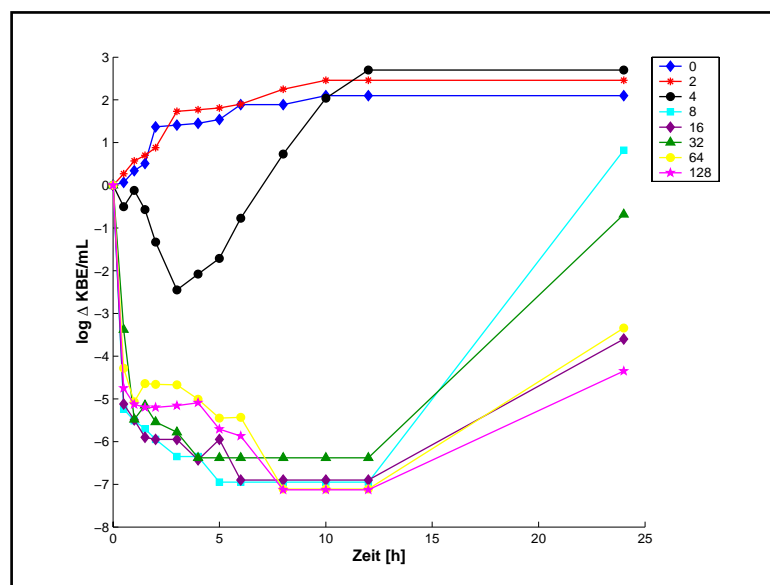


Abbildung 3.6: Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von Ciprofloxacin im in-vitro Modell; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentrationen als Vielfaches der MHK

3.3.2 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *Staphylococcus aureus* im in-vitro Modell

Das Absterben von *S. aureus* durch Ciprofloxacin (Abb. 3.7) zeigt ähnlich wie bei *E. coli* bis zu einer Konzentration von dem 8-fachen der MHK eine konzentrationsabhängige Wirkung (siehe Tabelle 3.2, Seite 10). Höhere Konzentrationen (16x- und 32x-MHK) zeigen, mit Ausnahme des 24 h Wertes, eine reduzierte Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* im in-vitro Modell. Obwohl die Konzentration der 2-fachen MHK von *S. aureus* eine höhere Wirkung zeigt als bei *E. coli*, zeigen alle anderen eingesetzten Konzentrationen eine schlechtere Wirkung. Der Konzentrationsbereich, in dem eine zunehmende Wirkung zu beobachten ist, befindet sich zwischen 0 und 4 mg/L (8x-MHK). Die eingesetzten Konzentrationen zeigen im Gegensatz zu *E. coli* deutlich geringere Unterschiede im Absterbeverhalten von *S. aureus* im in-vitro Modell.

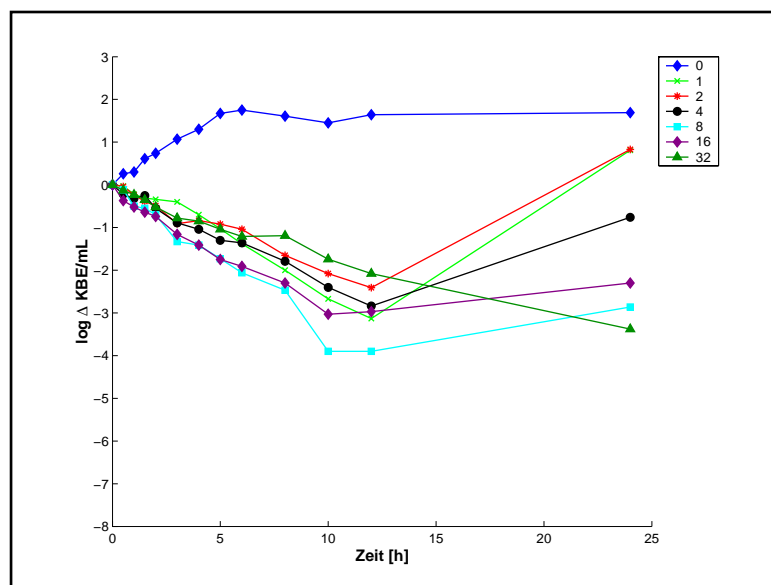


Abbildung 3.7: Absterbekinetiken von *S. aureus* unter Einwirkung von Ciprofloxacin im in-vitro Modell; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentrationen als Vielfaches der MHK

3.4 Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung von *E. coli* ermöglicht eine Aussage über die Präzision der experimentellen Daten.

Abbildung 3.8 zeigt die Abweichung bei einer zehnfachen Bestimmung der Keimzahl von *E. coli* in Gegenwart einer hohen Ciprofloxacin-Konzentration (16x-MHK) und in dessen Abwesenheit.

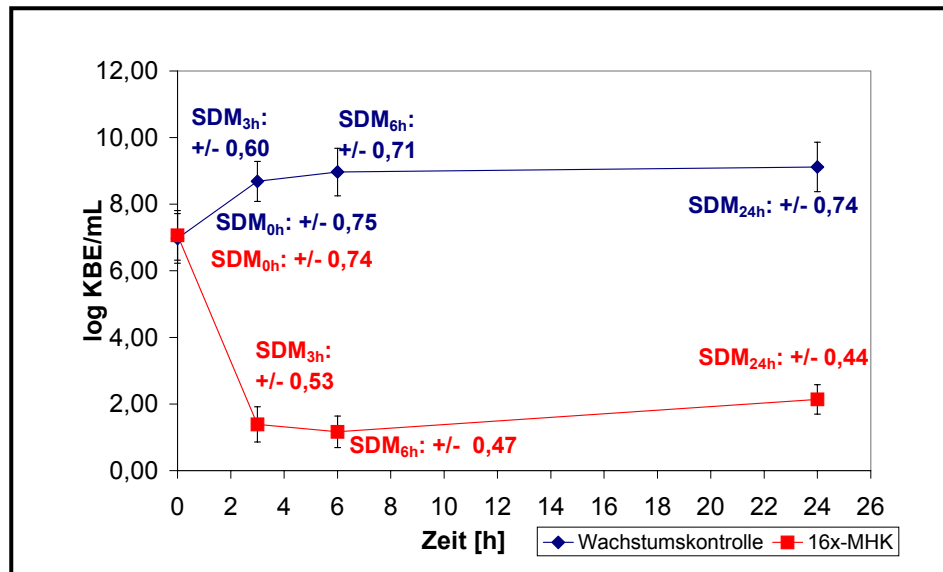


Abbildung 3.8: Ermittlung des methodischen Fehlers bei einer zehnfachen Bestimmung der Keimzahl von *E. coli*; Abkürzung: SDM: Standardabweichung vom Mittelwert

Am Anfang des Versuchs bei einem Ausgangsinokulum von 10^7 KBE/mL betrug die mittlere Standardabweichung in den beiden Ansätzen +/- 0,74 bzw. +/-0,75 [log KBE/mL], und war somit fast gleich.

Die Standardabweichungen vom Mittelwert (SDM) liegt bei den hohen Zellzahlen der Wachstumskontrolle zwischen +/- 0,6 und +/- 0,75 [log KBE/mL], und somit beträgt die mittlere Abweichung bei der Keimzahlbestimmung der Wachstumskontrolle +/- 0,70 [log KBE/mL]. Bei geringeren Zellzahlen, in Gegenwart des Antibiotikums ist die Standardabweichungen vom Mittelwert, die während der Keimzahlbestimmung auftreten, etwas geringer. Sie liegen zwischen +/- 0,44 und +/- 0,75 [log KBE/mL], die mittlere Abweichung beträgt somit +/- 0,55 log KBE/mL. Höhere Keimzahlen von *E. coli* zeigen somit eine höhere Standardabweichung vom Mittelwert als geringere Keimzahlen.

Diese Ergebnisse geben Aufschluß darüber, wie groß die Schwankungsbreite der Keimzahlbestimmung ist. Einzelne Meßpunkte in den Absterbekurven von *E. coli* nach der Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur wurden für die Modellanpassung innerhalb der Schwankungsbreite verändert (vergl. 2.2.9). 12 von 90 Messpunkten wurden innerhalb der Schwankungsbreite verändert (siehe Anhang 7.4). Durch den glatteren Kurvenverlauf werden empirische Schwankungen bei der Entwicklung des mathematischen Modells zunächst nicht berücksichtigt.

3.5 Berechnung der pharmakokinetischen/ pharmakodynamischen Parameter und der pharmakologischen Indices

Die pharmakokinetischen (PK) und die pharmakodynamischen (PD) Parameter sowie die pharmakologischen Indices (PI) in Tabelle 3.2 sollen eine bessere Vergleichbarkeit des Absterbeverhaltens der Spezies bei konstanten Antibiotikakonzentrationen in der Batchkultur und bei abnehmenden Konzentrationen im in-vitro Modell ermöglichen.

Bei allen Wachstumskontrollen (von *E. coli* und von *S. aureus* in der Batchkultur und im in-vitro Modell) und auch bei den niedrigsten Antibiotikakonzentrationen (mit Ausnahme von Ampicillin) sind die AAC-Werte negativ, was ein Wachstum der Bakterien über das Ausgangsinokulum anzeigt.

Der Vergleich der PD-Parameter von **Ciprofloxacin** in der Batchkultur zeigt, dass keine Steigerung der antibakteriellen Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* und *S. aureus* ab dem 8-fachen der MHK mehr möglich ist. Sowohl der R_{\max} als auch der AAC-Wert verändern sich nur noch geringfügig. Des Weiteren zeigen die AAC-Werte eine deutlich sichtbare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Ciprofloxacin auf *E. coli* und *S. aureus*. Geringe Konzentrationen (0,25-x und 0,5-x MHK) haben nur einen geringen antibakteriellen Effekt, mit zunehmender Konzentration ist eine deutliche Zunahme des Effekts zu beobachten, der beim maximalen Effekt, einem AAC-Wert von 120- 130 nicht mehr zu steigern ist.

Tobramycin zeigt dagegen bei jeder Konzentrationserhöhung auch eine Steigerung in der Wirkung auf *E. coli*, dies ist sowohl anhand der AAC-Werte als auch anhand der R_{\max} und der R_{2h} -Werte ersichtlich.

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von **Moxifloxacin** auf *E. coli* ähnelt der von Ciprofloxacin. Allerdings ist der Konzentrationsbereich, bei dem eine Steigerung der Wirkung auf *E. coli* ersichtlich ist, größer als bei Ciprofloxacin. Für einen minimalen Effekt ist schon eine Konzentration von 1-x MHK nötig. Der maximale Effekt ist erst bei der 16-fachen MHK erreicht. Hier ist kein wesentlicher Unterschied in den AAC-, R_{\max} - und R_{2h} -Werten zwischen der 16-fachen und der 32-fachen MHK zu beobachten. Die pharmakologischen Indices AUC/MHK , C_{\max}/MHK und $T_{>MHK}$ steigen unabhängig vom Effektivitätsmaximum von Ciprofloxacin und Moxifloxacin an, da ihre Größe proportional zur eingesetzten Konzentration ist.

Tabelle 3.2: Berechnung von Pharmakokinetischen-(PK) und Pharmakodynamischen (PD)-Parametern und von Pharmakologischen Indices (PI)

Batchkultur									
Anti-biotika/ Species	PK-Parameter		PD-Parameter				PI		
	C _{max} [n x MHK]	AUC ₂₄ [h x mg/l]	MHK [mg/l]	AAC [hxKBE/ml]	R _{max} [log Δ KBE]	R _{2h} [log Δ KBE]	AUC ₂₄ / MHK [h]	C _{max} / MHK	T _{>MHK} [%]
Ciprofloxacin/ <i>Escherichia coli</i>	0	0	0,0313	-48,08	2,32	1,41	0	0	0
	0,25	0,19		-11,51	-0,67	-0,6	6,07	0,25	0
	0,5	0,37		27,23	-3,27	-2,83	11,82	0,5	0
	1	0,75		61,35	-4,93	-4,04	23,96	1	0
	2	1,5		102,09	-5,11	-4,2	47,92	2	100
	4	3		120,6	-5,8	-5,37	95,85	4	100
	8	6		125	-6,03	-5,93	191,69	8	100
	16	12		126,14	-5,92	-5,67	383,39	16	100
	32	24		127,26	-5,9	-5,67	766,77	32	100
Moxifloxacin/ <i>Escherichia coli</i>	0	0	0,0625	-48,08	2,32	1,41	0	0	0
	0,5	0,75		-24,6	1,26	0,22	12	0,5	0
	1	1,5		26,6	-3,18	-2,28	24	1	0
	2	3		56,64	-4,08	-4,07	48	2	100
	4	6		117,56	-5,18	-4,63	96	4	100
	8	12		125	-5,53	-4,81	192	8	100
	16	24		143,35	-6,4	-5,48	384	16	100
	32	48		146,27	-6,9	-5,2	768	32	100
	Tobramycin/ <i>Escherichia coli</i>	0		0	1	-48,08	2,32	1,41	0
0,5		12	-29,66	1,74		0,48	12	0,5	0
1		24	11,22	-2,03		-1,23	24	1	0
2		48	38,31	-3,53		-2,21	48	2	100
4		96	87,66	-4,87		-3,21	96	4	100
8		192	123,4	-5,97		-4,27	192	8	100
16		384	153,39	-6,97		-5,51	384	16	100
32		768	159,03	-7		-6,22	768	32	100
Ampicillin/ <i>Escherichia coli</i>		0	0	2		-48,08	2,32	1,41	0
	0,5	24	10,41		-2,15	-0,6	12	0,5	0
	1	48	35,35		-3,8	-2,75	24	1	0
	2	96	43,99		-4	-3,2	48	2	100
	4	192	94,84		-4,4	-3,85	96	4	100
	8	384	96,76		-4,5	-3,85	192	8	100
	16	768	108,56		-4,75	-4,4	384	16	100
	32	1536	119,75		-5,35	-4,45	768	32	100
	Ciprofloxacin/ <i>Staph. aureus</i>	0	0		0,25	-27,29	1,43	0,73	0
0,5		3	-22,3	1,15		0,92	12	0,5	0
1		6	17,3	-2,99		-2,22	24	1	0
2		12	97,25	-4,66		-3,48	48	2	100
4		24	118,98	-5,09		-4,41	96	4	100
8		48	125,08	-6,07		-4,63	192	8	100
16		96	128,59	-7		-3,7	384	16	100
32		192	119,4	-6,04		-3,63	768	32	100

Tabelle 3.2 : PK/PD-Parameter und Pharmakologische Indices

-Fortsetzung-

In-vitro Modell									
Anti-biotika/ Species	PK-Parameter		PD-Parameter				PI		
	C_{max} [n x MHK]	AUC ₂₄ [h x mg/l]	MHK [mg/l]	AAC [hxKBE/ml]	R_{max} [log Δ KBE]	R_{2h} [log Δ KBE]	AUC ₂₄ / MHK [h]	C_{max} / MHK	$T_{>MHK}$ [%]
Ciprofloxacin/ <i>Escherichia coli</i>	0	0	0,0313	-44,01	2,1	1,37	0	0	0
	2	0,37		-51,49	2,46	0,88	11,82	2	33
	4	0,74		-31,63	-2,45	-1,33	23,64	3,99	67
	8	1,48		114,29	-6,95	-5,95	47,28	7,99	100
	16	2,96		138,9	-6,9	-5,95	94,57	15,97	100
	32	5,91		113,54	-6,38	-5,54	197	31,95	100
	64	11,83		132,03	-7,11	-4,66	377,96	63,9	100
	128	23,65		140,74	-7,13	-5,2	755,59	127,8	100
Ciprofloxacin/ <i>Staph. aureus</i>	0	0	0,25	-44,99	2,21	0,74	0	0	0
	1	1,48		31,13	-3,13	-0,34	5,91	1	0
	2	2,96		24,29	-2,41	-0,49	11,83	2	33
	4	5,91		38,91	-2,84	-0,55	23,65	4	67
	8	11,83		65,88	-3,9	-0,70	47,31	8	100
	16	23,65		53,76	-3,03	-0,74	94,61	16	100
	32	47,31		45,95	-3,38	-0,52	189,24	32	100

PK/PD-Parameter=pharmakokinetische/pharmakodynamische Parameter; PI=pharmakologische Indices; C_{max} =maximale Konzentration; AUC₂₄=Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve für 24 h; R_{max} =maximale Keimzahlreduktion; AAC=Fläche oberhalb der Absterbekurve; R_{2h} =Keimzahlreduktion nach 2 h; MHK=minimale Hemmkonzentration; $T_{>MHK}$ =Zeit in der die Konzentration des Antibiotikums oberhalb der MHK des Erregers liegt

Schon bei geringen Konzentrationen zeigt **Ampicillin** eine hohe Wirkung auf *E. coli*. Die Konzentration der 1-fachen MHK bewirkt bereits R_{max} -Werte von $-3,8$ [log Δ KBE/mL]. Der maximale Effekt wird bei 4-x MHK erreicht, da sich die AAC-Werte ab dieser Konzentration kaum noch erhöhen. Die maximale Keimzahlreduktion kann bei der 32-fachen MHK noch leicht erhöht werden auf $-5,35$ [log Δ KBE/mL]. Der Vergleich der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter in der Batchkultur mit denen im in-vitro Modell zeigt, dass obwohl die eingesetzten Anfangskonzentrationen im in-vitro Modell identisch mit den konstanten Konzentrationen in der Batchkultur sind, der Effekt im in-vitro Modell aufgrund der Elimination des Ciprofloxacins deutlich schlechter ist. Die AAC-Werte von *E. coli* und *S. aureus* weisen auf keine ausgeprägte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung hin. *E. coli* zeigt einen großen Sprung in den AAC-Werten zwischen der 4-fachen und der 8-fachen MHK. Ab einer Initialkonzentration von dem 8-fachen der MHK ist kaum noch eine Steigerung in der Wirkung möglich, da bereits hier ein R_{max} -Wert von -7 [log Δ KBE/mL] erreicht wird. Bei *S. aureus* zeigen die R_{2h} -Werte eine Wirkungssteigerung bis zur 16-fachen MHK, allerdings ist anhand der AAC-Werte zu sehen, dass höhere Konzentrationen (16-x und 32-x MHK) bei *S. aureus* zu einer verminderten Wirkung von Ciprofloxacin führen.

3.6 Mathematische Modellierung und dadurch angeregte Versuche

3.6.1 Anpassung der mathematischen Modelle

Durch Optimierung oder Anpassung wird ein System oder ein Modell so verändert, dass die Lösung des Modells optimal an die Daten angepasst wird. In dieser Arbeit wurden die mathematischen Modelle mit Hilfe der Gauss-Newton Methode oder mit Hilfe der Nelder-Mead-Simplex-Methode angepasst [Coleman *et al.* 1999]. Dabei dienten bei beiden Methoden die mittlere Standardabweichung der Residuen S als Maß für die Abweichungen zwischen den mathematischen Modellen und den experimentellen Daten (siehe Abschnitt 2.2.12).

3.6.1.1 Parameterabschätzung

Für die Parameteroptimierung der mathematischen Modelle wurden für jeden Parameter Startwerte benötigt. Zur Ermittlung der Startwerte erfolgte zunächst eine Abschätzung der Parameter aus den jeweiligen Teilbereichen der Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur. Die Abschätzung der Parameter aus den Teilbereichen der Absterbekurven von *E. coli* erfolgte mit Hilfe der Gauss-Newton Methode (siehe Abschnitt 2.2.12). Die im Folgenden für die Parameter μ_{\max} , N_{\max} , a , E_{\max} und EC_{50} geschätzten Werte dienten für die Anpassung bei allen folgenden mathematischen Modellen (mit Ausnahme der E_{\max} Modelle in Abschnitt 3.6.2) als Startwerte.

Abschätzung der Parameter μ_{\max} und N_{\max}

Für die Ermittlung des Fehlers bei der Keimzahlbestimmung (siehe Abschnitt 3.4) wurde die Wachstumskurve ohne Antibiotikum 10-fach bestimmt. Diese Daten wurden herangezogen, um die Parameter μ_{\max} und N_{\max} zu bestimmen. Aus dem ansteigenden Teil der Wachstumskurve kann der Parameter μ_{\max} bestimmt werden, da er die maximale spezifische Wachstumsrate von *E. coli*, die ohne Antibiotikum in der Batchkultur erreicht wird, beschreibt. Der Parameter N_{\max} ist die maximale Bakterienanzahl von *E. coli* in der Batchkultur. Die Information für N_{\max} ist im wesentlichen im stationären Teil der Wachstumskontrolle (siehe Abb. 3.10) ohne Antibiotikum lokalisiert. Gleichung (3.1) wurde mit Hilfe der Gauss-Newton Methode an die Wachstumskurven angepasst.

$$\boxed{\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \cdot N} \quad (3.1)$$

N = Bakterienanzahl; t =Zeit; μ_{\max} = maximal spezifische Wachstumsrate; N_{\max} =maximale Bakterienanzahl, die in einer Kultur erreicht werden kann

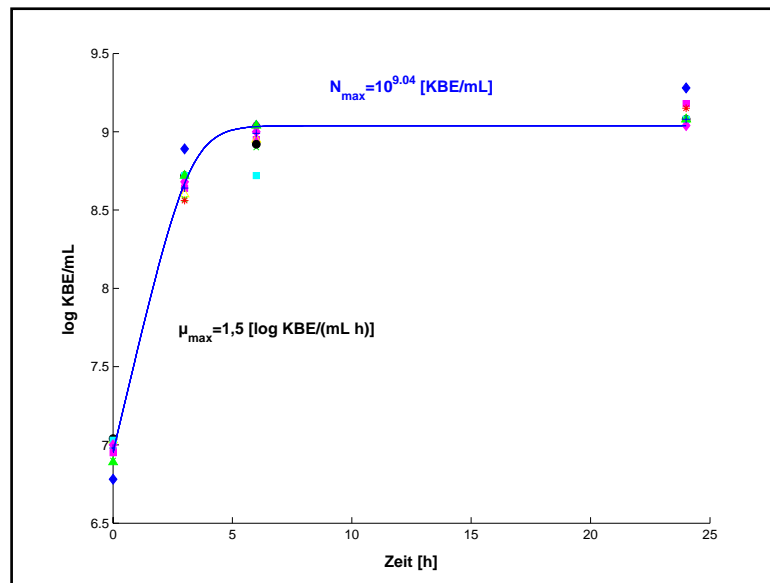


Abbildung 3.10: Ermittlung der Parameter μ_{\max} und N_{\max} mit Hilfe der Wachstumskontrollen; N_{\max} =maximale Bakterienanzahl; μ_{\max} = Wachstumsrate; Symbole = experimentelle Daten

Die Gleichung beschreibt das Wachstum einer bakteriellen Kultur ohne Antibiotikum, dieses Wachstum wird auch als logistisches Wachstum bezeichnet [Yano *et al.* 1998]. Das Ergebnis der Optimierung ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Für den Parameter μ_{\max} wurde ein Wert von 1,50 [h^{-1}] berechnet, und für N_{\max} wurde die maximale Bakterienanzahl von $10^{9,04}$ [KBE/mL] berechnet.

Abschätzung der Parameter μ_{\max} und a

Eine vereinfachende Annahme in den folgenden entwickelten mathematischen Modellen ist, dass die Wachstumsrate mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell abnimmt. Hierzu wurde bei unterschiedlichen Ciprofloxacin-Konzentrationen die Steigung aus dem hinteren Teil der Absterbekurven bestimmt. Die Steigung des wieder ansteigenden Teils der Absterbekurven nach Einwirkung des Antibiotikums beschreibt die Wachstumsrate von *E. coli* in Gegenwart von Ciprofloxacin. Diese Wachstumsraten wurden in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen (Abb. 3.11) und Gleichung (3.2) wurde an die Wachstumsraten angepaßt.

$$\mu(C) = \mu_{\max} \cdot e^{-a \cdot C} \quad (3.2)$$

μ = Wachstumsrate; C = Antibiotikumkonzentration; μ_{\max} = maximal spezifische Wachstumsrate; a = Inhibierungskonstante

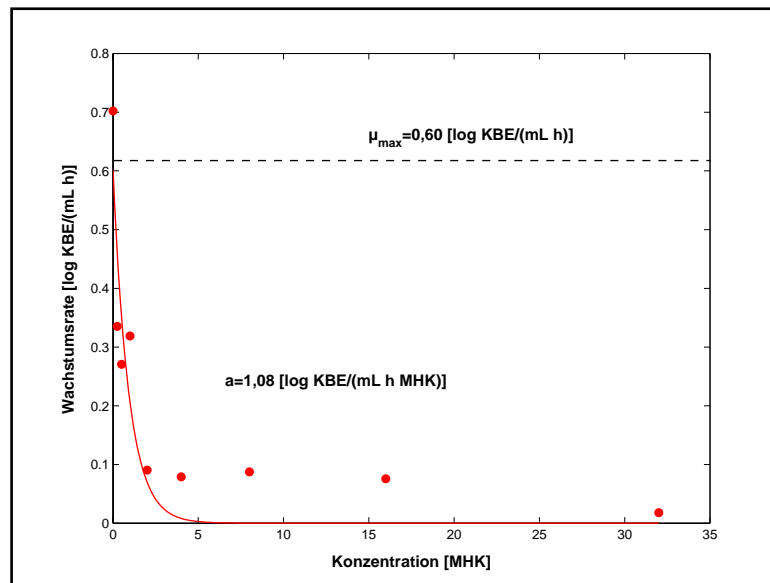


Abbildung 3.11: Ermittlung der Parameter μ_{\max} und a mit Hilfe der Wachstumsraten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacin-Konzentrationen in der Batchkultur; μ_{\max} =maximale Wachstumsrate; a =Inhibierungskonstante

Die Gleichung beschreibt den exponentiellen Abfall der Wachstumsrate $\mu(C)$ bei steigender Konzentration des Antibiotikums C . Die Inhibierungskonstante a beschreibt die exponentielle Abfallrate von μ pro Konzentrationsanstieg C , und μ_{\max} ist die maximale Wachstumsrate, die ohne Antibiotikum erreicht wird. Durch die Optimierung von $\mu(C)$ an die Wachstumsraten wurde ein μ_{\max} von $0,60 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ und ein a von $1,08 \text{ [h}^{-1} \text{ MHK}^{-1}\text{]}$ berechnet. Die Anpassung der Gleichung an die experimentellen Wachstumsraten von *E. coli* zeigt, dass ab einer Konzentration von 4-x MHK die Wachstumsraten sich langsamer an null nähern, als durch den exponentiellen Abfall der berechneten Kurve angenommen wird.

Abschätzung der Parameter E_{\max} und EC_{50}

Eine weitere wichtige Annahme, die in den folgenden mathematischen Modellen gemacht wird, ist, dass die Absterberate $k(C)$ mit steigender Antibiotikumkonzentration zunächst proportional ansteigt, und sich bei höheren Konzentrationen absättigt. Dieser Kurvenverlauf wird durch das E_{\max} -Modell beschrieben. Die Wachstumsrate μ und die Absterberate k sind somit Funktionen der Antibiotikumkonzentration C .

Aus diesem Grund wurden die Steigungen aus dem abfallenden Teil am Anfang der Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur berechnet, und in Abhängigkeit zur Konzentration aufgetragen (Abb. 3.12). Anschließend erfolgte die Anpassung der Parameter in der Gleichung (3.3) an die Absterberaten.

$$k(C) = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (3.3)$$

k =Absterberate C =Antibiotikumkonzentration; E_{\max} =maximaler Effekt; EC_{50} =Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist

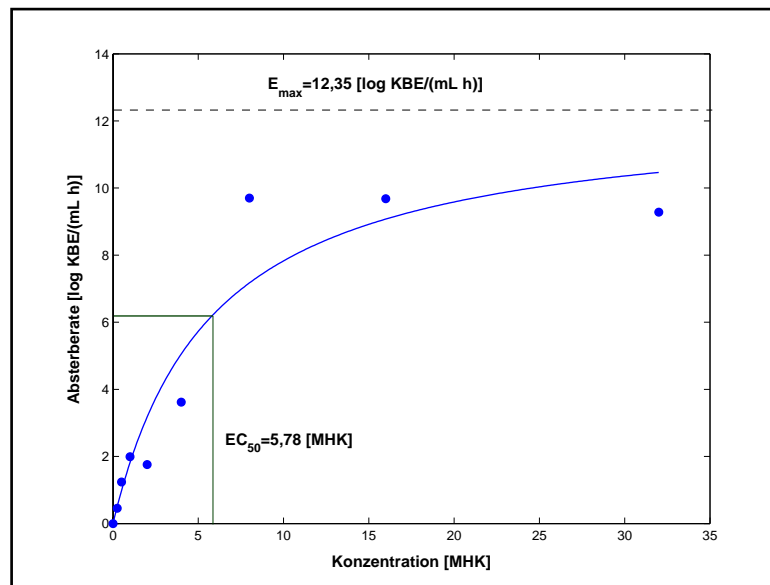


Abbildung 3.12: Ermittlung der Parameter E_{\max} und EC_{50} mit Hilfe der Absterberaten; E_{\max} =maximaler Effekt; EC_{50} = Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist

Es wurde ein E_{\max} -Wert von 12,35 [h^{-1}] und ein EC_{50} -Wert von 5,78 [MHK] erhalten.

3.6.2 E_{\max} Modelle

Aus den Absterbekurven von *E. coli* wurden die AAC- und die R_{\max} -Werte berechnet (siehe Tab. 3.2), und in Relation zur Wachstumskontrolle gesetzt. Diese relativen AAC- bzw. R_{\max} -Werte dienten als Datengrundlage für das E_{\max} -Modell. Mit Hilfe der Gauss-Newton Methode wurde das E_{\max} -Modell (Gleichung 1.1) optimal an die AAC (Abb.3.13 (a)) als auch an die R_{\max} -Werte (Abb. 3.12 (b)) angepaßt. Der maximale Effekt wurde in (a) bei einem AAC-Wert von 187,36 [h KBE/mL] erreicht, und in (b) bei einem R_{\max} -Wert von 8,62 [$\log \Delta$ KBE/mL]. Der halbmaximale Effekt in (a) wird bei 0,70 [MHK] erreicht, während in (b) der halbmaximale Effekt bereits bei 0,32 [MHK] erreicht wird. Die Abweichung der experimentellen Daten von der berechneten Kurve in (a) größer als in (b). Die Standardabweichung der Residuen S in (a) beträgt 2,55, während S in (b) nur 0,06 beträgt.

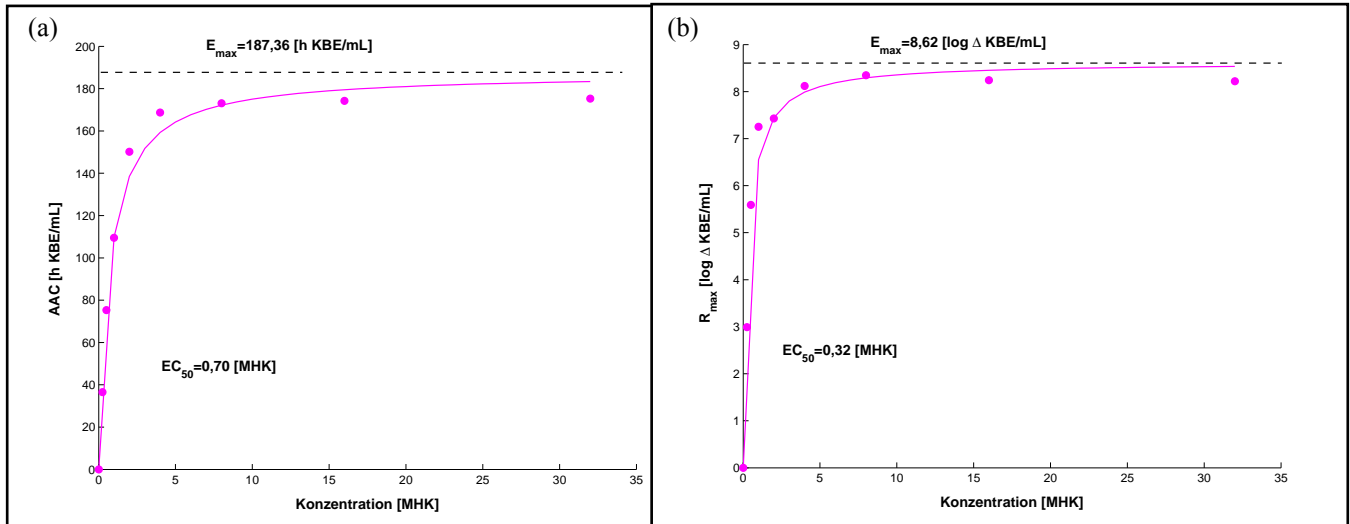


Abbildung 3.13: (a) Experimentell ermittelte (●) und berechnete (—) AAC-Werte aufgrund des E_{\max} -Modells; (b) Experimentell ermittelte (●) und berechnete (—) R_{\max} -Werte mit Hilfe des E_{\max} -Modells; E_{\max} = maximaler Effekt; EC_{50} = Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist, AAC = Fläche über der Absterbekurve; R_{\max} = maximale Keimzahlreduktion

Abbildung 3.14 zeigt das Ergebnis der Optimierung des sigmoidalen E_{\max} -Modells an die experimentellen Daten. Das sigmoidale E_{\max} -Modell (Gleichung 1.2) ermöglicht aufgrund des zusätzlichen Parameters eine bessere Anpassung an die experimentell ermittelten AAC- und R_{\max} -Werte als das E_{\max} -Modell.

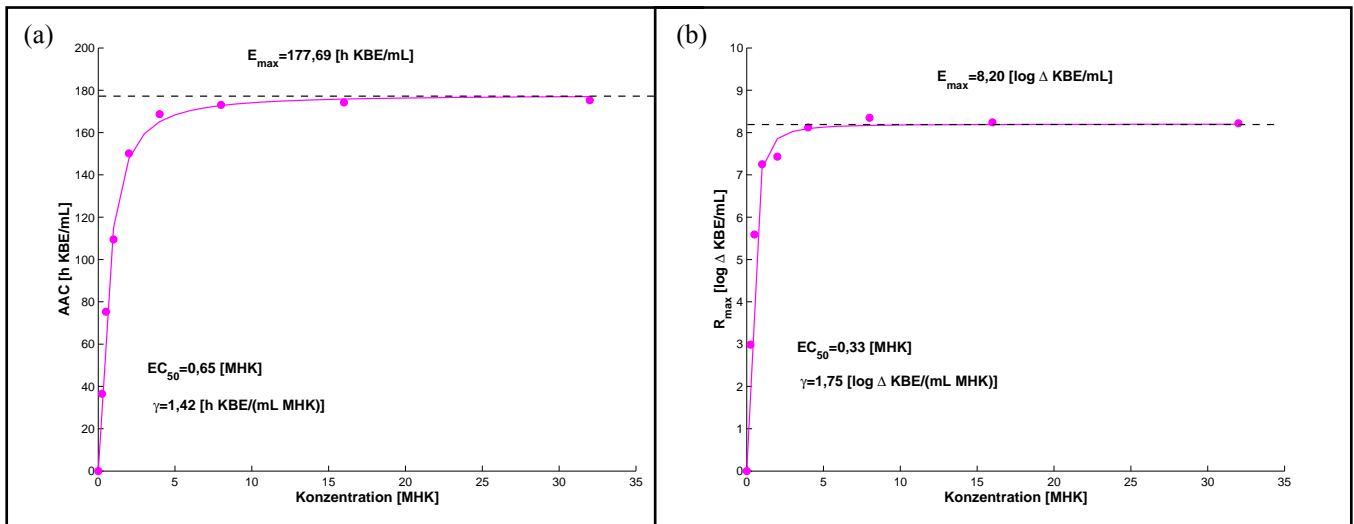


Abbildung 3.14: (a) Experimentell ermittelte (●) und berechnete (—) AAC-Werte mit Hilfe des sigmoidalen E_{\max} -Modells; (b) Experimentell ermittelte (●) und berechnete (—) R_{\max} -Werte aufgrund des sigmoidalen E_{\max} -Modells; E_{\max} = maximaler Effekt; EC_{50} = Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist, AAC = Fläche über der Absterbekurve; R_{\max} = maximale Keimzahlreduktion; γ = Hill-Faktor

Dies zeigt sich durch die geringe Standardabweichung der Residuen in Abbildung 13.13, die in (a) 0,20 und in (b) $7,71 \times 10^{-3}$ beträgt. In Abbildung 3.14 (a) wurde ein maximaler Effekt von 177,69 [h KBE/ mL], ein EC_{50} -Wert von 0,65 [MHK] und ein γ (Hill-Faktor) von 1,42 [h KBE/ (mL MHK)] berechnet. Der Hillfaktor γ , der direkt proportional zur Krümmung in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist, beträgt in (b) 1,75 [(h KBE)/ (mL MHK)]. Der maximale Effekt wurde in (b) bei 8,20 [log Δ KBE/mL] erreicht, und eine Konzentration von 0,33 [MHK] ist für den halbmaximalen Effekt notwendig.

3.6.3 Modell „Nolting“

Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] entwickelten ein mathematisches Modell, das die Vorhersage der antibakteriellen Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen des β -Laktam-Antibiotikums Piperacillin auf *E. coli* ermöglicht. Der Versuch, das Absterbeverhalten von *E. coli* bei konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur mit Hilfe des Modells von Nolting *et al.* (Gleichung 1.4) zu beschreiben, ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

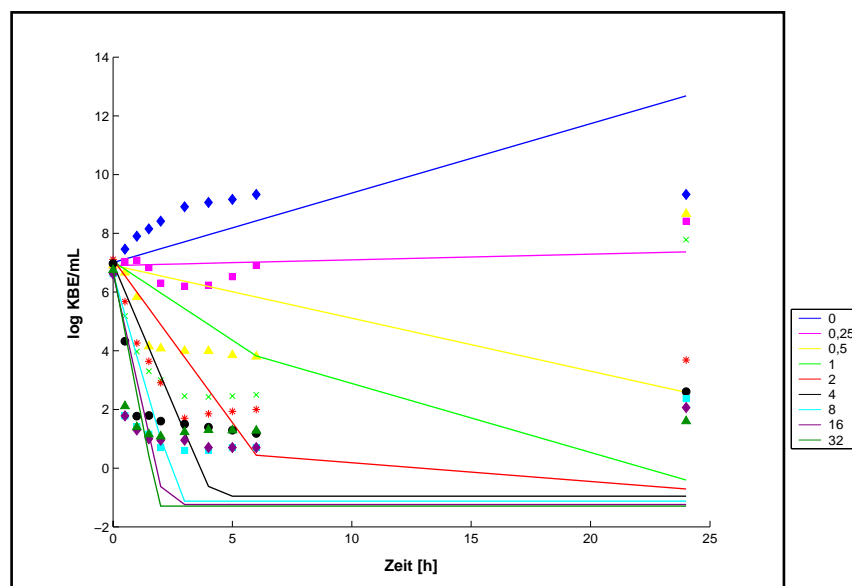


Abbildung 3.15: Mit dem Modell „Nolting“ berechnete (-) und experimentell bestimmte (Symbole) Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Die Anpassung des mathematischen Modells an die experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe der Nelder-Mead Simplex Methode (vergl. Abschnitt 2.2.12). Dabei wurden die in Abschnitt 3.6.1.1 bestimmten Parameter für $\mu_{\max}=1,50$ [h^{-1}] (für k), $E_{\max}=12,35$ [h^{-1}] (für k_{\max}) und $EC_{50}=5,78$ [MHK] verwendet. Der dritte Term ($1 - e^{-z \cdot t}$) in dem Modell, der die bakterielle Wachstumsverzögerung darstellt, konnte vernachlässigt werden, da die experimentellen

Bedingungen so gewählt wurden, dass durch Vorinkubation die Bakterien zum Beginn des Versuchs sich bereits in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die experimentellen Daten weichen systematisch und drastisch von den berechneten Kurven des Modells ab. Trotz der Anpassung des Modells an die experimentellen Daten ist bei keiner Konzentration eine annähernde Übereinstimmung zwischen den berechneten Kurvenverläufen und den experimentellen Daten festzustellen. Dies zeigt sich auch in der Standardabweichung der Residuen $S=2,20$. Durch Parameteroptimierung wurden für die Wachstumsrate ein k von $0,545 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ berechnet, der maximale Effekt wurde bei $k_{\max}=12,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ erreicht, und der EC_{50} -Wert betrug $5,82 \text{ [MHK]}$.

3.6.4 Modell „Heterogene Population“

Aufgrund der experimentell ermittelten Daten in der Batchkultur wurde in dieser Arbeit das mathematische Modell „Heterogene Population“ entwickelt, das u. a. auf der Annahme beruht, dass die bakterielle Gesamtpopulation aus Teilpopulationen besteht. Diese Teilpopulationen unterscheiden sich, vor allem bei der Anwesenheit eines Antibiotikums, im Wachstum und im Absterben.

3.6.4.1 Annahmen des Modells „Heterogene Population“

Das in dieser Arbeit entwickelte mathematische Modell „Heterogene Population“ beruht auf folgenden Annahmen:

1. Die bakterielle Gesamtpopulation N_{total} besteht aus den zwei Teilpopulationen N_1 und N_2 :

$$N_{\text{total}} = N_1 + N_2 \quad (3.4)$$

Im Folgenden stehen die Parameter Indices 1 und 2 für die Teilpopulationen 1 und 2.

2. Die Wachstumsraten μ und die Absterberaten k sind Funktionen der Antibiotikumkonzentration C :

2.a Die Wachstumsrate $\mu_1(C)$ der Teilpopulation N_1 nimmt mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell ab:

$$\mu_1(C) = \mu_{\max 1} \cdot e^{-a \cdot C} \quad (3.5)$$

2.b Die Absterberate $k_1(C)$ der Teilpopulation N_1 steigt mit steigender Antibiotikumkonzentration zunächst an, sättigt sich aber bei höherer Konzentration:

$$k_1(C) = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (3.6)$$

2.c Die Wachstumsrate $\mu_2(C)$ der Teilpopulation N_2 nimmt auch mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell ab, ist aber kleiner als μ_1

$$\mu_2(C) = \mu_{\max 2} \cdot e^{-a \cdot c}; \mu_{\max 2} < \mu_{\max 1} \quad (3.7)$$

2.d Die Teilpopulation N_2 wird durch das Antibiotikum nicht abgetötet.

3. Die Teilpopulation N_2 liegt nur zu einem sehr geringen Anteil in der Gesamtpopulation N_{total} vor (der Anteil von N_2 in N_{total} wurde experimentell in Abschnitt 3.6.4.2 ermittelt):

$$\begin{aligned} N_1 &\sim 1 \cdot N_{\text{total}} \\ N_2 &\sim 5,4 \cdot 10^{-5} \cdot N_{\text{total}} \end{aligned} \quad (3.8)$$

4. Zu keiner Zeit wird das Wachstum der Bakterien durch Substratmangel oder irgendetwas anderes limitiert.

Somit ergibt sich die Änderung der Bakterienpopulation N_1 aufgrund des Wachstums und des Sterbens der Bakterien wie folgt:

$$\frac{dN_1}{dt} = \left(\mu_{\max 1} \cdot e^{-a \cdot c} - \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N_1 \quad (3.9)$$

Die Bakterienpopulation N_2 ändert sich nur aufgrund von Wachstum, das aber langsamer ist als das Wachstum der Bakterienpopulation N_1 , wie folgt:

$$\frac{dN_2}{dt} = \mu_{\max 2} \cdot e^{-a \cdot c} \cdot N_2 \quad (3.10)$$

3.6.4.2 Ermittlung der Anzahl persistierender Bakterien

Durch Variation der Höhe des Ausgangsinokulum wurde die Anzahl von persistierenden Zellen von *E. coli* nach vier Stunden Einwirkung von 1mg/L (32-x MHK) Ciprofloxacin in der Batchkultur untersucht (vergl. Abschnitt 2.2.8). Abbildung 3.16 zeigt den prozentualen Anteil der persistierenden Bakterien bei einer Zunahme des Inokulums von 1×10^7 auf bis zu 1×10^8 KBE/mL.

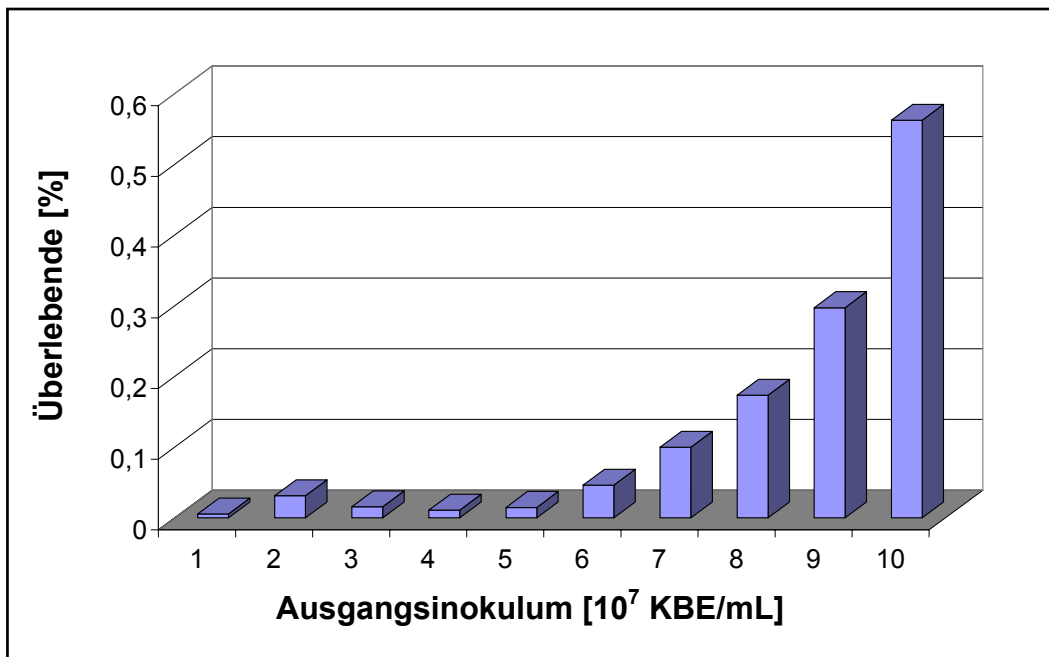


Abbildung 3.16: Prozentualer Anteil der persistierenden Zellen von *E. coli* nach vier Stunden Einwirkung von 1 mg/L (32-x MHK) Ciprofloxacin

Zwischen den Anfangsinokula von 1×10^7 und 4×10^7 KBE/mL schwankt der Anteil der „Persister“ zwischen 0,005 und 0,01 %. Bei 5×10^7 KBE/mL liegt der prozentuale Anteil bei 0,014 % und die prozentuale Zunahme der persistierenden Zellen verdoppelt sich bei Erhöhung des Ausgangsinokulums, so dass bei dem Ausgangsinokulum von 1×10^8 KBE/mL der Anteil der persistierenden Zellen von *E. coli* bei 0,563 % liegt. Das Ausgangsinokulum in der Batchkultur beträgt $\sim 1 \times 10^7$ KBE/mL, bei diesem Inokulum beträgt die Anzahl der Persister 0,0054 %, dieser Prozentsatz entspricht einer Wahrscheinlichkeit von $5,4 \times 10^{-5}$. Dieses Ergebnis bildet die Grundlage für Annahme 3 des Modells „Heterogene Population“.

3.6.4.3 Anpassung des Modells „Heterogene Population“

Mit dem Modell „Heterogene Population“ wurde versucht, das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur zu beschreiben. Für die Anpassung des Modells an die Daten wurden die in Abschnitt 3.6.1.1 bestimmten Parameter für $\mu_{\max 1}=1,50$ [h^{-1}], $a=1,08$ [$\text{h}^{-1} \text{MHK}^{-1}$], $E_{\max}=12,35$ [h^{-1}] und $EC_{50}=5,73$ [MHK] zunächst konstant gehalten, und $\mu_{\max 2}$ wurde für die Parameteroptimierung freigegeben. Dabei wurde ein Startwert von $0,75$ [h^{-1}] ($=\mu_{\max 1}/2$) für die Anpassung gewählt.

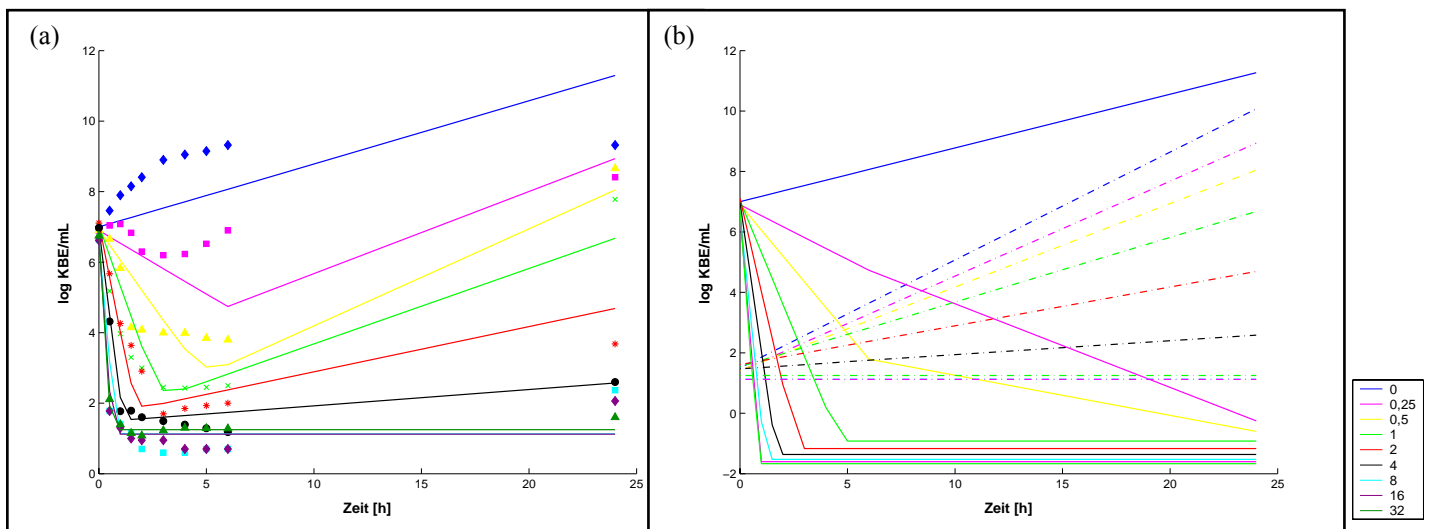


Abbildung 3.17: (a) Mit dem Modell „Heterogene Population“ berechnete (-) und experimentell bestimmte (Symbole) Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacin-Konzentrationen in der Batchkultur, (b) berechnetes Populationsverhalten der Teilpopulationen N_1 (-) und N_2 (- ·) nach Einwirkung von Ciprofloxacin; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentration als Vielfaches der MHK

Ausgehend von diesen Startbedingungen wurde ein Fehlerminimum bei einem $\mu_{\max 2}$ -Wert von $1,32$ [$\log \text{KBE}/\text{mL h}$] gefunden, dabei betrug die Standardabweichung der Residuen $S=2,11$. Anschließend wurde der Parameter a und danach E_{\max} und EC_{50} für die Parameteroptimierung freigegeben. Zum Schluss wurde $\mu_{\max 1}$ zur Anpassung freigegeben. Nach der Freigabe aller Parameter wurde die geringste Standardabweichung der Residuen von $S=0,72$ bei den folgenden Parametergrößen gefunden: $\mu_{\max 1}=0,41$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=0,82$ [h^{-1}], $E_{\max}=26,39$ [h^{-1}], $EC_{50}=5,28$ [MHK] und $a=0,51$ [$\text{h}^{-1} \text{MHK}^{-1}$]. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Abbildung (a) zeigt die berechneten Kurvenverläufe der Gesamtpopulation N_{total} zusammen mit den experimentell bestimmten Daten. Das Modell zeigt extreme Abweichungen zu den experimentell ermittelten Daten bei den Konzentrationen 0 und 0,25. Höhere Konzentrationen zeigen dagegen eine bessere Anpassung des Modells an die Daten. Abbildung (b) zeigt die berechneten Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin für die

Teilpopulationen N_1 und N_2 . Abbildung (b) macht deutlich, dass die Teilpopulation N_2 für das Wiederaanwachsen der Gesamtpopulation N_{total} verantwortlich ist.

3.6.5 Modell „Alarmon“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Alarmon“ basiert auf einer anderen Annahme bezüglich der Existenz von persistierenden Bakterien.

3.6.5.1 Annahmen des Modells „Alarmon“

Die Annahmen des Modells „Alarmon“ sind folgende:

5. Wie auch in dem Modell „Heterogene Population“ sind die Wachstumsrate μ und die Absterberate k Funktionen der Antibiotikumkonzentration C :

1.a Die Wachstumsrate $\mu(C)$ der Population N nimmt mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell ab:

$$\mu(C) = \mu_{\max} \cdot e^{-a \cdot c} \quad (3.11)$$

1.b Die Absterberate $k(C)$ der Population N steigt mit steigender Antibiotikumkonzentration zunächst an, sättigt sich aber bei höherer Konzentration:

$$k(C) = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \cdot F(A) \quad (3.12)$$

6. Oberhalb eines Schwellenwertes A_c für die Konzentration eines Alarmons A sterben die Bakterien nicht mehr ab, da das Alarmon dann den durch das Antibiotikum ausgelösten programmierten Selbstmord der Zelle inhibiert. Dies wird im einfachsten Fall durch die Stufenfunktion $F(A)$ beschrieben:

$$\begin{aligned} F(A) &= 1 && \text{für } A < A_c \\ F(A) &= 0 && \text{Für } A \geq A_c \end{aligned} \quad (3.13)$$

7. Damit ergibt sich die Änderung der Bakterienpopulation N aufgrund des Wachstums und des Sterbens der Bakterien wie folgt:

$$\frac{dN}{dt} = \left(\mu_{\max} \cdot e^{-a \cdot c} - \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \cdot F(A) \right) \cdot N \quad (3.14)$$

8. Die sterbenden bzw. „sich umbringenden“ Bakterien setzen γ , eine bestimmte Menge Alarmon pro toter Zelle, frei, welches dann im Medium nicht weiter umgesetzt wird.

9. Zu keiner Zeit wird das Wachstum der Bakterien durch Substratmangel oder irgendetwas anderes limitiert. Dies ist allerdings für das Wachstum der Kontrollen nur für kurze Zeit erfüllt. Deshalb ist eine korrekte Beschreibung des Wachstums der Kontrollen nur für die ersten Stunden der Wachstumsversuche zu erwarten.

$$\frac{dA}{dt} = \gamma \cdot k(C) \cdot N$$

3.6.5.2 Bildung von Alarmonen in einer antibiotikumbehandelten Kultur

In der Batchkultur wurde untersucht, ob in dem Kulturüberstand einer mit Antibiotikum behandelten Bakterienpopulation die hypothetischen Alarmone nachweisbar sind.

Abbildung 3.18 zeigt den Einfluss der Zugabe von Übernachtkulturüberständen (ÜN) und von Ciprofloxacin (siehe Abschnitt 2.2.9) auf das Absterbeverhalten von *E. coli*. Das Wachstumsverhalten der Kontrolle K zeigt keinen Unterschied zum Wachstumsverhalten bei Zugabe von Übernachtkulturüberstand (K+ÜN-CIP).

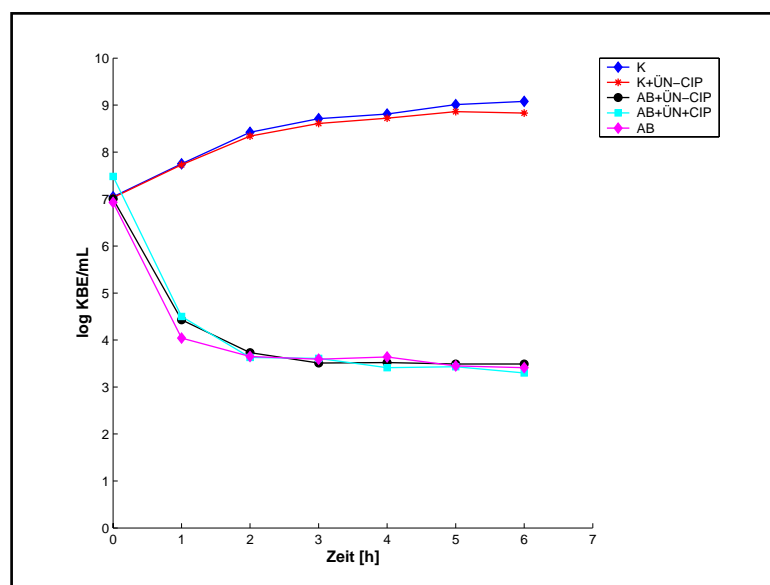


Abbildung 3.18: Untersuchungen zum Einfluss der Alarmonproduktion durch Zugabe von Übernachtkulturüberständen und von Ciprofloxacin auf das Absterbeverhalten von *E. coli*.

Abkürzungen: K= Wachstumskontrolle ohne Übernachtkulturüberstände; K+ÜN-CIP= Wachstumskontrolle mit Übernachtkulturüberstand; AB+ÜN-CIP= antibiotikumbehandelte Kultur (1 MHK) mit Übernachtkulturüberstand (die Übernachtkultur wurde nicht mit Ciprofloxacin behandelt); AB+ÜN+CIP= antibiotikumbehandelte Kultur (0,5-x MHK) mit Übernachtkulturüberstand (die Übernachtkultur wurde mit einer Ciprofloxacin-Konzentration von 0,5 MHK behandelt, somit wurde eine Gesamtkonzentration im Ansatz von 1 MHK erreicht); AB= antibiotikumbehandelte Kultur (1 MHK) ohne Übernachtkulturüberstand

Das Absterbeverhalten von *E. coli* zeigt nach Einwirkung von 1-x MHK Ciprofloxacin keinen Unterschied zwischen den Ansätzen ohne (AB) und mit Übernachtkulturüberstand (AB+ÜN-CIP). Des Weiteren zeigt sich kein Unterschied im Absterbeverhalten von *E. coli* bei einer Zugabe von Überstand, die aus einer Ciprofloxacin behandelten Übernachtkultur gewonnen wurden (AB+ÜN+CIP). Somit konnten mit der verwendeten Methode keine Alarme nachgewiesen werden.

3.6.5.3 Anpassung des Modells „Alarmon“

Mit dem Modell „Alarmon“ wurde versucht, das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur zu beschreiben. Für die Anpassung wurden die in Abschnitt 3.6.1.1 bestimmten Parameter von $\mu_{\max}=1,50$ [h^{-1}], $a=1,08$ [$\text{h}^{-1} \text{MHK}^{-1}$], $E_{\max}=12,35$ [h^{-1}] und $EC_{50}=5,78$ [MHK] zunächst konstant gehalten, und die Parameter γ und A_c wurden für die Parameteroptimierung freigegeben. Für beide Parameter wurde ein Startwert von 1 gewählt. Da die Größenordnung dieser beiden Parameter völlig unbekannt ist, wurden unterschiedliche Startwerte mit unterschiedlichen Größenordnungen für die Optimierung herangezogen. Jedoch änderte sich die Größe der Standardabweichung der Residuen nicht, unabhängig von den gewählten Startwerten für γ und A_c , es wurde immer eine Standardabweichung der Residuen von 4,80 berechnet. Die Endwerte für γ und A_c änderten sich bei der Parameteroptimierung ebenfalls nicht.

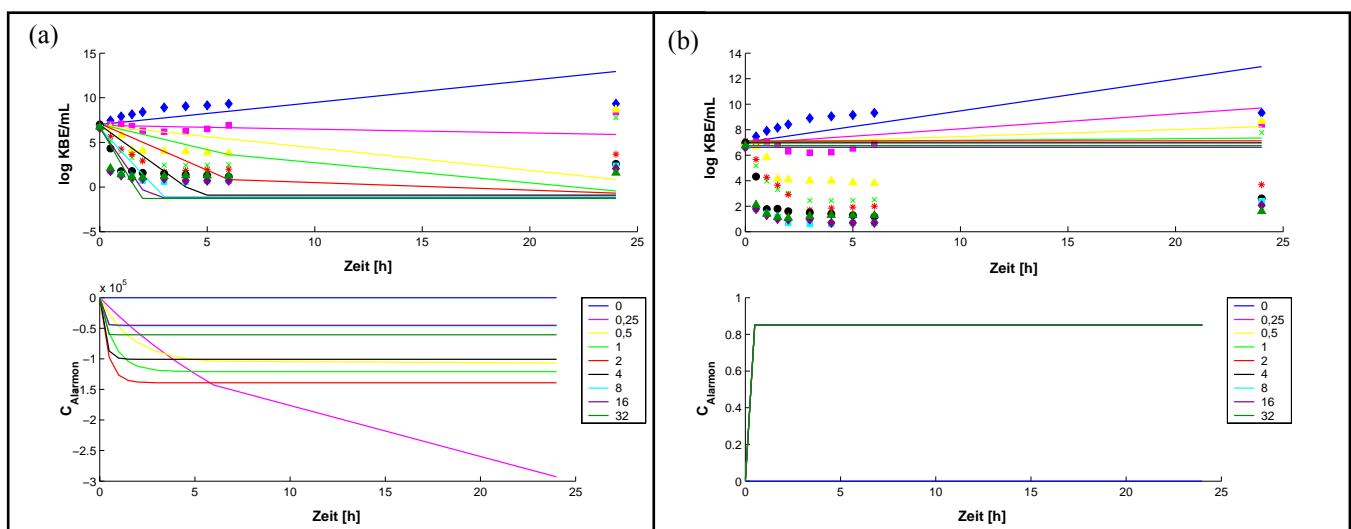


Abbildung 3.18: Mit dem Modell „Alarmon“ berechnete und experimentell bestimmte Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur (a) bei negativer Alarmonkonzentration; (b) bei positiver Alarmonkonzentration; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Anschließend wurde a , dann E_{\max} und EC_{50} und zum Schluß μ_{\max} für die Parameteroptimierung freigegeben. Die Anpassung berechnete die geringste Standardabweichung der Residuen von $S=2,28$ bei den folgenden Parameter: $\mu_{\max}=0,57$ [h^{-1}], $a=2,00$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $E_{\max}=11,91$ [h^{-1}], $EC_{50}=7,89$ [MHK], $\gamma=-0,01$ und $A_c=0,83$. Dieser Parametersatz liefert das Ergebnis, das in Abbildung 3.18 (a) dargestellt ist. Dabei zeigt der obere Teil der Abbildung die Veränderung der Bakterienanzahl nach Einwirkung von Ciprofloxacin im Vergleich zu den experimentell ermittelten Daten, und der untere Teil der Abbildung zeigt die berechnete hypothetische Alarmonkonzentration während des Versuchs. Die berechneten Absterbekurven weichen vor allem in der initialen Abtötungsphase und in der terminalen Wachstumsphase von den experimentellen Daten ab. Die Alarmonkonzentration ist aufgrund des negativen γ -Wertes negativ und nimmt bei steigender Antibiotikumkonzentration zu. Der Schwellenwert A_c wird nicht erreicht.

Da für γ ein negativer Wert in der Parameteroptimierung berechnet wurde, dieser aber auf jeden Fall positiv sein sollte, wurden für die Simulation von Abbildung 3.18 (b) die gleichen optimierten Parameter wie in (a) verwendet, nur für γ nicht wie oben $-0,01$ sondern $+0,01$ verwendet. Bei diesem Parametersatz ist die Standardabweichung der Residuen von $S=4,14$ doppelt so groß als in Abbildung 3.18 (a). Hier findet keine effektive Anpassung an die Daten statt. Die untere Abbildung in 3.18 (b) zeigt die hypothetische Alarmonproduktion der Bakterien während des Experiments. Die Konzentration des Alarmons erreicht bei dem verwendeten Parametersatz bei allen Ciprofloxacinkonzentrationen bereits nach ca. 0,5 h die Konzentration des Schwellenwerts A_c (die einzelnen Kurven für die unterschiedlichen Konzentrationen waren praktisch deckungsgleich), wodurch das weitere Absterben der Bakterien in Anwesenheit des Antibiotikums verhindert wird.

3.6.6 Modell „Yano“

3.6.6.1 Anpassung des Modells „Yano“

Yano *et al.* entwickelten ein mathematisches Modell (Gleichung 1.5 – 1.8), das die Vorhersage des Absterbeverhaltens in der Batchkultur von *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* gegenüber den β -Laktam-Antibiotika Meropenem, Imipenem, Cefprium, Ceftazidim und einem neuen Carbapenem (S-4661) ermöglicht [Yano *et al.* 1998]. In Abbildung 13.19 ist der Versuch dargestellt, das Absterbeverhalten von *E. coli* gegenüber Ciprofloxacin in der Batchkultur mit dem Modell „Yano“ zu beschreiben. Für die Anpassung wurden zunächst die publizierten

Annahmen des Modells, sowie die publizierten Parameter als Startwerte verwendet [Yano *et al.* 1998], diese waren folgendermaßen: $\beta=1,93 \times 10^{-9}$ [KBE/mL], $B_{\max}=2,0 \times 10^9$ [KBE/mL]; $k_{\max}=8,708$ [h^{-1}], $KC_{50}=0,019$ [MHK], $k_1=0,0012$ [h^{-1}], $k_2=0,532$ [h^{-1}] und $k_d=0,187$ [h^{-1}]. Nach der Anpassung war die Standardabweichung der Residuen nur noch $S=0,480$, und die am besten angepaßten Parameter waren wie folgt: $\beta=1,36 \times 10^{-9}$ [KBE/mL], $B_{\max}=1,21 \times 10^9$ [KBE/mL], $k_{\max}=26,16$ [h^{-1}], $KC_{50}=2,31$ [MHK], $k_1=7,66 \times 10^{-5}$ [h^{-1}], $k_2=0,0034$ [h^{-1}], $k_d=0,19$ [h^{-1}]. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.19 (a) dargestellt.

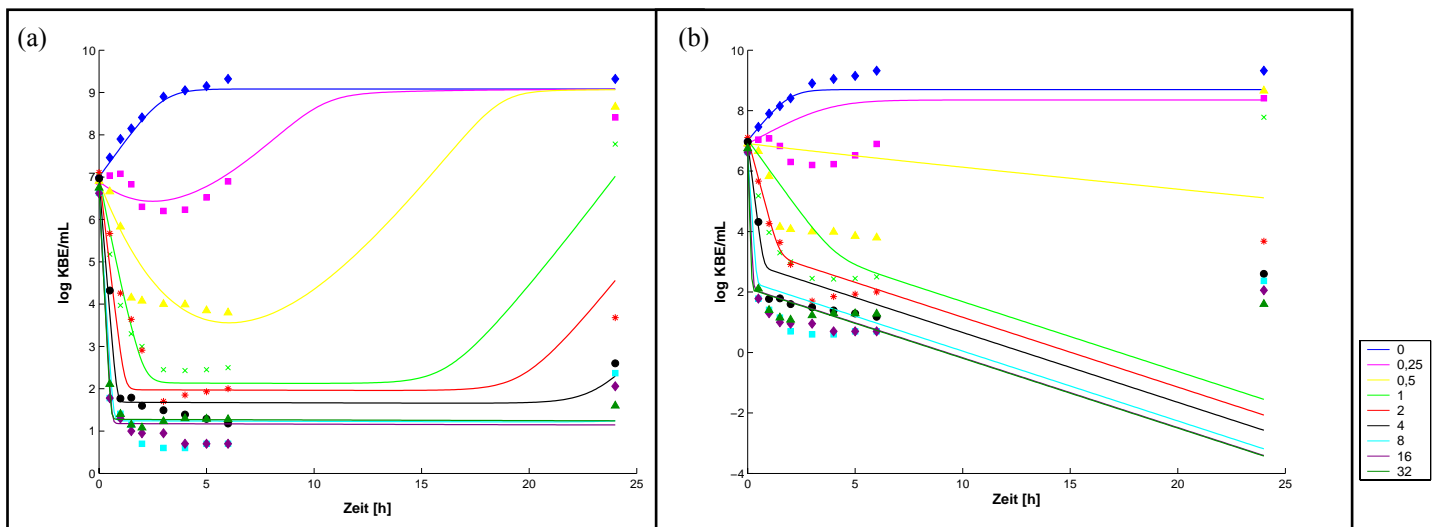


Abbildung 3.19: Mit Modell „Yano“ berechnetes sowie experimentell ermitteltes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; (a) $K_d=0,187$, (b) $K_d=0$; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Abbildung 3.19 (b) zeigt das Ergebnis der Optimierung unter der Annahme, dass das Antibiotikum nicht zerfällt, d. h. $k_d=0$ (vergl. 3.6.6.2). Die Startwerte für die Anpassung in (b) sind die in Abschnitt 3.6.1.1 ermittelten Werte für μ_{\max} (dabei ist $\mu_{\max}/N_{\max}=\beta$), N_{\max} (für B_{\max}), E_{\max} (für k_{\max}) und EC_{50} (für KC_{50}). Nach der Anpassung wurde ein Minimum in der Standardabweichung der Residuen bei den folgenden Parametergrößen berechnet: $\beta=4,12 \times 10^{-9}$ [KBE/mL], $B_{\max}=4,97 \times 10^9$ [KBE/mL], $k_{\max}=86,96$ [h^{-1}], $KC_{50}=19,15$ [MHK], $k_1=0,0012$ [h^{-1}], $k_2=0,532$ [h^{-1}], $k_d=0$ [h^{-1}]. Die Standardabweichung der Residuen in (b) beträgt $S=2,02$ und ist somit um den Faktor 4,2 größer als in (a).

3.6.6.2 Konzentrationsbestimmung von Ciprofloxacilin

Die Konzentrationsbestimmung von Ciprofloxacilin in der Batchkultur (vergl. Abschnitt 2.2.5) in Abbildung 3.20 zeigt, dass die Menge von Ciprofloxacilin während des Versuchszeitraums von

Stunde 0,5 bis 25 konstant bleibt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass durch Abbau oder Zerfall von Ciprofloxacin ein Aktivitätsverlust während des Versuchs entsteht.

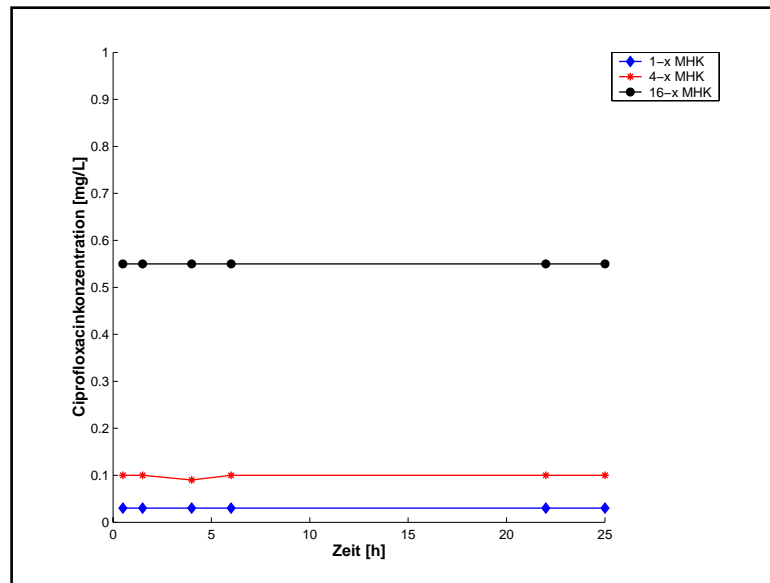


Abbildung 3.20: Konzentrationsbestimmung von Ciprofloxacin in der Batchkultur bei den Konzentrationen 1x- MHK, 4-x MHK und 16-x MHK

3.6.7 Modell „Schuck“

Das von Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002] entwickelte mathematische Modell (Gleichung 1.9 – 1.11), beschreibt das Absterbeverhalten von *E. coli* gegenüber abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell. Der Versuch, das Absterbeverhalten von *E. coli* bei konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur mit dem Modell „Schuck“ zu beschreiben, schlug fehl, da die Simulation des Modells mit den Parametern aus Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002] nicht zum dort angegebenen Ergebnis führte. Abbildung 3.21 zeigt die Simulation des Absterbeverhaltens von *E. coli* aufgrund des Modells „Schuck“ bei abnehmender Ciprofloxacinkonzentration C mit einer Initialkonzentration von 1 mg/L (32-x MHK) und abnehmender Konzentration von C_r (Konzentration, die die adaptive Resistenz induziert).

Die Simulation des Modells mit den publizierten Parametergrößen zeigt eine maximale Keimzahlreduktion von 1,7 Zehnerpotenzen nach ca. 18 h. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Konzentration im in-vitro Modell nur noch 0,04 mg/L. Die Konzentration C_r sinkt von 0,93 bis 4 Stunden auf null, wird dann negativ und fällt bis 24 Stunden auf ca. -0,8 mg/L ab. Die berechneten Kurvenverläufe in der Arbeit von Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002] zeigen nach 14 Stunden bei einer Initialkonzentration von 0,5 mg/L eine maximale Keimzahlreduktion von 4 Zehnerpotenzen.

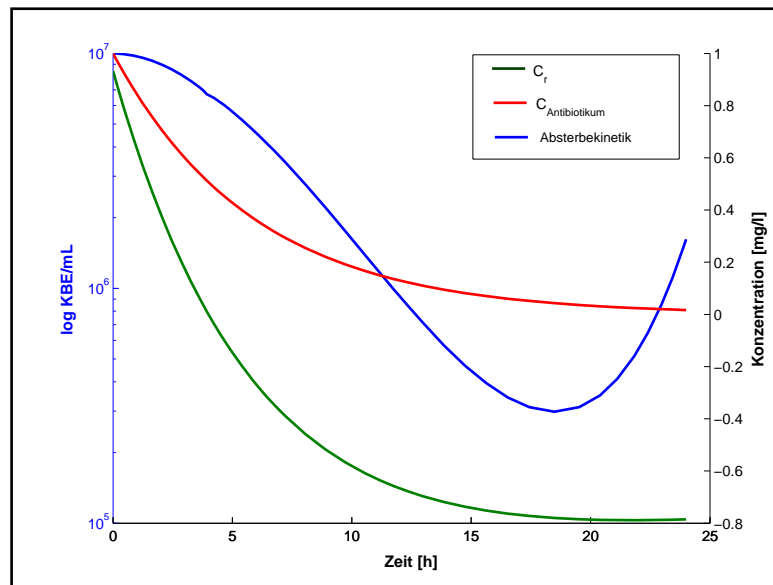


Abbildung 3.21: Berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* laut Modell „Schuck“ nach Einwirkung von abnehmender Ciprofloxacin-Konzentration im in-vitro Modell bei einer Initialkonzentration von 1 mg/L (32-x MHK) unter Verwendung der publizierten Parametergrößen [Schuck *et al.* 2002]; C_r = Konzentration, die die adaptive Resistenz induziert, $C_{\text{Antibiotikum}}$ = Ciprofloxacin-Konzentration im in-vitro Modell

Die maximale Absterberate der Bakterien wird vor allem von der Konzentration C_r bestimmt. C_r ist abhängig von der anfangs im Experiment eingesetzten Konzentration des Antibiotikums, von der Eliminationskonstanten k_e und von der Rate α , die die abnehmende adaptive Resistenz beschreibt. Abbildung 3.22 zeigt die Abhängigkeit von C_r bei unterschiedlichen Größen von k_e und α . Unabhängig von den gewählten Anfangsgrößen für k_e und α , ist C_r in jedem Fall zu einer bestimmten Zeit negativ.

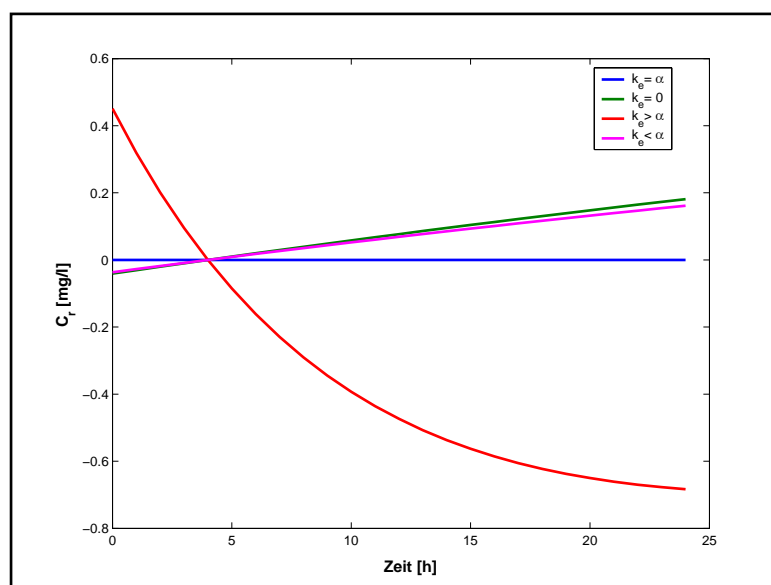


Abbildung 3.22: Berechnete Konzentrations-Zeit-Verläufe von C_r in Abhängigkeit von α ; C_r = Konzentration, die die adaptive Resistenz auslöst, α = Rate, die die abnehmende adaptive Resistenz beschreibt

Die blaue Gerade zeigt den Spezialfall, in dem k_e und α gleich groß sind. C_r ist während des gesamten Zeitverlaufs konstant null, und die maximale Absterberate, die durch den Term $(K_1 \cdot (1 - C_r / IC_{50} + C_r) + K_2)$ beschrieben wird, reduziert sich auf $K_1 + K_2$. Ist $k_e = 0$ oder $k_e < \alpha$, dann ist C_r in den ersten 4 Stunden des Experiments negativ, und wird nach 4 Stunden positiv. Aufgrund des initialen Zeitfaktors für die Wachstumsverzögerung t_{lag} , der 4 Stunden beträgt, ist C_r zu diesem Zeitpunkt immer null. Bei kleinen positiven und kleinen negativen Werten reduziert sich die maximale Absterberate auf den Term $K_1 + K_2$. Die rote Kurve in Abbildung 3.22 beschreibt die Veränderung von C_r für den Fall, dass $k_e > \alpha$ ist. C_r ist in den ersten 4 Stunden positiv, und wird nach Stunde 4 negativ. Bei großen negativen oder großen positiven Werten von C_r reduziert sich die maximale Absterberate auf K_1 .

3.6.8 Modell „Mouton“

Mouton [Mouton 2003] entwickelte ein mathematisches Modell (Gleichung 1.11), das die Vorhersage der Wirkung von konstanten Meropenem- und Tobramycinkonzentrationen in der Batchkultur gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht. Der Versuch, mit dem Modell „Mouton“ das Absterbeverhalten von *E. coli* gegenüber konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur vorherzusagen ist in Abbildung 2.23 dargestellt. Für die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten wurden die in Abschnitt 3.6.1.1 ermittelten Parameterstartwerte für N_{max} , μ_{max} (für den Parameter μ), E_{max} (für den Parameter k_{max}) und EC_{50} verwendet. Für n wurde ein Startwert von 1 verwendet, nachdem mehrere Startwerte getestet wurden. Zunächst wurde nur der Parameter n für die Optimierung freigegeben, danach folgten k_{max} und EC_{50} und dann μ . Nach der Anpassung wurde die geringste Standardabweichung der Residuen von $S=2,15$ bei den Parametern $\mu=1,29$ [h^{-1}], $k_{max}=15,16$ [h^{-1}], $EC_{50}=5,24$ [MHK] und $n=0,92$ [h^{-1} MHK $^{-1}$] berechnet. N_{max} wurde für die Anpassung bei $10^{9,04}$ [KBE/mL] konstant gehalten.

Die berechneten Kurven mit dem Modell „Mouton“ weichen bei allen Konzentrationen, mit Ausnahme der Wachstumkontrolle, systematisch und dauerhaft von den experimentellen Daten ab. Bei den höheren Konzentrationen (16-x und 32-x MHK) kann nur der vordere Teil der Absterbekurven von *E. coli* mit Hilfe des Modells beschrieben werden. Das Modell ermöglicht aber weder die Vorhersage der initialen Abtötung bei geringeren Konzentrationen, noch das Wiederanwachsen der Bakterien nach 24 h.

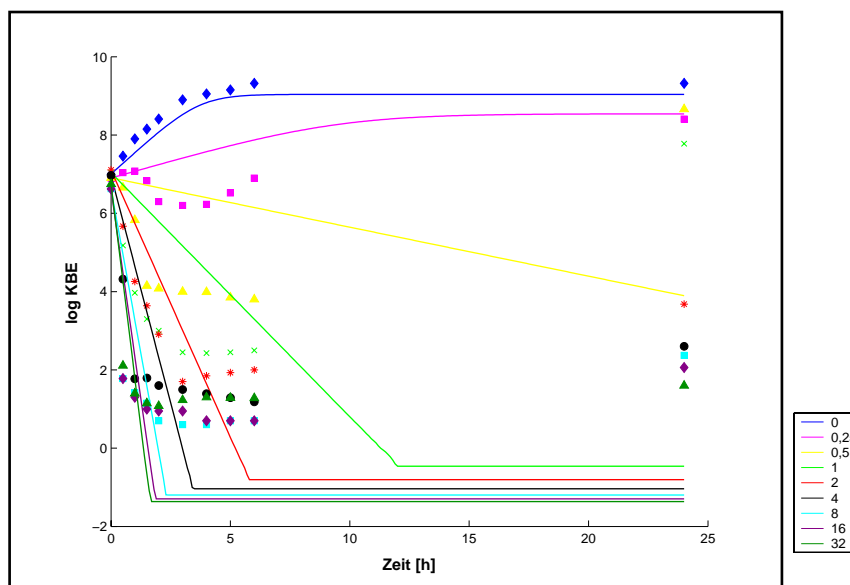


Abbildung 3.23: Experimentell bestimmte (Symbole) und mit dem Modell „Mouton“ berechnete (-) Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

3.6.9 Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ ist eine Weiterentwicklung des Modells „Heterogene Population“. Die Annahmen, die im Modell „Heterogene Population“ gemacht wurden, werden im Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ im wesentlichen übernommen. Einige Annahmen wurden leicht verändert bzw. neue Terme zusätzlich integriert. Aus diesem Grund werden alle Annahmen des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ noch einmal aufgelistet.

3.6.9.1 Annahmen des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“

1. Die bakterielle Gesamtpopulation N_{total} besteht aus den zwei Teilpopulationen N_1 und N_2 :

$$N_{total} = N_1 + N_2 \quad (3.16)$$

2. Die Wachstumsraten μ und die Absterberaten k sind Funktionen der Antibiotikumkonzentration C :

2.a Die Wachstumsrate $\mu_1(C)$ der Teilpopulation N_1 nimmt zum einem mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell ab, und ist zum anderen abhängig von N , wobei die spezifische Wachstumsrate mit Erreichen von N_{\max} auf null sinkt (logistisches Wachstum):

$$\mu_1(C) = \mu_{\max 1} \cdot e^{-a_1 \cdot c} \cdot \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}} \right) \quad (3.17)$$

2.b Die Absterberate $k_1(C)$ der Teilpopulation N_1 steigt mit steigender Antibiotikumkonzentration zunächst an, sättigt sich aber bei höherer Konzentration. Während des Experiments adaptieren sich die Bakterien an die Antibiotikumkonzentration, diese Adaptierung führt zur exponentiellen Abnahme der wirksamen Konzentration mit der Rate h :

$$k_1(C) = \frac{E_{\max} \cdot C \cdot e^{-h \cdot t}}{EC_{50} + C \cdot e^{-h \cdot t}} \quad (3.18)$$

2.c Die Wachstumsrate $\mu_2(c)$ der Teilpopulation N_2 nimmt mit steigender Antibiotikumkonzentration exponentiell ab, dabei sind $\mu_{\max 2}$ und a_2 kleiner als $\mu_{\max 1}$ und a_1 . Das Wachstum von N_2 wird ebenso wie N_1 durch N_{\max} begrenzt:

$$\mu_2(C) = \mu_{\max 2} \cdot e^{-a_2 \cdot c} \cdot \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}} \right) \quad (3.19)$$

2.d Die Teilpopulation N_2 stirbt nicht.

$$k_2(C) = 0 \quad (3.20)$$

3. Die Teilpopulation N_2 liegt ohne Einwirkung eines Antibiotikums nur zu einem sehr geringen Anteil in der Gesamtpopulation N_{total} vor (der Anteil von N_2 in N_{total} wurde experimentell in Abschnitt 3.6.4.2 ermittelt). Das Verhältnis v beschreibt den Anteil der Teilpopulation N_1 zur Teilpopulation N_2 .

$$\begin{aligned} N_1 &\sim 1 \cdot N_{total} \\ N_2 &\sim 5,4 \cdot 10^{-5} \cdot N_{total} \\ v &= \frac{N_1}{N_2} \end{aligned} \quad (3.21)$$

Somit ergibt sich die Änderung der Bakterienpopulation N_1 aufgrund des Wachstums und des Sterbens der Bakterien wie folgt:

$$\frac{dN_1}{dt} = \left(\mu_{\max 1} \cdot e^{-a_1 \cdot c} \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}} \right) - \frac{E_{\max} \cdot C \cdot e^{-h \cdot t}}{EC_{50} + C \cdot e^{-h \cdot t}} \right) \cdot N_1 \quad (3.22)$$

Die Änderung der Bakterienpopulation N_2 ändert sich aufgrund des Wachstums, das aber langsamer ist als das Wachstum der Bakterienpopulation N_1 , wie folgt:

$$\frac{dN_2}{dt} = \mu_{\max 2} \cdot e^{-a_2 \cdot c} \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}} \right) \cdot N_2 \quad (3.23)$$

3.6.9.2 Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“

Parameterabschätzung für das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“

Aufgrund der veränderten Annahmen des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ erfolgte eine erneute Abschätzung der Parameter E_{\max} , EC_{50} und h . Der Anfangsbereich (0 bis 3 Stunden) der Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von verschiedenen konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur wurde für die Anpassung der Absterberate $k_1(C)$ (Gleichung 3.18) an die experimentellen Daten verwendet. Als Startwerte für E_{\max} und EC_{50} dienten die in Abschnitt 3.6.1.1 ermittelten Größen.

Nachdem verschiedene Startwerte für h getestet wurden, wurde ein Startwert von 2 verwendet, da in diesem Fall die Standardabweichung der Residuen am kleinsten war ($S=0,97$).

Das Ergebnis der Parameteroptimierung, das in Abbildung 3.24 dargestellt ist, lieferte für E_{\max} einen Wert von 11,58 [h^{-1}], für EC_{50} und h wurden Werte von 0,22 [MHK] und 2,77 [h^{-1}] berechnet. Dieser Parametersatz erlaubte nur bei der Konzentration von 16-x MHK eine Anpassung an den Anfangsbereich der experimentell ermittelten Absterbekurven. Bei allen anderen Konzentrationen weichen die Messungen systematisch von den berechneten Kurvenverläufen ab.

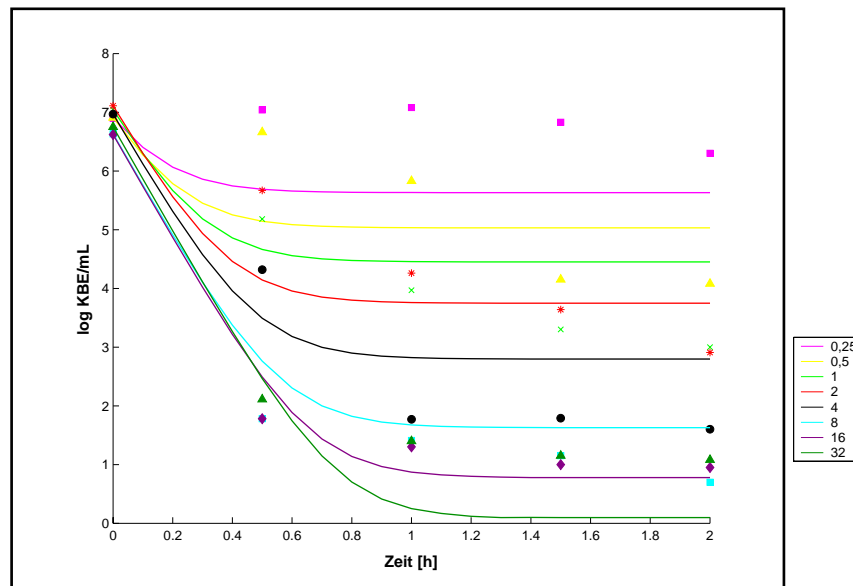


Abbildung 3.24: Experimentell ermittelte (Symbole) und berechnete (-) Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur aufgrund der Absterberate $k(c)$ zur Ermittlung der Parameter E_{\max} , EC_{50} und h ; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentration als Vielfaches der MHK

Der ansteigende Teil (3 – 24 Stunden) der Absterbekurven von *E. coli*, bei den Ciprofloxacin-Konzentrationen von 1-x bis 32-x MHK, wurde zur Ermittlung der Parameter $\mu_{\max 2}$ und a_2 herangezogen. Die Absterbekurven von *E. coli* bei geringeren Konzentrationen als 1-x MHK wurden nicht herangezogen, da bei diesen Kurven auch N_1 für das Wiederanwachsen der Kurven verantwortlich ist. Bei den verwendeten Konzentrationen beschreibt dieser Teil der Absterbekurve nur das Wachstum der Teilpopulation N_2 (siehe auch Abbildung 3.26 (b)). Dabei wurde der Term $(1-N_{\text{total}}/N_{\text{max}})$, der verantwortlich ist für das logistische Wachstum der Bakterien, nicht berücksichtigt, da die maximale Keimzahl bei den verwendeten Absterbekurven nicht erreicht wird. Verschiedene Startwerte wurden für die Anpassung der Wachstumsrate an die experimentellen Daten verwendet. Die geringste Standardabweichung der Residuen von $S=0,47$ wurde bei den Parametergrößen von $\mu_{\max 2}=1,28 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ und $a_2=0,82 \text{ [h}^{-1} \text{MHK}^{-1}\text{]}$ berechnet (Startwerte: $\mu_{\max 2}=0,9 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, $a_2=0,5 \text{ [h}^{-1} \text{MHK}^{-1}\text{]}$). Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Bei den höheren Konzentrationen (8 – 32-x MHK) kann der optimierte Parametersatz das Wiederanwachsen der Bakterien nicht beschreiben, während bei den geringeren Konzentrationen (1 – 4-x MHK) der berechnete Kurvenverlauf dem Wiederanwachsen der Bakterien in etwa entspricht.

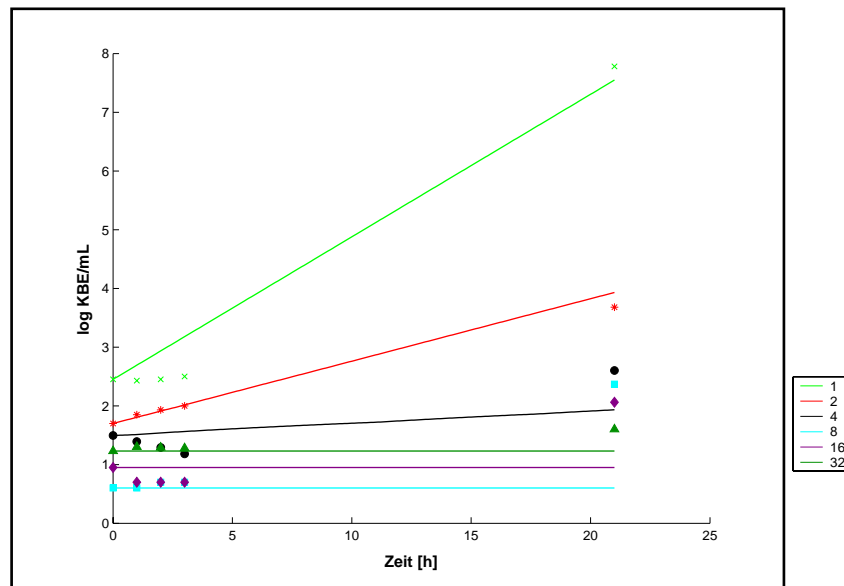


Abbildung 3.25: Experimentell ermittelte (Symbole) und berechnete (-) Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur aufgrund der Wachstumsrate $\mu_2(C)$ der Teilpopulation N_2 zur Ermittlung der Parameter $\mu_{\max 2}$, a_2 ; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentration als Vielfaches der MHK

Modellanpassung

Die Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ an die experimentellen Daten erfolgte mit den oben abgeschätzten Parameterstartwerten ($E_{\max}=11,58$ [h^{-1}], $EC_{50}=0,22$ [MHK], $h=2,77$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,28$ [h^{-1}], $a_2=0,82$ [h^{-1} MHK $^{-1}$]). Für $\mu_{\max 1}$ und N_{\max} wurden die in Abschnitt 3.6.1.1 ermittelten Werte von $1,50$ [h^{-1}] und $10^{9,04}$ [KBE/mL] herangezogen, und für a_1 wurde ein Startwert von 3 [h^{-1} MHK $^{-1}$] gewählt. Für die Anpassung wurde zunächst nur a_1 freigegeben, alle anderen Parameter wurden konstant gehalten.

Anschließend wurden nach jeder Anpassung die Parameter in der folgenden Reihenfolge freigegeben: a_2 , h , E_{\max} und EC_{50} , $\mu_{\max 2}$, $\mu_{\max 1}$ und v . N_{\max} wurde als einziger Parameter nicht zur Optimierung freigegeben. Das Ergebnis der Optimierung ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Die Parameter wurden wie folgt bestimmt: $\mu_{\max 1}=1,97$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,38$ [h^{-1}]; $E_{\max}=25,59$ [h^{-1}], $EC_{50}=3,23$ [MHK], $a_1=3,58$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,88$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,29$ [h^{-1}] und $v=5,50$, und die Standardabweichung der Residuen reduzierte sich auf $S=0,463$. Je geringer die Anzahl der Parameter ist (nur wenige Parameter können optimiert werden), desto robuster ist die Modellanpassung, d. h. die Anpassung führte zum gleichen Ergebnis, auch wenn andere Größenordnungen der Startwerte verwendet werden. Je mehr Parameter optimiert werden müssen, desto höher ist die Dimension des Suchraums. Beim letzten Optimierungsschritt, in dem

8 Parameter optimiert werden müssen, führte eine Optimierung mit völlig anderen Startwerten (Abweichung von 100 %) als den oben angegebenen auch zu einem anderen Optimierungsergebnis und zu einer größeren Standardabweichung der Residuen.

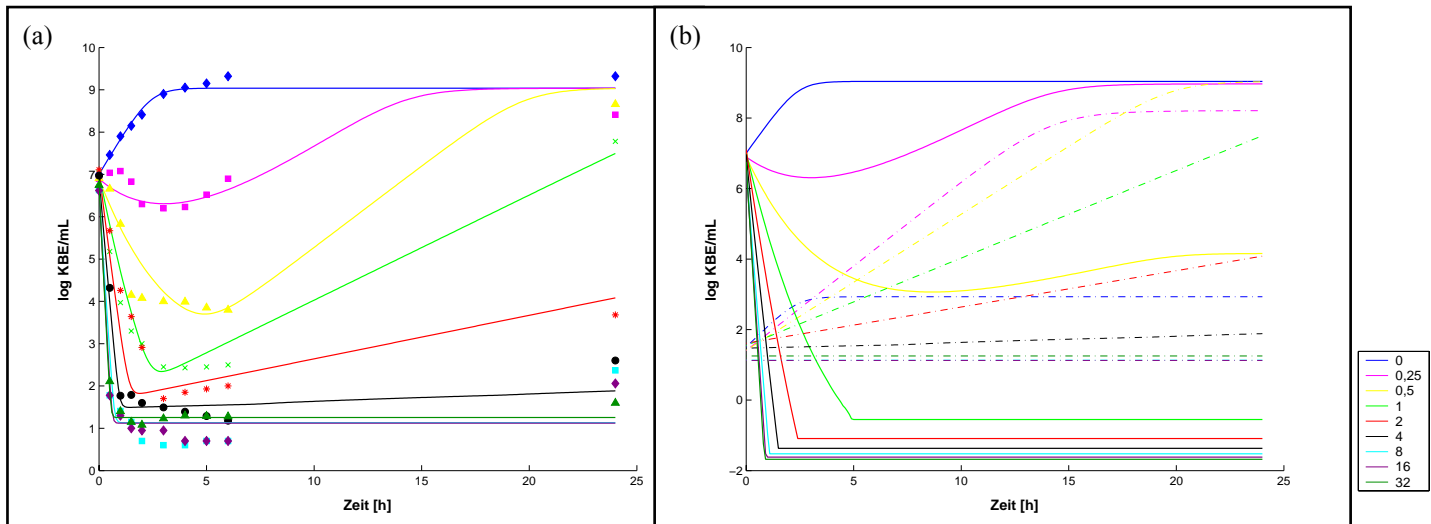


Abbildung 3.26: (a) Experimentell ermittelte und mit dem Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnete Absterbekinetiken von *E. coli* unter Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; (b) Berechnetes Absterbeverhalten der Teilpopulationen N_1 und N_2 ; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Abbildung 3.26 (a) zeigt die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten. Die Optimierung zeigt eine gute Anpassung an die experimentellen Daten bei geringen Ciprofloxacinkonzentrationen (0,25 – 8-x MHK) und hohen Zellzahlen. Dagegen zeigen die berechneten Kurvenverläufe für 16-x und 32-x MHK keine gute Anpassung an den unteren Bereich der Zellzahlen (1 und 10 KBE/mL). Abbildung 3.26 (b) zeigt die Veränderung des „Absterbeverhaltens“ der beiden Teilpopulationen N_1 und N_2 . Die Teilpopulation N_1 stirbt in Anwesenheit des Antibiotikums, bei geringeren Konzentrationen (0,25 und 0,5-x MHK) ist aber ein Wiederanwachsen von N_1 zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen (0,5 – 4-x MHK) wächst nur die Teilpopulation N_2 wieder an. Ab einer Konzentration von 8-x MHK zeigt auch N_2 kein Wachstum mehr.

3.6.9.3 Verallgemeinerung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ ermöglicht eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* gegenüber konstanten Ciprofloxacin-konzentrationen in der Batchkultur. Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob dieses Modell auch das Absterbeverhalten von *E. coli* gegenüber den Antibiotika Moxifloxacin, Tobramycin und Ampicillin, und ob das Modell auch das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur beschreiben kann. Dabei wurden die im letzten Abschnitt ermittelten Parametergrößen ($\mu_{\max 1}=1,97$ [h⁻¹], $\mu_{\max 2}=1,38$ [h⁻¹]; $E_{\max}=25,59$ [h⁻¹], $EC_{50}=3,23$ [MHK], $a_1=3,58$ [h⁻¹ MHK⁻¹], $a_2=0,88$ [h⁻¹ MHK⁻¹], $h=0,29$ [h⁻¹] und $v=5,50$) als Startwerte für die Anpassung verwendet. N_{\max} wurde bei der Optimierung des Absterbeverhaltens von *E. coli* immer konstant gehalten bei $10^{9,04}$ [KBE/mL]. Dabei wurden nicht wie bisher die Parameter schrittweise zur Optimierung freigegeben, sondern alle Parameter wurden gleichzeitig für die Optimierung freigegeben, da die Größenordnung der Parameter sich nicht ändern sollte.

3.6.9.3.1 *Escherichia coli* – Ciprofloxacin

Zunächst erfolgte noch einmal die Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ an die experimentell ermittelten Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur. Da bislang für die Entwicklung des Modells vereinfachte experimentelle Daten verwendet wurden (siehe Abschnitt 3.4), erfolgte nun die Anpassung des Modells an die Originaldaten von *E. coli*. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

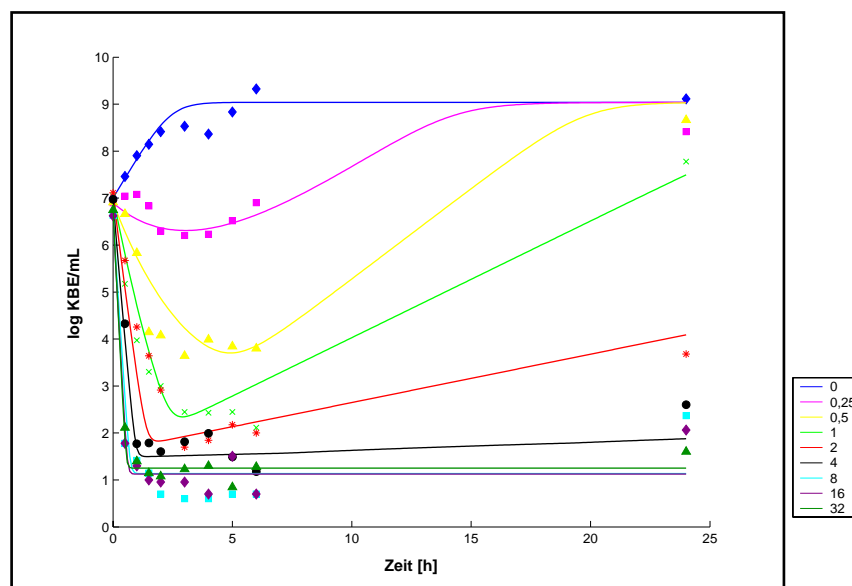


Abbildung 3.27: Experimentell ermittelten Originaldaten und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentration als Vielfaches der MHK

Durch die Optimierung veränderten sich die Parameter nur geringfügig, die geringste Standardabweichung der Residuen von $S=0,484$ wurde bei den Parametergrößen $\mu_{\max 1}=1,97$ [\log KBE/mL h], $\mu_{\max 2}=1,35$ [h^{-1}]; $E_{\max}=25,85$ [h^{-1}], $EC_{50}=3,21$ [MHK], $a_1=3,67$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,88$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,30$ [h^{-1}] und $v=5,47$ berechnet. Es ist kein Unterschied zwischen dem berechneten Absterbeverhalten in Abbildung 3.26 (a) und 3.27 zu erkennen. Der Unterschied zeigt sich nur durch die etwas größere Standardabweichung der Residuen.

3.6.9.3.2 *Escherichia coli* – Moxifloxacin

Die Übertragung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Moxifloxacinkonzentrationen in der Batchkultur ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Nach der Anpassung wurde eine Standardabweichung der Residuen von $S=0,478$ bei den Parametergrößen $\mu_{\max 1}=3,25$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,97$ [h^{-1}], $E_{\max}=34,39$ [h^{-1}], $EC_{50}=5,62$ [MHK], $a_1=0,20$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,72$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,09$ [h^{-1}] und $v=5,28$ berechnet.

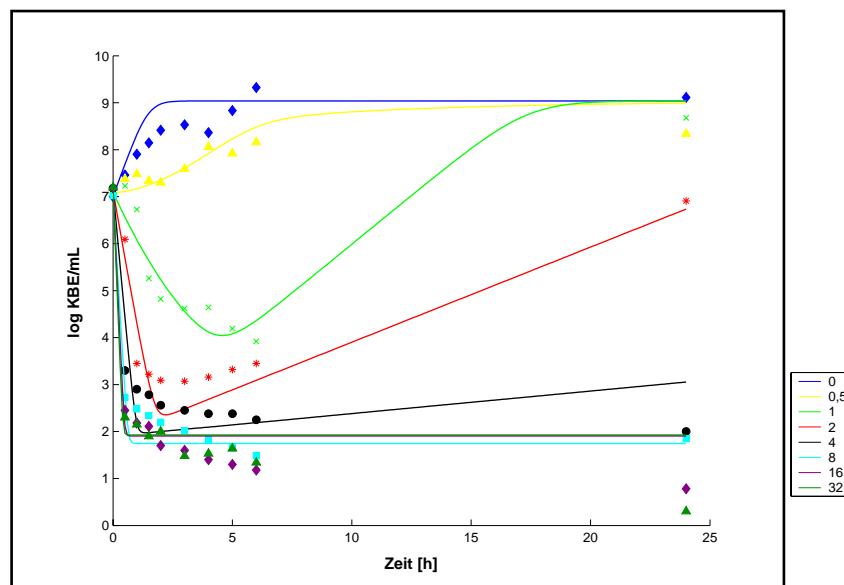


Abbildung 3.28: Experimentell ermitteltes und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Moxifloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Moxifloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Die Parameter von $\mu_{\max 1}$, $\mu_{\max 2}$, E_{\max} , EC_{50} sind im Vergleich zu den Parametern für Ciprofloxacin größer. $\mu_{\max 1}$ ist um den Faktor 1,65 und EC_{50} ist um den Faktor 1,75 größer als bei Ciprofloxacin. Dagegen sind die Parameter a_1 , a_2 und h kleiner als bei Ciprofloxacin. Die Standardabweichung der Residuen ist etwa gleich geblieben. Geringere Konzentrationen (0,5 –

2-x MHK) und höhere Keimzahlen zeigen eine bessere Anpassung des Modells an die experimentell ermittelten Daten.

3.6.9.3.3 *Escherichia coli* – Tobramycin

Abbildung 3.29 zeigt die Übertragung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Tobramycinkonzentrationen in der Batchkultur. Die verwendete Methode benötigt für die Anpassung zu jedem Zeitpunkt und bei jeder Konzentration einen Meßpunkt, damit ein Fehlerquadrat und somit die Standardabweichung der Residuen berechnet werden kann. Unter Einwirkung der 32-fachen MHK fiel ab Stunde 4 die Keimzahl von *E. coli* unter die Nachweisgrenze. Deshalb wurden für die Zeitpunkte 4, 5, 6, und 24 h Meßpunkte hinzugefügt, die eine möglichst kleine Keimzahl besitzen sollten. Deshalb wurde eine Keimzahl von 0,1 [log KBE/mL] für diese Meßpunkte gewählt. Nach der Anpassung wurde eine Standardabweichung der Residuen von $S=0,544$ bei den Parametergrößen $\mu_{\max 1}=2,14$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,04$ [h^{-1}]; $E_{\max}=13,11$ [h^{-1}], $EC_{50}=6,17$ [MHK], $a_1=1,71$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,23$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,33$ [h^{-1}] und $v=6,37$ berechnet.

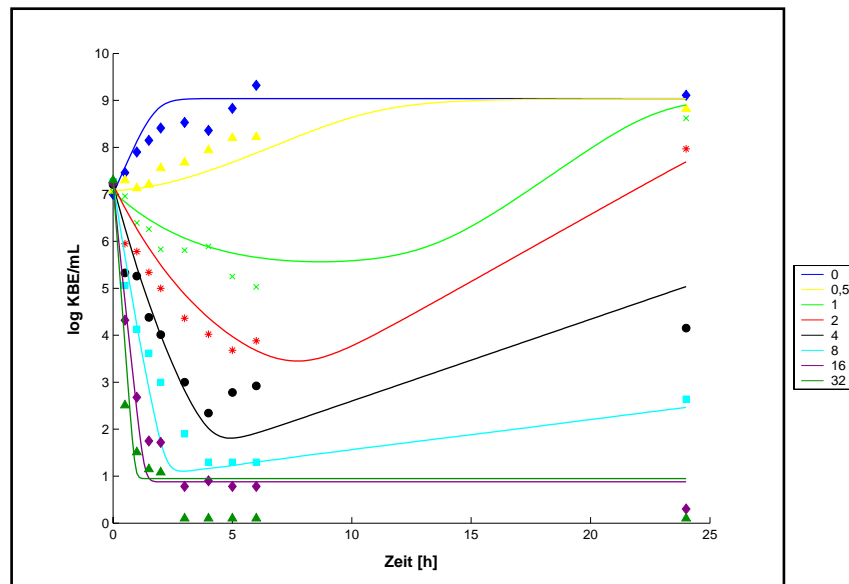


Abbildung 3.29: Experimentell ermitteltes und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Tobramycinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Tobramycinkonzentration als Vielfaches der MHK

Der Wert von $\mu_{\max 1}$ liegt zwischen dem für Ciprofloxacin und Moxifloxacin. Dagegen ist E_{\max} bei Tobramycin um den Faktor 1,97 kleiner als bei Ciprofloxacin und um den Faktor 2,62 kleiner

als bei Moxifloxacin, während EC_{50} größer ist bei Tobramycin. Die Standardabweichung der Residuen ist etwas größer als bei Ciprofloxacin und bei Moxifloxacin. Werden jedoch die Daten für die 32x-fache MHK bei der Anpassung nicht berücksichtigt, kann die Standardabweichung auf $S=0,402$ reduziert werden.

3.6.9.3.4 *Escherichia coli* – Ampicillin

Die Übertragung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ampicillinkonzentrationen in der Batchkultur ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

Nach der Anpassung wurde eine Standardabweichung der Residuen von $S=0,436$ bei den Parametergrößen $\mu_{max1}=2,41$ [h^{-1}], $\mu_{max2}=1,32$ [h^{-1}]; $E_{max}=27,97$ [h^{-1}], $EC_{50}=11,97$ [MHK], $a_1=1,42$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,59$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=-0,58$ [h^{-1}] und $v=4,4$ berechnet.

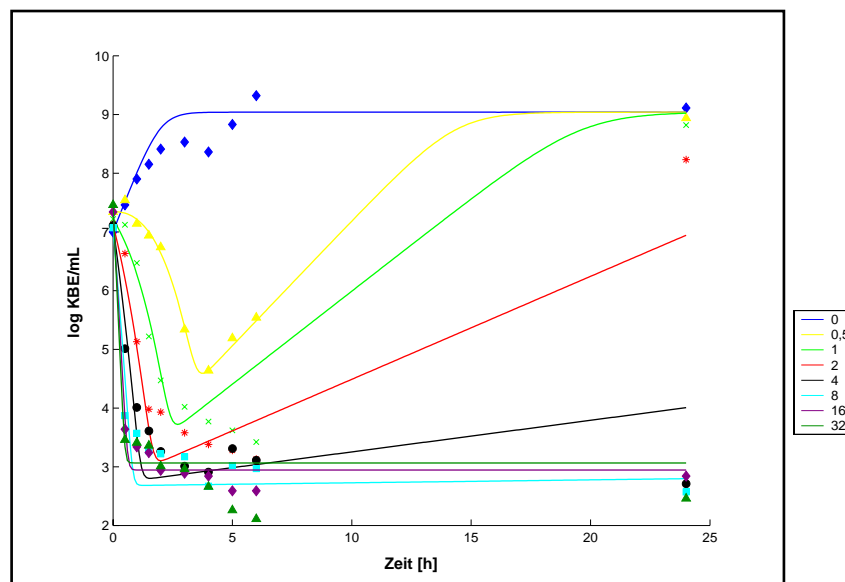


Abbildung 3.30: Experimentell ermitteltes und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ampicillinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ampicillinkonzentration als Vielfaches der MHK

Bei den Parametern für Ampicillin ist auffällig, dass im Vergleich zu Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tobramycin der EC_{50} -Wert fast doppelt so hoch ist, der maximale Effekt aber ähnlich ist (mit Ausnahme von Tobramycin). Der Parameter h , der für die Adaptierung der Population N_1 an das Antibiotikum verantwortlich ist, ist negativ, d.h. die Adaptierung der Population N_1 wird zunehmend empfindlicher gegenüber dem Antibiotikum. Ähnlich wie bei Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tobramycin findet eine gute Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ an das Absterbeverhalten von *E. coli* bei geringen

Ampicillinkonzentrationen (0,5 – 4-x MHK) und höheren Zellzahlen statt. Die Anpassung des Modells an das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von hohen Ampicillinkonzentrationen und bei geringeren Zellzahlen ist dagegen schlechter.

3.6.9.3.5 *Staphylococcus aureus* – Ciprofloxacin

Abbildung 3.31 zeigt die Übertragung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur. Für die Berechnung der maximalen Bakterienzahl N_{\max} in der bakteriellen Kultur von *S. aureus* wurde Gleichung (3.1), die das Wachstum einer bakteriellen Kultur ohne Antibiotikum beschreibt, an die Wachstumskontrolle von *S. aureus* angepaßt. Für die restlichen Parameter wurden folgende Startwerte verwendet: $\mu_{\max 1}=1,97$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,38$ [h^{-1}]; $E_{\max}=25,59$ [h^{-1}], $EC_{50}=3,23$ [MHK], $a_1=3,58$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,88$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,29$ [h^{-1}] und $v=5,50$. Durch die Anpassung wurde die Standardabweichung der Residuen auf $S=0,619$ reduziert bei den folgenden Parametergrößen: $\mu_{\max 1}=5,63$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,02$ [h^{-1}], $E_{\max}=9,24$ [h^{-1}], $EC_{50}=6,75$ [MHK], $a_1=0,58$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=1,73$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $h=0,15$ [h^{-1}] und $v=4,67$.

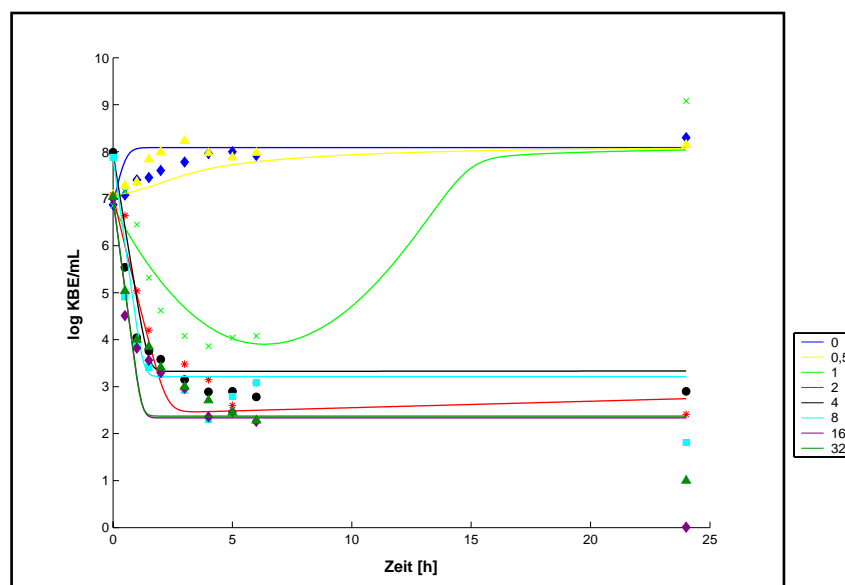


Abbildung 3.31: Experimentell ermittelte und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnetes Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Die Standardabweichung der Residuen ist nach der Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ an das Absterbeverhalten von *S. aureus* um den Faktor 1,28 größer

im Vergleich zur Standardabweichung der Residuen nach der Anpassung des Modells an das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin. Dies ist auch erkennbar beim Vergleich des berechneten Absterbeverhaltens von *S. aureus* in Abbildung 3.31 mit dem berechneten Absterbeverhalten von *E. coli* in Abbildung 3.27. Desweiteren fällt der große μ_{\max} Wert auf, der im Vergleich zu *E. coli* um den Faktor 2,86 größer ist, obwohl beim Vergleich der Wachstumskontrollen auffällt, dass die Wachstumsrate von *S. aureus* kleiner ist als die Wachstumsrate von *E. coli*. Die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten zeigt, dass auch hier bei geringeren Konzentrationen und höheren Zellzahlen eine bessere Anpassung des Modells möglich ist als bei hohen Konzentrationen und geringeren Zellzahlen.

3.6.9.4 Anwendung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten im in-vitro Modell

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ ermöglicht eine approximative Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* gegenüber konstanten Antibiotikakonzentrationen in der Batchkultur. Es wurde untersucht, ob die Simulation des Modells das Absterbeverhalten von *E. coli* und von *S. aureus* im Falle von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen, wie im in-vitro Modell gegeben, berechnen kann.

Dabei wurde das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ in der Weise verändert, dass der Term ($e^{-h \cdot t}$) in Gleichung (3.18), der die Adaptierung der Teilpopulation N_1 an das Antibiotikum beschreibt, entfernt wurde. Die Entfernung des Adaptierungsterms verringert die Anzahl der Parameter in dem Modell.

Die Abnahme des Antibiotikums mit der Zeit wird in das Modell integriert. Denn durch die Verdünnung der Konzentration des Antibiotikums im Versuchsgefäß mit konstanter Rate ergibt sich ein experimenteller Abfall der Konzentration. Diese Variante des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ wird in dem folgenden Abschnitt „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ genannt.

***Escherichia coli* – Ciprofloxacin**

Die in Abschnitt 3.6.9.2 ermittelten Parametergrößen $\mu_{\max 1}=1,97$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=1,38$ [h^{-1}], $E_{\max}=25,59$ [h^{-1}], $EC_{50}=3,23$ [MHK], $a_1=3,58$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,88$ [h^{-1} MHK $^{-1}$] und $v=5,50$ wurden als Startwerte für die Anpassung verwendet. $N_{\max}=10^{9,04}$ [KBE/mL] und $k_d=0,17$ [h^{-1}] (Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von Ciprofloxacin im in-vitro Modell) wurde bei der Optimierung des Absterbeverhaltens von *E. coli* immer konstant gehalten. Zunächst wurde nur

a_1 , dann a_2 , danach E_{\max} und EC_{50} , dann $\mu_{\max 1}$ und $\mu_{\max 2}$, und zum Schluß v zur Anpassung freigegeben. Dabei konnte die Standardabweichung der Residuen auf $S=1,59$ reduziert werden. Nach der Anpassung wurde die geringste Standardabweichung der Residuen bei den Parametergrößen $\mu_{\max 1} = -1,18 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, $\mu_{\max 2} = 19,16 \text{ [h}^{-1}\text{]}$; $E_{\max} = 65,33 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, $EC_{50} = 66,51 \text{ [MHK]}$, $a_1 = 3,56 \text{ [h}^{-1} \text{MHK}^{-1}\text{]}$, $a_2 = 0,98 \text{ [h}^{-1} \text{MHK}^{-1}\text{]}$ und $v = 5,96$ berechnet. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

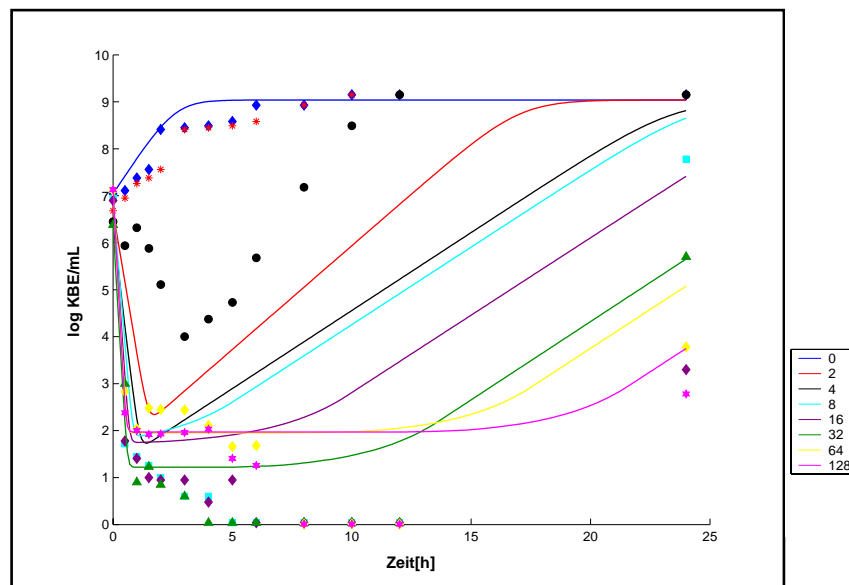


Abbildung 3.32: Experimentell bestimmtes und berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* unter Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“, Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Die berechneten Absterbekurven von *E. coli* mit dem Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ weichen so systematisch von den experimentell ermittelten Absterbekurven ab, dass nicht einmal der Trend richtig wiedergegeben wird. Die schlechte Anpassung des Modells an die Daten wird deutlich durch die hohe Standardabweichung der Residuen von $S=1,59$. Die Wachstumskontrolle kann wie zu erwarten mittels des Modells beschrieben werden.

Da auch die Annahmen des Modells „Yano“ auf die Bedingungen im in-vitro Modell übertragen werden können, wurde auch das Modell „Yano“ herangezogen um das Absterbeverhalten von *E. coli* nach abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell zu beschreiben. Für die Optimierung wurden die publizierten Parameterstartwerte für $\beta = 1,39 \times 10^{-9} \text{ [KBE/mL]}$, $k_{\max} = 8,708 \text{ [KBE/mL]}$ und $KC_{50} = 0,019 \text{ [mg/L]}$ verwendet [Yano *et al.* 1998]. Zunächst wurden k_{\max} und KC_{50} , und dann β für die Optimierung freigegeben. $B_{\max} = 10^{9,04} \text{ [KBE/mL]}$, $k_1 = 0,0012$

$[\text{h}^{-1}]$, $k_2=0,532 [\text{h}^{-1}]$ und $k_d=0,17 [\text{h}^{-1}]$ wurden bei der Anpassung konstant gehalten. Durch die Anpassung konnte die Standardabweichung der Residuen auf 1,54 reduziert werden, die Parametergrößen änderten sich wie folgt: $\beta=21,42 \times 10^{-9} [\text{KBE}/\text{mL}]$, $k_{\max}=41,57 [\text{KBE}/\text{mL}]$ und $\text{KC}_{50}=1,43 [\text{mg}/\text{L}]$. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.33 dargestellt.

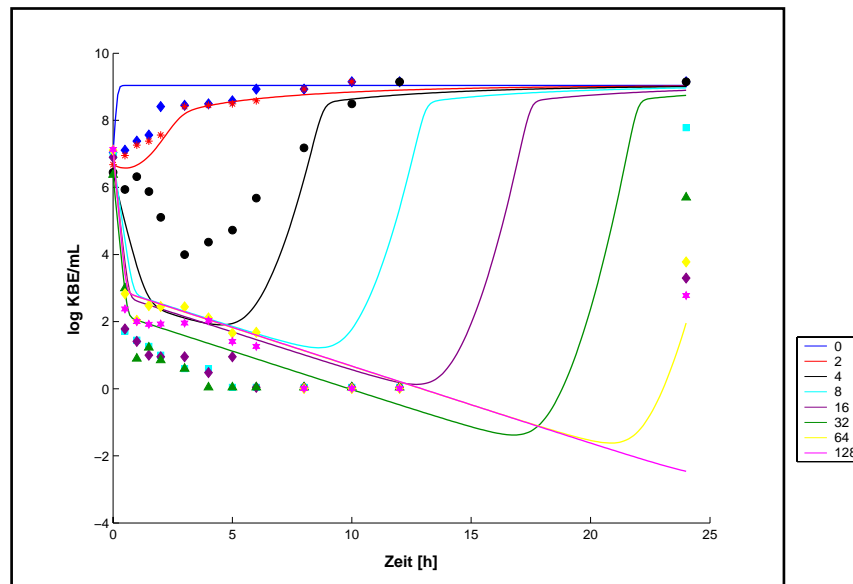


Abbildung 3.33: Experimentell bestimmtes und mit Hilfe des Modells „Yano“ berechnetes Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacin-Konzentrationen im in-vitro Modell; Legende: eingesetzte Ciprofloxacin-Konzentration als Vielfaches der MHK

Die berechneten Absterbekurven von *E. coli* im Falle des Modells „Yano“ zeigen, wie im Falle des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“, eine ausgeprägte systematische Abweichung von den experimentell bestimmten Daten. Die Standardabweichung der Residuen von 1,54 ist nur unwesentlich kleiner als im Falle von Abbildung 3.32.

***Staphylococcus aureus* – Ciprofloxacin**

Für die Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ an das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacin-Konzentrationen im in-vitro Modell wurden die in Abschnitt 3.6.9.2 ermittelten Parametergrößen $\mu_{\max 1}=1,97 [\text{h}^{-1}]$, $\mu_{\max 2}=1,38 [\text{h}^{-1}]$, $E_{\max}=25,59 [\text{h}^{-1}]$, $\text{EC}_{50}=3,23 [\text{MHK}]$, $a_1=3,58 [\text{h}^{-1} \text{MHK}^{-1}]$, $a_2=0,88 [\text{h}^{-1} \text{MHK}^{-1}]$ und $v=5,50$ als Startwerte verwendet. $N_{\max}=10^{8,09} [\text{KBE}/\text{mL}]$ und $k_d=0,17 [\text{h}^{-1}]$ (Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von Ciprofloxacin im in-vitro Modell) wurde bei der Anpassung des Absterbeverhaltens von *S. aureus* immer konstant gehalten. Zunächst wurde nur a_1 , dann a_2 , danach E_{\max} und EC_{50} , dann $\mu_{\max 1}$ und $\mu_{\max 2}$, und zum Schluß wurde v zur

Anpassung freigegeben. Somit konnte die Standardabweichung der Residuen auf $S=0,886$ reduziert werden.

Die kleinste Standardabweichung der Residuen wurde bei den Parametergrößen $\mu_{\max 1}=1,33$ [h^{-1}], $\mu_{\max 2}=3,54$ [h^{-1}], $E_{\max}=1,21$ [h^{-1}], $EC_{50}=9,93$ [MHK], $a_1=4,02$ [h^{-1} MHK $^{-1}$], $a_2=0,86$ [h^{-1} MHK $^{-1}$] und $v=7,72$ berechnet. Die Erhöhung von N_{\max} auf 10^9 [KBE/mL] brachte keine Reduktion im Fehlerquadrat. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.34 dargestellt.

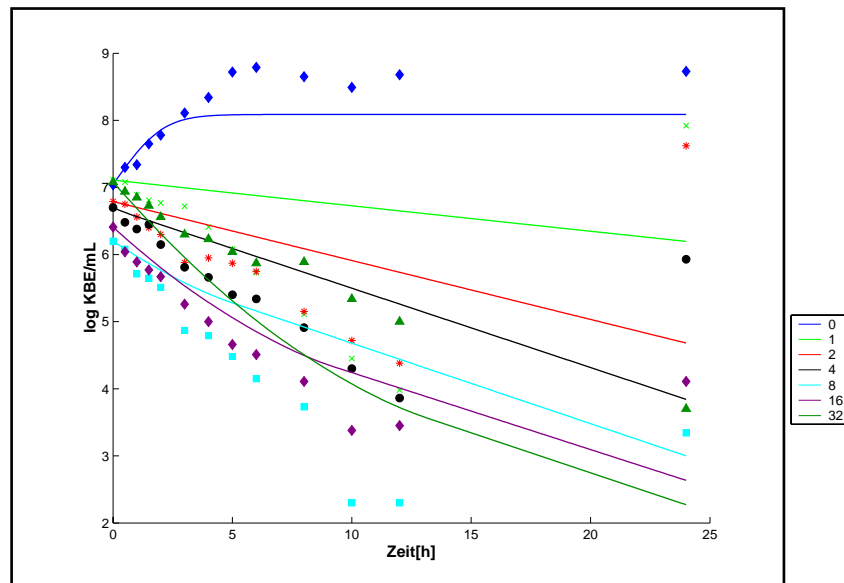


Abbildung 3.34: Experimentell bestimmtes und mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ berechnetes Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Im Vergleich zu *E. coli* lässt sich das Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ an das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell wesentlich besser anpassen (mit Ausnahme des 24 h Wertes). Die Standardabweichung der Residuen ist um den Faktor 1,7 kleiner als bei *E. coli*.

Eine bessere Anpassung an die experimentellen Daten ist mit Hilfe des Modells „Yano“ möglich. Die Anpassung des Modells mittels der publizierten Parametergrößen [Yano *et al.* 1998] als Startwerte reduzierte die Standardabweichung der Residuen auf 0,565. Dabei wurden für die Parameter folgende Größen berechnet: für $\beta=55,12 \times 10^{-9}$ [KBE/mL], $k_{\max}=7,24$ [KBE/mL] und $KC_{50}=0,02$ [mg/L] (Startwerte: $1,93 \times 10^{-9}$ [KBE/mL], 8,708 [KBE/mL], 0,019 [mg/L]). $B_{\max}=10^{8,09}$ [KBE/mL], $k_1=0,0012$ [h^{-1}], $k_2=0,532$ [h^{-1}] und $k_d=0,17$ [h^{-1}] wurden bei der Anpassung konstant gehalten. Die Erhöhung von B_{\max} auf 10^9 [KBE/mL] brachte keine

Reduktion in der Standardabweichung der Residuen. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 3.35 dargestellt.

Die Anpassung des Modells „Yano“ an die Wachstumskontrolle von *S. aureus* im in-vitro Modell ist aufgrund des hohen β -Wertes und des kleinen B_{\max} -Wertes unbefriedigend, allerdings wird bei Erhöhung des B_{\max} -Wertes und bei der Reduktion des β -Wertes die Gesamtanpassung des Modells an die Absterbekurven schlechter. Die Initialkonzentrationen von 1-x MHK bis 4-x MHK zeigen eine gute Anpassung des mathematischen Modells an die experimentellen Daten.

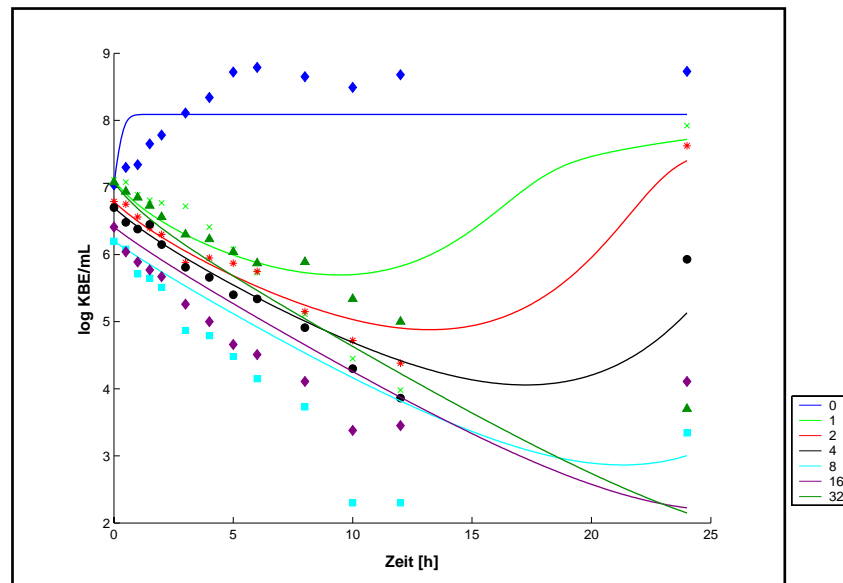


Abbildung 3.35: Experimentell bestimmtes und berechnetes Absterbeverhalten mit Hilfe des Modells „Yano“ von *S. aureus* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell; Legende: eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK

Die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten von *S. aureus* bei höheren Konzentrationen ist dagegen schlechter.

3.6.10 Modelle im Überblick

Tabelle 3.3 zeigt alle mathematischen Modelle noch einmal im Überblick. Damit ein Vergleich der mathematischen Modelle, der einzelnen Parameter und deren Größen möglich ist, wurden die Parameterbezeichnungen in den mathematischen Modellen vereinheitlicht. Tabelle 3.3 zeigt, dass die beste Anpassung an die Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur mit dem Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ möglich ist. Hier wurde die kleinste Standardabweichung der Residuen berechnet.

Tabelle 3.4 zeigt im Überblick die Anpassungsergebnisse für das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ nach der Anpassung an die experimentellen Absterbekinetiken von

E. coli und *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Tobramycin und Ampicillin in der Batchkultur. Die beste Anpassung, d. h. die kleinste Standardabweichung der Residuen erfolgte bei der Berechnung der Wirkung von Ampicillin auf *E. coli*.

Tabelle 3.3: Vergleich der mathematischen Modelle

MODELL	WACHSTUM			STERBEN	ABBAU	AUSTAUSCH	SONSTIGES	PARAMETER & FEHLERQUADRAT	
Nolting	$\frac{dN_{total}}{N_{total} dt} =$	μ_{max}		$-\left(\frac{E_{max} \cdot c}{EC_{50} + c}\right)$			$\cdot(1 - e^{-z \cdot t})$	μ_{max} E_{max} EC_{50}	0,545 [h ⁻¹] 12,15 [h ⁻¹] 5,82 [MHK]
	$\frac{dC}{dt} =$				0*			S	2,20
Heterogene Population	$\frac{dN_1}{N_1 dt} =$	μ_{max1}	$\cdot e^{-a \cdot c}$	$-\left(\frac{E_{max} \cdot c}{EC_{50} + c}\right)$				μ_{max1} a E_{max} EC_{50}	0,41 [h ⁻¹] 0,51 [h ⁻¹ MHK ⁻¹] 26,39 [h ⁻¹] 5,28 [MHK]
	$\frac{dN_2}{N_2 dt} =$	μ_{max2}	$\cdot e^{-a \cdot c}$					μ_{max2}	0,82 [h ⁻¹]
	$N_{total} =$						$N_1 + N_2$	S	0,72
	N_1 N_2						$\sim 1 \cdot N_{total}$ $\sim 5,4 \times 10^{-5} \cdot N_{total}$		
	$\frac{dC}{dt} =$					0†			

Tabelle 3.3: Vergleich der mathematischen Modelle

- Fortsetzung -

MODELL	WACHSTUM			STERBEN	AB-BAU	AUS-TAUSCH	SONSTIGES	Parameter & Fehlerquadrat	
	μ_{\max}	$e^{-a \cdot c}$						μ_{\max}	a
Alarmon	$\frac{dN_{total}}{N_{total} dt} =$	μ_{\max}	$e^{-a \cdot c}$	$-\left(\frac{E_{\max} \cdot c}{EC_{50} + c} \cdot F(A)\right)$				μ_{\max}	0,57 [h ⁻¹]
	$\frac{dA}{dt} =$						$\gamma \cdot \frac{E_{\max} \cdot c}{EC_{50} + c} \cdot F(A) \cdot N_{total}$	a	2,00 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]
	F(A)=1 F(A)=0						Für A < A _c Für A ≥ A _c	E _{max}	11,91 [h ⁻¹]
	$\frac{dC}{dt} =$				0 [†]			EC ₅₀	7,89 [MHK]
								γ	-0,01
								A _c	0,83
								S	2,28
YANO	$\frac{dN_1}{N_1 dt} =$	μ_{\max}	$\left(1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}}\right)$	$-\frac{E_{\max} \cdot c}{EC_{50} + c}$		$-r_1 + r_2 \cdot N_2 \cdot N_1$		μ_{\max}	1,65 [h ⁻¹]
	$\frac{dN_2}{N_2 dt} =$					$+r_1 \cdot N_2 \cdot N_1 - r_2$		N _{max}	1,21x1 ⁹ [KBE/mL]
	$\frac{dC}{dt} =$				$-k_d \cdot c$			E _{max}	26,16 [h ⁻¹]
	$N_{total} =$						$N_1 + N_2$	EC ₅₀	2,31 [MHK]
								r ₁	7,6x10 ⁻⁵ [h ⁻¹]
								r ₂	0,0034 [h ⁻¹]
								k _d	0,19 [h ⁻¹]
								S	0,480

Tabelle 3.3: Vergleich der mathematischen Modelle

- Fortsetzung -

MODELL		WACHSTUM			STERBEN	ABBAU	AUS- TAUSCH	SONSTIGES	Parameter & Fehlerquadrat	
MOUTON	$\frac{dN_{total}}{N_{total}dt} =$	μ_{max}		$\cdot \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{max}}\right)$	$-\left(\frac{E_{max} \cdot c^n}{EC_{50}^n + c^n}\right)$				μ_{max}	1,29 [h ⁻¹]
	$\frac{dC}{dt} =$					0^\ddagger			N_{max}	$10^{9,04}$ [KBE/mL]
									E_{max}	15,16 [h ⁻¹]
									EC_{50}	5,24
									n	0,92
									S	2,15
HETEROGENE POPULATION MIT ADAPTIERUNG	$\frac{dN_1}{N_1 dt} =$	μ_{max1}	$\cdot e^{-a_1 \cdot c}$	$\cdot \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{max}}\right)$	$-\left(\frac{E_{max} \cdot c \cdot e^{-h \cdot t}}{EC_{50} + c \cdot e^{-h \cdot t}}\right)$				μ_{max1}	1,97 [h ⁻¹]
	$\frac{dN_2}{N_2 dt} =$	μ_{max2}	$\cdot e^{-a_2 \cdot c}$	$\cdot \left(1 - \frac{N_{total}}{N_{max}}\right)$					μ_{max2}	1,38 [h ⁻¹]
	$\frac{dC}{dt} =$					0^\ddagger			N_{max}	$10^{9,04}$ [KBE/mL]
	$N_{total} =$ $v =$							$N_1 + N_2$ N_1 / N_2	E_{max}	5,59 [h ⁻¹]
								EC_{50}	3,23 [MHK]	
								a_1	3,58 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]	
								a_2	0,88 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]	
								h	0,29 [h ⁻¹]	
								v	5,5	
								S	0,463	

Tabelle 3.3: Vergleich der mathematischen Modelle

- Fortsetzung -

MODELL		WACHSTUM			STERBEN	ABBAU	AUS- TAUSCH	SONSTIGES	Parameter & Fehlerquadrat	
HETEROGENE POPULATION MIT Antibiotikum- abnahme [†]	$\frac{dN_1}{dt} =$	$\mu_{\max 1}$	$\cdot e^{-a_1 \cdot c}$	$\cdot (1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}}) \cdot N_1$	$-(\frac{E_{\max} \cdot c}{EC_{50} + c}) \cdot N_1$				$\mu_{\max 1}$	1,18 [h ⁻¹]
	$\frac{dN_2}{dt} =$	$\mu_{\max 2}$	$\cdot e^{-a_2 \cdot c}$	$\cdot (1 - \frac{N_{total}}{N_{\max}}) \cdot N_2$					$\mu_{\max 2}$	19,16 [h ⁻¹]
	$\frac{dC}{dt} =$						$-k_d \cdot c$		N_{\max}	10 ^{9,03} [KBE/mL]
	$N_{total} =$ $v =$								E_{\max}	65,33 [h ⁻¹]
								EC_{50}	66,51 [MHK]	
								a_1	3,56 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]	
								a_2	0,98 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]	
								k_d	0,17 [h ⁻¹ MHK ⁻¹]	
								v	5,96	
								$N_1 + N_2$	S	1,592
								N_1 / N_2		

*: für Piperacillin; †: für Ciprofloxacin; ‡: für Tobramycin und Meropenem; †: Modell wurde an die experimentell ermittelten Daten im in-vitro Modell angepaßt; Parametergrößen beziehen sich auf Anpassung des Modells an das Absterbeverhalten von *E. coli* im in-vitro Modell

N_{total} =gesamte Bakterienanzahl; N_1 =Bakterienanzahl der Teilpopulation N_1 ; N_2 = Bakterienanzahl der Teilpopulation N_2 ; t =Zeit; C =Konzentration des Antibiotikums; $\mu_{\max 1}$ =Wachstumsrate der Teilpopulation N_1 ; $\mu_{\max 2}$ =Wachstumsrate der Teilpopulation N_2 ; N_{\max} =maximale Bakterienanzahl in der Kultur (Kapazität); E_{\max} =maximaler Effekt; EC_{50} =Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist; a_1 =Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_1 ; a_2 =Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_2 ; h =Adaptierungsrate; v =Verhältnis der Teilpopulation N_1 zur Teilpopulation N_2 ; F =Fehlerquadrat; γ =Alarmonmenge pro toter Zelle; A_c =Schwellenwert der Alarmonkonzentration, die das Überleben der Bakterien ermöglicht; n =Hillfaktor; r_1 =Transferrate von der Teilpopulation N_1 zu N_2 ; r_2 =Transferrate von der Teilpopulation N_2 zu N_1 ; k_d =Eliminationsgeschwindigkeitskonstante des Antibiotikums

Tabelle 3.4: Optimierungsergebnisse mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ nach der Anpassung an die experimentellen Daten in der Batchkultur

Antibiotikum	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ciprofloxacin	$\mu_{\max 1}=1,97 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $\mu_{\max 2}=1,35 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $N_{\max}=10^{9,04} \text{ [KBE/mL]}$ $E_{\max}=25,85 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $EC_{50}=3,21 \text{ [MHK]}$ $a_1=3,67 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $a_2=0,88;$ $h=0,30 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $v=5,47$ S=0,484	$\mu_{\max 1}=5,63 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $\mu_{\max 2}=1,02 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $N_{\max}=10^{8,09} \text{ [KBE/mL]}$ $E_{\max}=9,24 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $EC_{50}=6,75 \text{ [MHK]}$ $a_1=0,58 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $a_2=1,73 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $h=0,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $v=4,67$ S=0,619
Moxifloxacin	$\mu_{\max 1}=3,25 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $\mu_{\max 2}=1,97 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $N_{\max}=10^{9,04} \text{ [KBE/mL]}$ $E_{\max}=34,39 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $EC_{50}=5,62 \text{ [MHK]}$ $a_1=0,2 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $a_2=0,72 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $h=0,09 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $v=5,28$ S=0,478	nicht bestimmt
Tobramycin	$\mu_{\max 1}=2,14 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $\mu_{\max 2}=1,04 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $N_{\max}=10^{9,04} \text{ [KBE/mL]}$ $E_{\max}=13,11 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $EC_{50}=6,17 \text{ [MHK]}$ $a_1=1,71 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $a_2=0,23 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $h=0,33 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $v=6,37$ S=0,544	nicht bestimmt
Ampicillin	$\mu_{\max 1}=2,41 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $\mu_{\max 2}=1,32 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $N_{\max}=10^{9,04} \text{ [KBE/mL]}$ $E_{\max}=27,97 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $EC_{50}=11,97 \text{ [MHK]}$ $a_1=1,42 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $a_2=0,59 \text{ [h}^{-1}\text{MHK}^{-1}\text{]}$ $h=0,58 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ $v=4,4;$ S=0,436	nicht bestimmt

$\mu_{\max 1}$ =Wachstumsrate der Teilpopulation N_1 ; $\mu_{\max 2}$ =Wachstumsrate der Teilpopulation N_2 ;
 N_{\max} =maximale Bakterienanzahl in der Kultur (Kapazität); E_{\max} =maximaler Effekt;
 EC_{50} =Konzentration, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist; a_1 =Inhibierungskonstante der
Teilpopulation N_1 ; a_2 =Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_2 ; h =Adaptierungsrate;
 v =Verhältnis der Teilpopulation N_1 zur Teilpopulation N_2 ; F =Fehlerquadrat

4. Diskussion

Die Dosierungen von Antibiotika werden, auch sechzig Jahre nach Einführung des Penicillins, noch häufig empirisch ermittelt. Die Bestrebungen, die Antibiotikatherapie auf eine rationale Basis zu stellen, wurden vor allem durch die intensive Forschung auf dem Gebiet der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik vorangetrieben.

Anfang der 90-er Jahre wurden Pharmakologische Indices eingeführt, die zum Vergleich unterschiedlicher Antibiotika-Wirkungen herangezogen werden. Pharmakologische Indices sind vereinfachte Modelle, da sie sich aus einem pharmakokinetischen Parameter und pharmakodynamischen Parameter zusammensetzen. Das sogenannte PK/PD-Modeling ist eine weitere Methode, um die Pharmakokinetik mit der Pharmakodynamik in der Antibiotikatherapie zu kombinieren. Das PK/PD-Modeling versucht, die Wirkung eines Antibiotikums unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik mittels eines entwickelten mathematischen Modells zu beschreiben und somit eine Vorhersage der Antibiotikawirkung zu ermöglichen. Grundlage für die mathematischen Modelle sind in-vitro oder in-vivo Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Antibiotika in Form von Absterbekinetiken.

Derzeit sind einige mathematische Modelle in der Literatur beschrieben, die allerdings keine universelle Anwendung zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika ermöglichen [Nolting *et al.* 1996; Schuck *et al.* 2002; Yano *et al.* 1998].

4.1 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung in der Batchkultur

4.1.1 Bakterizide Wirkungsmuster

Craig *et al.* untersuchten das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* durch Einwirkung von Ciprofloxacin, Tobramycin und Ticarcillin. Sie charakterisierten das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* durch diese Antibiotika und unterteilten es in drei verschiedene Typen bakterizider Wirkungsmuster.

Die Wirkung von Ciprofloxacin und von Tobramycin auf *P. aeruginosa* wurde dem ersten Typ zugeordnet. Charakteristisch für Typ I ist nach Meinung von Craig *et al.* [Craig *et al.* 1991] die Steigerung der Absterberate durch Konzentrationserhöhung.

Die Wirkung des β -Laktam-Antibiotikums Ticarcillin auf *P. aeruginosa* wurde dem zweiten Typ zugeordnet. Mit Erhöhung der Ticarcillinkonzentration (0,25-x, 1-x, 4-x, 16-x, 64-x MHK) war eine Steigerung in der initialen Abtötungsgeschwindigkeit auf *P. aeruginosa* bis zu der 4-fachen MHK zu beobachten. Durch eine weitere Konzentrationserhöhung konnte keine weitere Steigerung in der initialen Abtötungsgeschwindigkeit oder in der maximalen Keimzahlreduktion

erreicht werden. Dieser Typ der bakteriziden Wirkungsmuster ist bei den Penicillinen zu beobachten.

Der Unterschied zum Typ I besteht darin, dass „Typ I-Antibiotika“ auch bei höheren Konzentrationen ($> 4\text{-x MHK}$) noch eine Steigerung der Wirkung auf den Erreger zeigen.

Der dritte Typ der bakteriziden Wirkungsmuster ist nach Craig *et al.* [Craig *et al.* 1991] durch den linearen Anstieg der bakteriziden Wirkung mit zunehmender Konzentration charakterisiert, und ist nach der Einwirkung von Cephalosporinen auf einen Erreger zu beobachten.

Der Unterschied zu Typ I ist die lineare Proportionalität zwischen Wirkung und Konzentration, während diese bei Typ I nicht zu beobachten ist.

Da eine eindeutige Einordnung der Antibiotika in den dritten Typ des bakteriziden Wirkungsmusters häufig nicht möglich ist und einige Autoren die Wirkung der Cephalosporine dem zweiten Typ zuordnen [Shah *et al.* 1979], erfolgt derzeit nur noch eine Einteilung in konzentrationsabhängig wirkende (Typ I) und zeitabhängig wirkende (Typ II) Antibiotika. Der Gruppe der konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotika werden die Aminoglykoside und die Chinolone, der Gruppe der zeitabhängig wirkenden Antibiotika werden die β -Laktame (inklusive der Cephalosporine), Glycopeptide, Makrolide, Clindamycin und die Oxazolidinone zugeordnet [Ambrose *et al.* 2000; Scaglione, 2002]. Die Ursache der konzentrations- oder zeitabhängigen Wirkung von Antibiotika ist nicht geklärt. Die Einteilung erfolgt nur aufgrund des Absterbeverhaltens eines Erregers nach Einwirkung des Antibiotikums. Hypothesen, welche die zeitabhängige Wirkung der β -Laktame durch die Absättigung der Penicillin-Binde-Proteine (PBPs) durch die β -Laktame begründen, wurden bislang nicht bestätigt [Mouton, 2003a]. Diese Hypothese würde zudem nur für die β -Laktame zutreffen. Sie könnte nicht erklären, warum auch Glycopeptide und Makrolide zeitabhängig wirken, da deren Targets nicht die PBPs sind [Athur *et al.* 1993; Bauernfeind, 1993].

Allerdings zeigen einige Cephalosporine der dritten und vierten Generation eine konzentrationsabhängige Wirkung [Craig, 1995] und eine eindeutige Einteilung der Antibiotika aufgrund ihrer Wirkung in Typ I der in Typ II des bakteriziden Wirkungsmusters ist häufig gar nicht möglich. Viele Antibiotika wirken sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig.

4.1.1.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli*

Aus den Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin (siehe Abschnitt 3.2.1 und Abbildung 3.1) ist eine zunehmende Wirkung bis zur 8-fachen MHK zu beobachten.

Ab einer Konzentration, die der 8-fachen MHK entspricht, kann weder die initiale Abtötungsgeschwindigkeit noch die maximale Keimzahlreduktion gesteigert werden.

Zusätzlich zeigt das Absterbeverhalten von *E. coli* unter Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur, dass trotz hoher Ciprofloxacinkonzentrationen kein vollständiges Absterben von *E. coli* zu erreichen ist. Eine gewisse Anzahl der Bakterien überlebt und ist anschließend noch zu geringfügigem Wachstum fähig. Oft erst nach 12 Stunden.

Da in vielen Arbeiten die antibakterielle Wirkung eines Antibiotikums in der Batchkultur maximal bis zu acht häufig aber sogar nur 6 oder 4 Stunden untersucht wird, wird die Persistenz der Bakterien und das Wiederanwachsen der Bakterien in den Untersuchungen nie berücksichtigt [Craig *et al.* 1991; Mouton, 2003b; Nolting *et al.* 1996].

4.1.1.2 Antibakterielle Wirkung von Moxifloxacin auf *E. coli*

Moxifloxacin zeigt eine ähnliche Wirkung auf *E. coli* wie Ciprofloxacin (siehe Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 3.2). Bis zur 4-fachen MHK kann eine Steigerung in der initialen Abtötungsgeschwindigkeit und in der maximalen Keimzahlreduktion beobachtet werden. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration des Antibiotikums nehmen initiale Abtötungsgeschwindigkeit und Keimzahlreduktion in geringerem Ausmaß weiter zu. Hohe Moxifloxacinkonzentrationen bewirken wie Ciprofloxacin keine vollständige Abtötung der Kultur. Jedoch zeigt *E. coli* bei den hohen Konzentrationen kein geringfügiges Wiederanwachsen zwischen Stunde 12 und 24 wie nach Einwirkung von Ciprofloxacin.

Untersuchungen von Salisbury *et al.* [Salisbury *et al.* 1999] bestätigen diese Ergebnisse. Sie zeigen eine zunehmende Wirkung von Moxifloxacin auf *E. coli*. Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit und die maximale Keimzahlreduktion lässt sich bis zur 16-fachen MHK steigern. Ein Wiederanwachsen der bakteriellen Kultur wurde nicht beobachtet.

4.1.1.3 Antibakterielle Wirkung von Tobramycin auf *E. coli*

Aus der Absterbekinetik von *E. coli* durch Einwirkung von Tobramycin kann mit jeder getesteten Zunahme der Konzentration des Antibiotikums eine deutliche Steigerung in der initialen Abtötungsgeschwindigkeit und in der Keimzahlreduktion beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2.3 und Abbildung 3.3). Während bei hohen Konzentrationen (16-x und 32-x MHK) die bakteriellen Kulturen kein Wiederanwachsen zeigen, ist bei geringeren Konzentrationen (4-x und 8-x MHK) ein geringfügiges Wiederanwachsen der Bakterien zu beobachten. Nach Einwirkung der 32-fachen MHK fällt ab Stunde 4 die Keimzahl unter die Nachweisgrenze von 1 KBE/mL.

Ähnliche Ergebnisse erhielt Mouton [Mouton, 2003b]. Mouton untersuchte das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* nach Einwirkung von Tobramycin und Ceftazidim in der Batchkultur und beobachtete eine kontinuierliche Steigerung der maximalen Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* bei zunehmender Tobramycinkonzentration. Da der Untersuchungszeitraum nur 4 Stunden betrug, ist ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen bzgl. des Wiederaanwachsens der bakteriellen Kultur nicht möglich.

4.1.1.4 Antibakterielle Wirkung von Ampicillin auf *E. coli*

Das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Ampicillin zeigt eine Erhöhung der initialen Abtötungsgeschwindigkeit bis zur 8-fachen MHK. Eine weitere Steigerung der Antibiotikumkonzentration führt zu keiner wesentlichen Verbesserung von initialer Abtötungsgeschwindigkeit oder Keimzahlreduktion (siehe Abschnitt 3.2.4 und Abbildung 3.4). Allerdings bewirken höhere Konzentrationen trotzdem noch eine Steigerung der Wirkung von Ampicillin auf *E. coli*, da Konzentrationen, die dem 16-fachen und dem 32-fachen der MHK entsprechen, noch eine Steigerung im AAC-Wert bewirken.

4.1.1.5 Einteilung in bakterizide Wirkungsmuster

Anhand der Definitionen der bakteriziden Wirkungsmuster (siehe Abschnitt 4.1.1.1) von Craig *et al.* ist eine eindeutige Einteilung der Wirkung von Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Ampicillin auf *E. coli* anhand der Absterbekinetiken nicht möglich. Nur Tobramycin zeigt eine eindeutige konzentrationsabhängige Wirkung auf *E. coli* in der Batchkultur, da hier mit jeder getesteten Konzentrationserhöhung auch eine Steigerung der Wirkung zu beobachten war. Diese trifft aber nicht für Ciprofloxacin und Moxifloxacin zu. Die Wirkung von Ampicillin kann nicht dem Typ II der bakteriziden Wirkungsmuster zugeordnet werden, da auch höhere Konzentrationen ($> 4\text{-x}$ MHK) noch eine Wirkungssteigerung zeigen.

Somit ist eine eindeutige Einteilung in konzentrations- und zeitabhängige Antibiotika nicht möglich. Betrachtet man aber die Wirkung von Antibiotika auf einen Erreger als einen Prozess, der unabhängig von einzelnen Wirkungsmechanismen zu einem ähnlichen Endergebnis, d. h. zu ähnlichen Absterbekurven, führt, dann sollte es auch möglich sein, mittels *eines* mathematischen Modells die Wirkung unterschiedlicher Antibiotika auf einen Erreger beschreiben zu können.

4.1.2 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus*

Ciprofloxacin zeigt auf *S. aureus* bis zur 8-fachen MHK eine konzentrationsabhängige Wirkung, die aber nicht so ausgeprägt ist, wie die Wirkung auf *E. coli* (siehe Abschnitt 3.2.5 und

Abbildung 3.5). Im Vergleich zu *E. coli* sind wesentlich höhere Konzentrationen für die gleiche Wirkung nötig. Zum einen sind höhere absolute Konzentrationen aufgrund der höheren MHK von *S. aureus* notwendig, zum anderen zeigen gleiche, als Vielfaches der MHK eingesetzte Konzentrationen eine verminderte Wirkung auf *S. aureus*. Höhere Konzentrationen (16-x und 32-x MHK) zeigen eine verminderte Aktivität auf *S. aureus*. Dieser Effekt, der nicht nur bei Chinolonen zu beobachten ist, wird als Eagle Effekt bezeichnet. Eagle *et al.* [Eagle *et al.* 1950] stellten mit Hilfe von Untersuchungen an Mäusen und Kaninchen fest, dass hohe Penicillinkonzentrationen im Vergleich zu geringeren Konzentrationen zu einer verminderten Wirkung führen [Eagle *et al.* 1952; Eagle *et al.* 1950]. Dieses Phänomen kann auch bei Chinolonen beobachtet werden [Shah *et al.* 1989; Yourassowsky *et al.* 1986]. Die Ursachen des Eagle Effekts sind bislang noch unklar. Eine mögliche Erklärung ist, dass hohe Antibiotikakonzentrationen die bakteriellen autolytischen Enzyme hemmen, die den Zelltod aufgrund der Einwirkung von β -Laktam-Antibiotika induzieren [Holm *et al.* 1991; Kondo *et al.* 2001; Odenholt *et al.* 1989]. Dies wird bestätigt in Untersuchungen von Rodger *et al.* [Rogers *et al.* 1971], die den Einfluss der Autolysine nach Einwirkung des β -Laktam-Antibiotikums Methicillin auf den Zelltod von *S. aureus* untersuchten. Sie stellten fest, dass das Antibiotikum seine tödliche Wirkung durch Zugabe eines weiteren Antibiotikums verliert, wenn dieses Antibiotikum die Protein-Biosynthese hemmt. Somit folgerten sie, dass Methicillin für die Induktion der Autolysine und somit für den Zelltod verantwortlich ist. Wird die Synthese der Autolysine aber durch ein weiteres Antibiotikum inhibiert, überlebt die Zelle.

4.2 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung im in-vitro Modell

4.2.1 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli*

Im in-vitro Modell zeigt Ciprofloxacin bei steigenden Initialkonzentrationen bis zu 16-x MHK eine zunehmende Wirkung auf *E. coli* (vergl. Abschnitt 3.3.1 und Abbildung 3.6). Höhere Konzentrationen zeigen keine weiteren Steigerungen der Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli*. Geringe Konzentrationen (2-x MHK) üben keinen messbaren Effekt auf *E. coli* aus. Der Konzentrationsbereich, in dem eine Effektivitätssteigerung zu beobachten ist, ist sehr klein. Ciprofloxacin zeigt auf *E. coli* im in-vitro Modell eine Effektivitätssteigerung über 3 Konzentrationsstufen, während in der Batchkultur eine Effektivitätssteigerung über 6 Konzentrationsstufen zu beobachten ist. Vergleicht man beispielsweise Absterbekinetiken bei gleichen AUC Werten (und somit pro Zeiteinheit gleichen Ciprofloxacinmengen) in der Batchkultur und im in-vitro Modell (zum Beispiel AUC=0,37 [mg/L h]: Initialkonzentration im in-vitro Modell, die der 2-fachen MHK entspricht; Konzentration in der Batchkultur, die der 0,5-

fachen MHK entspricht), so kommt es im in-vitro Modell zu einem Anwachsen der Zellen. Hingegen ist in der Batchkultur eine maximale Keimzahlreduktion von 3,27 [$\log \Delta$ KBE] zu sehen. Höhere Initialkonzentrationen weisen sehr schnell den maximalen Effekt auf *E. coli* auf und zeigen eine bessere Abtötung von *E. coli* als in der Batchkultur.

Der unterschiedliche Effekt in der Batchkultur und im in-vitro Modell ist wahrscheinlich in den unterschiedlichen Konzentrations-Zeit-Verläufen in der Batchkultur und im in-vitro Modell begründet. Während geringe Initialkonzentrationen von Ciprofloxacin im in-vitro Modell kaum einen Effekt auf *E. coli* zeigen, führen geringe konstante Konzentrationen in der Batchkultur zu einem sichtbaren Effekt. Dahingegen weisen hohe Initialkonzentrationen im in-vitro Modell eine bessere Wirkung auf als konstante Konzentrationen in der Batchkultur. Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, wie schwierig eine Einteilung der Wirkung von Antibiotika in bakterizide Wirkungsmuster ist, wenn der Konzentrations-Zeit-Verlauf eine so entscheidende Rolle auf die Wirkung eines Erregers hat.

Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] im in-vitro Modell zeigen bei einer initialen Ciprofloxacin-Konzentration von 2-x MHK eine maximale Keimzahlreduktion von *E. coli* um 2 Zehnerpotenzen nach einer Einwirkzeit von 4 Stunden.

Für die bessere Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* in den Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen könnten die experimentellen Unterschiede, die im Vergleich zu dieser Arbeit gewählt wurden, verantwortlich sein.

Zum einen wurde eine andere in-vitro Modell Apparatur verwendet, in dem ein Teil der Bakterien ausgewaschen wird. Dieser bakterielle Verlust wird berechnet und zu der experimentell ermittelten Keimzahl addiert. Vielleicht spiegelt diese Keimzahl aber nicht die tatsächliche Keimzahl wieder. Zum anderen wurde ein niedrigeres Ausgangsinokulum von 1×10^6 KBE/mL gewählt. Das Ausgangsinokulum in den Untersuchungen dieser Arbeit lag bei 1×10^7 KBE/mL.

Höhere Ciprofloxacin-Konzentrationen zeigen in den Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] eine ähnliche Wirkung auf *E. coli* im in-vitro Modell, wie die in Abschnitt 3.3.1 ermittelte Wirkung. Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] zeigen, dass sich die initiale Abtötungsgeschwindigkeit ab der Initialkonzentration von 16-x MHK nicht mehr ändert. Bei hohen Konzentrationen ist ebenso ein Wiederanwachsen der Bakterien zu beobachten [Firsov *et al.* 1998].

Auch im in-vitro Modell kommt es bei *E. coli* nicht zu einer vollständigen Abtötung der Kultur. Weil die Konzentration von Ciprofloxacin im in-vitro Modell bei der Initialkonzentration von 16-x MHK nach 16 h, von 32-x MHK nach 20 h und von 64-x MHK nach 24 h unter die

Konzentration der MHK fällt, ist ein Wiederanwachsen der Zellen leichter als in der Batchkultur möglich.

4.2.2 Antibakterielle Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus*

Ciprofloxacin zeigt bereits nach Einwirkung von sehr geringen Initialkonzentrationen von 1-x MHK im in-vitro Modell einen hohen Effekt auf *S. aureus* (vergl. Abschnitt 3.3.2 und Abbildung 3.7). Der Effekt kann bis zu einer Initialkonzentration von 8-x MHK noch gesteigert werden. Höhere Ciprofloxacinkonzentrationen (16-x und 32-x MHK) haben eine verminderte Wirkung auf *S. aureus* im in-vitro Modell. Dieses Phänomen wurde auch in der Batchkultur beobachtet und ist ein Beispiel für den Eagle Effekt (siehe Abschnitt 4.1.2). Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit und die maximale Keimzahlreduktion sind bei *S. aureus* im Vergleich zu *E. coli* viel geringer. Die einzelnen Absterbekurven unter Einwirkung von Ciprofloxacin sind dagegen sehr ähnlich. Anhand dieser Ergebnisse wird die im Vergleich zu *E. coli* schlechtere Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* deutlich.

Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] im in-vitro Modell zeigen keine verminderte Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* bei hohen Konzentrationen. Jede Konzentrationserhöhung führt zu einer Steigerung der Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* im in-vitro Modell. Das geringere Ausgangsinokulum könnte auch hier der Grund für den nicht auftretenden Eagle Effekt sein. Aufgrund der geringeren Zellzahl sind wahrscheinlich weniger Autolysine im Medium, die durch das Antibiotikum gebunden werden könnten. Somit könnte ein Eagle Effekt, der vielleicht nur in geringerem Umfang vorhanden ist, nicht zu beobachten sein.

Die Ergebnisse von Firsov *et al.* zeigen ebenfalls die verringerte Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* im Vergleich zu *E. coli* [Firsov *et al.* 1998].

Nach Einwirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus* im in-vitro Modell ist bei allen Konzentrationen, außer bei der 32-fachen MHK, ein Wiederanwachsen der Bakterien zu sehen. Das Wiederanwachsen der Bakterien ist in den Untersuchungen von Firsov *et al.* [Firsov *et al.* 1998] auch zu beobachten.

4.3 Persistenz von Bakterien

Mit einer Ausnahme (32-x MHK Tobramycin) wurden in der Batchkultur und im in-vitro Modell trotz hoher Antibiotikakonzentrationen keine Sterilität in den Kulturen erreicht. Die überlebenden oder persistierenden Bakterien zeigen keine Veränderung in der Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum.

In den Untersuchungen von Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] und von Mouton [Mouton, 2003b] ist ebenfalls keine vollständige Abtötung der Kulturen zu beobachten. Sie lieferten aber für dieses Phänomen keine Erklärung.

Als Persistenz wird das Überleben sensibler Keime bei einer antimikrobiellen Behandlung bezeichnet [Mutschler *et al.* 2001]. Über die Ursachen der Erregerpersistenz gibt es Hypothesen unterschiedlichster Art.

Die Persistenz wird häufig unter Einwirkung von β -Laktam-Antibiotika beobachtet und wird durch das Überleben von nicht proliferierenden Zellen begründet. Wahrscheinlich erfolgt eine Hemmung der für die Zellteilung erforderlichen autolytischen Bakterienenzyme durch das Antibiotikum [Amsterdam, 1996; Mutschler *et al.* 2001]. Persistierende Bakterien werden auch nach der Einwirkung von Chinolonen auf *E. coli* beobachtet [Wolfson *et al.* 1989]. Untersuchungen von Evans *et al.* [Evans *et al.* 1991] und von Kratz *et al.* [Kratz *et al.* 1992a] zeigen, dass die antibakterielle Aktivität der Chinolone bei stoffwechsellinaktiven Zellen verloren geht. Debbia *et al.* [Debbia *et al.* 2001] sind der Meinung, dass persistierende *E. coli* Zellen nach Einwirkung von Ciprofloxacin nicht wachsen, da diese versuchen, die Schädigungen in der DNA durch eine SOS-Antwort zu reparieren (weiterführende Diskussion aufgrund der mathematischen Modellierung in Abschnitt 4.6.9).

4.4 Vorhersage der antibakteriellen Wirkung mittels pharmakologischer Indices

Pharmakologische Indices werden in der Antibiotikatherapie zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika eingesetzt. Bei Überschreitung eines Mindestwertes soll ein Therapieerfolg in der Antibiotikatherapie vorhersagbar sein. Dabei werden die Indices AUC/MHK und C_{\max}/MHK häufig für konzentrationsabhängig wirkende Antibiotika verwendet, während der Index $T_{>\text{MHK}}$ vielfach für zeitabhängig wirkende Antibiotika verwendet wird (siehe Abschnitt 1.1) [Mouton, 2002; Sanchez-Navarro *et al.* 1999; Schentag *et al.* 2001].

Anhand der in Tabelle 3.2 berechneten pharmakologischen Indices (PI) ist erkennbar, dass sie keine Aussage über den maximalen Effekt von Ciprofloxacin auf *E. coli* erlauben, da die Höhe der pharmakologischen Indices proportional zur eingesetzten Konzentration steigt. Der pharmakodynamische Parameter AAC, der nach der Einwirkung von Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Tobramycin und Ampicillin auf *E. coli* in der Batchkultur berechnet wurde, zeigt, ab welcher Konzentration der maximale Effekt erreicht wurde, da sich die AAC-Werte ab dieser Konzentration kaum noch ändern.

Abbildung 4.1 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen in der Batchkultur nach Einwirkung der Antibiotika auf *E. coli* und *S. aureus*. Dabei wurde der AUC/MHK-Wert gegenüber den AAC-Wert aufgetragen.

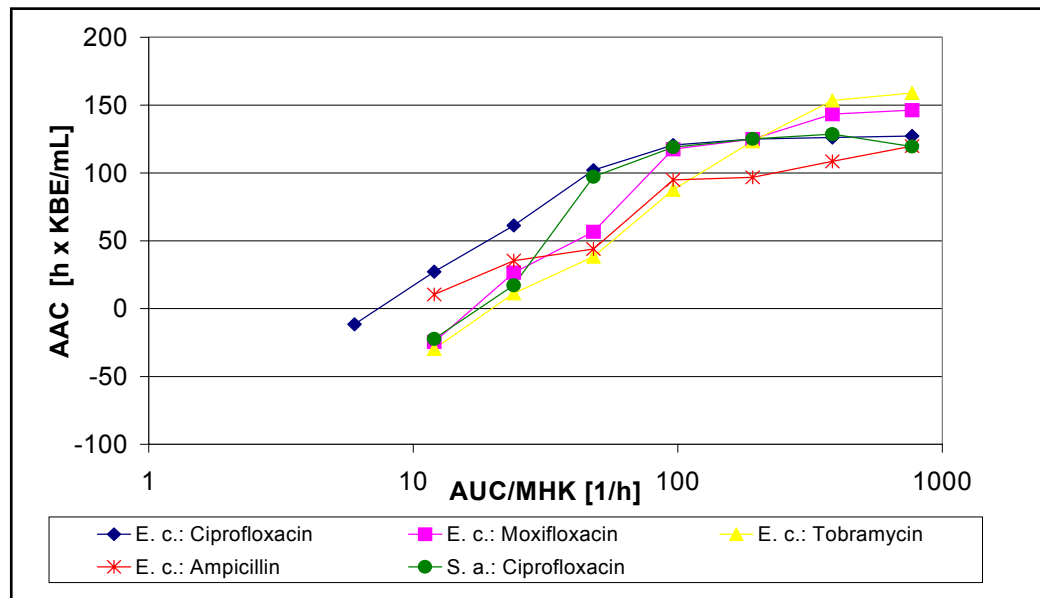


Abbildung 4.1: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen in der Batchkultur; Legende: eingesetzte Antibiotika, AAC=Fläche oberhalb der Absterbekurve, AUC/MHK=Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve/ minimale Hemmkonzentration, *E. c.*= *Escherichia coli*, *S. a.*= *Staphylococcus aureus*

Die Abbildung zeigt (siehe auch Tabelle 3.2), dass bei konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur das Wirkungsmaximum bei *E. coli* und bei *S. aureus* bei einem AUC/MHK-Wert von 192 erreicht wurde, bei Moxifloxacin dagegen erst bei einem AUC/MHK-Wert von 384. Bei Tobramycin ist bei einem AUC/MHK-Wert von 768 noch eine Steigerung zu beobachten, während bei Ampicillin der maximale Effekt bei einem AUC/MHK-Wert von 96 erreicht wird. Der maximale Effekt der Antibiotika auf *E. coli* wird also bei sehr unterschiedlichen AUC/MHK-Werten erreicht.

Bei abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell wird der maximale Effekt auf *E. coli* bereits bei einem AUC/MHK-Verhältnis von 95 und einem C_{\max} /MHK-Verhältnis von 16 erreicht. Der maximale Effekt ist bei *S. aureus* dagegen schon bei einem AUC/MHK-Wert von 47 und einem C_{\max} /MHK-Wert von 8 erreicht, da höhere Konzentrationen keine Wirkungssteigerung zeigen.

Schentag *et al.* [Schentag *et al.* 1991; Schentag *et al.* 1996] sind der Meinung, dass der Index AUC/MHK als ein universeller Index herangezogen werden kann, der für alle Antibiotikaklassen

und für alle Erreger anwendbar ist. Die Dosis der Antibiotikatherapie sollte so gewählt werden, dass mindestens ein AUC/MHK-Verhältnis von 125 erreicht wird.

Diese Meinung kann mit den Ergebnissen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In der Batchkultur sind höhere AUC/MHK-Werte als 125 nötig, damit der maximale Effekt auf *E. coli* und *S. aureus* erreicht wird. Im in-vitro Modell wird der maximale Effekt bereits bei geringeren AUC/MHK-Werten als 125 erreicht.

In-vitro Untersuchungen von Hoang [Hoang *et al.* 1999] zeigen, dass für Ciprofloxacin und für *S. aureus* ein AUC/MHK-Verhältnis >57 für die Abtötung der Bakterien ausreichend ist. Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch geringere AUC/MHK-Verhältnisse zur Bakterieneradikation ausreichen.

Aufgrund von Untersuchungen im in-vitro Modell und im Tiermodell wurde bei Chinolonen für den Index C_{\max}/MHK ein Wert von ≥ 10 vorgeschlagen, der mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Therapieerfolg führt [Dalhoff, 1999; Dalhoff *et al.* 2003]. In der Batchkultur und im in-vitro Modell wird die maximale Wirkung der Antibiotika auf *E. coli* erst bei C_{\max}/MHK -Werten erreicht, die mit 16 oder 32 deutlich höher liegen, als der von Dalhoff vorgeschlagene Wert von 10. Somit ist keine Verallgemeinerung in der Beziehung möglich, dass bei einem C_{\max}/MHK -Wert von 10 die maximale Wirkung auf *E. coli* immer erreicht wird.

Anhand des in der Batchkultur vorherrschenden $T_{>\text{MHK}}$ -Wert ist es nicht sinnvoll, Aussagen über den maximalen Effekt zu treffen, da der Wert aufgrund der konstanten Konzentration entweder bei 0 oder bei 100% liegt. Der maximale Effekt von Ciprofloxacin im in-vitro Modell wird bei *E. coli* und bei *S. aureus* erst bei einem $T_{>\text{MHK}}$ -Wert von 100 % erreicht.

Anhand der berechneten pharmakologischen Indices wird deutlich, dass der maximale Effekt der Antibiotika auf *E. coli* und *S. aureus* bei sehr unterschiedlichen Werten erreicht wird, und dass die Wirkung des Antibiotikums bei gleicher Höhe der pharmakologischen Indices im in-vitro Modell oder in der Batchkultur sehr unterschiedlich sein kann. Aufgrund der pharmakokinetischen und speciesspezifischen Unterschiede ist es nicht möglich, für den maximalen Effekt eines Antibiotikums nur einen einzigen Grenzwert festzulegen.

Der Grund für die schlechte Vorhersage der Wirkung mittels der pharmakologischen Indices ist vor allem in der MHK begründet, die in allen pharmakologischen Indices als pharmakodynamischer Parameter enthalten ist. Sie kann keine ausreichende Aussage über die Wirkung eines Antibiotikums auf einen Erreger liefern. Die MHK-Bestimmung erfolgt nach einer 18-24-stündigen Inkubation bei 37 °C bei einem Inokulum von 1×10^5 – 1×10^6 KBE/mL [Deutsches Institut für Normung e.V., 2000]. Sie ist eine Endpunktbestimmung, die keine Aussage über das antibakterielle Geschehen während der Inkubationsphase zulässt. Die MHK

gibt nur an, welche Konzentration das sichtbare Wachstum (bis zu einer Zellzahl von $>10^6$ KBE/mL) verhindert. Geringere Zellzahlen und die mögliche Präsenz von persistierenden Zellen bleiben bei der MHK-Bestimmung unberücksichtigt. Des Weiteren ist die Generationszeit von Bakterien in Infektionsherden oder aber in Biofilmen, die bei Infektionen auf Geweboberflächen oder auf Kunststoffen wie Kathetern entstehen können, viel geringer [Naber *et al.* 1994]. Untersuchungen von Dalhoff *et al.* [Dalhoff *et al.* 1995] zeigen, dass die Wirkung von Chinolonen auf langsam wachsende Zellen weniger effektiv ist als auf „normal“ wachsende Zellen. Bei Verdopplung der Generationszeit von *E. coli* wurde die Absterberate nach Einwirkung von Ciprofloxacin um 11,5% reduziert.

Ferner kann bei gleicher MHK die Wirkung eines Antibiotikums bakteriostatisch oder bakterizid sein, so dass die MHK keine Auskunft über den Wirkungstyp einer Substanz geben kann. Rustige [Rustige, 1991] zeigte, dass die Pharmakodynamik verschiedener Chinolone trotz gleicher MHK unterschiedlich ist.

Die Betrachtung von Absterbekinetiken bietet die Möglichkeit, das Absterbeverhalten über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wobei besonders die Vorgänge in den ersten Stunden nach der Einwirkung des Antibiotikums in Hinblick auf die therapeutische Anwendung von entscheidender Bedeutung sind [Kratz *et al.* 1992a]. Da Absterbekinetiken im Gegensatz zur MHK eine bessere Aussage über die antibakterielle Wirkung eines Antibiotikums liefern, wurden Absterbekinetiken von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur verwendet, um ein mathematisches Modell zu entwickeln, welches die Vorhersage der Wirkung von Antibiotika ermöglicht.

4.5 Mathematische Modelle

Die mathematische Modellierung des Absterbeverhaltens in Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration ermöglicht Vorhersagen über das Absterbeverhalten eines Erregers während der Einwirkung eines Antibiotikums. Das Modell soll ein zusätzliches Verständnis über beteiligte Mechanismen liefern, die für die Wirkung des Antibiotikums verantwortlich sind. Des Weiteren ist die Kombination mit der humanen Pharmakokinetik im in-vitro Modell möglich. Mathematische Modelle können für die Optimierung von Dosierungsregimen herangezogen werden und somit zum rationalen Einsatz von Antibiotika beitragen.

4.5.1 Parameterabschätzung

Die Anpassung der mathematischen Modelle an die experimentell ermittelten Daten erfolgt mit Hilfe der Parameteroptimierung, d. h. die Parameter in den mathematischen Modellen werden so

verändert, dass die mathematischen Modelle die experimentellen Daten so gut wie möglich beschreiben. Für die Anpassung der mathematischen Modelle werden Startwerte für jeden Parameter benötigt. Diese Startwerte werden durch eine lokale Analyse der Absterbekinetiken berechnet. Geeignete Teilbereiche der Absterbekurven werden zur Berechnung von Näherungswerten der Parameter verwendet. So ist die Information für die Kapazität (N_{\max} =maximale Bakterienanzahl in einer Kultur) im wesentlichen im stationären Teil der Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum, während die Information für μ_{\max} in dem exponentiell steigenden Teil der Kurve lokalisiert ist. Da die Wachstumsraten μ von der Konzentration des Antibiotikums abhängig sind, können aus dem ansteigenden Teilen der Absterbekurven Wachstumsraten bestimmt werden, die zur Konzentration des Antibiotikums ins Verhältnis gesetzt werden. Aus dieser Beziehung kann die Inhibierungskonstante a abgeschätzt werden, welche die Steigung dieser Kurve beschreibt. Aber auch der Parameter μ_{\max} kann erneut aus dieser Beziehung abgeschätzt werden, da μ_{\max} im Schnittpunkt der Kurve mit der y-Achse liegt. Die Absterberaten werden vor allem durch den vorderen sinkenden Teil der Absterbekurven beschrieben. Daher wurden aus diesem Teil die Absterberaten bestimmt und gegenüber der Konzentration aufgetragen, um Startwerte für die Parameter E_{\max} und EC_{50} abzuschätzen. Diese lokale Analyse der Absterbekurven bietet den Vorteil, dass man eine ungefähre Vorstellung von den Parametergrößen erhält und mit diesen Werten eine globale Optimierung des mathematischen Modells starten kann. Je mehr Parameter in einem mathematischen Modell enthalten sind, desto höher ist die Dimension des Suchraums und desto schwieriger ist es, dieses Optimum in endlicher Zeit zu finden. Damit das Optimum gefunden wird, sollte zunächst eine lokale Analyse vor der globalen Optimierung erfolgen.

Für die lokale Abschätzung der Parameter μ_{\max} (maximal spezifische Wachstumsrate) und N_{\max} wurde Gleichung (3.1) an die experimentellen Daten von bakteriellen Wachstumskurven (vergl. Abschnitt 3.4) angepasst. Gleichung (3.1) beschreibt das Wachstum einer bakteriellen Kultur als logistisches Wachstum, d. h. das Wachstum der bakteriellen Kultur wird durch die maximale Bakterienanzahl N_{\max} begrenzt. Für die maximale Wachstumsrate μ_{\max} wurde ein Wert von 1,5 [h^{-1}] und für N_{\max} ein Wert von $10^{9,04}$ KBE/mL (= $1,10 \times 10^9$ KBE/mL) berechnet.

Da die Keimzahlbestimmung der Wachstumskontrolle nur zu 4 verschiedenen Zeitpunkten erfolgt, kommt es zu einer mangelnden Auflösung während der exponentiellen Wachstumsphase. Dies könnte zu einem ungenauen Wert von μ_{\max} führen. Die ermittelte maximal spezifische Wachstumsrate kann aber durch vergleichbare Ergebnisse von Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] und Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998] bestätigt werden. Nolting *et al.* ermittelten maximal spezifische Wachstumsraten für *E. coli* zwischen 0,97 und 2,8 [h^{-1}], und Yano *et al.* berechneten

eine maximal spezifische Wachstumsrate für *E. coli* von $2,1 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. Die maximale Bakterienanzahl in der Kultur N_{\max} beträgt in ihren Untersuchungen für *E. coli* $1,5 \times 10^9 \text{ KBE/mL}$.

Abbildung 3.11 zeigt eindeutig die Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der Konzentration des Antibiotikums. Die Annahme, dass die Wachstumsrate μ mit steigender Konzentration des Antibiotikums exponentiell abnimmt, wird durch Gleichung (3.2) beschrieben. Bei der Anpassung der Gleichung an die Wachstumsraten wurde für μ_{\max} ein Wert von $0,6 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ und für a ein Wert von $1,08 \text{ [h}^{-1} \text{ MHK}^{-1}\text{]}$ berechnet.

Abbildung 3.11 zeigt allerdings auch, dass sich ab der 4-fachen MHK die Wachstumsrate langsamer null nähert, als im Falle einer exponentiellen Abnahme der Wachstumsrate. Dies bedeutet ein geringfügigeres Wachstum von *E. coli* bei hohen Konzentrationen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die mit Gleichung (3.2) berechneten Parameter kleiner sind, als die tatsächlichen experimentellen Wachstumsraten. Da aber hier nur Startwerte für die Parameter berechnet werden, ist nur die Größenordnung der Parameter wichtig, und nicht deren genauer Wert.

Die exponentielle Abnahme der Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Konzentration wurde ebenfalls in dem mathematischen Modell von Lenski *et al.* [Lenski *et al.* 1986] angenommen. Dieses Modell beschreibt das Wachstum von zwei Bakterienspezies in Anwesenheit eines Antibiotikums in einem Chemostat.

In anderen mathematischen Modellen wird angenommen, dass die bakterielle Wachstumsrate unabhängig von der Antibiotikumkonzentration ist [Mouton, 2003b; Nolting *et al.* 1996; Yano *et al.* 1998]. Diese Annahme steht somit in Widerspruch zu den hier ermittelten Daten.

Die maximale Wachstumsrate von $0,6 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ ist im Vergleich zu der maximalen Wachstumsrate aus Abbildung 3.10, die aus den Wachstumskontrollen bestimmt wurde, um die Hälfte kleiner. Das liegt zum einen an der relativ ungenauen Anpassung von Gleichung (3.2) an die experimentell bestimmten Wachstumsraten und zum anderen an den verwendeten Daten, die zur Berechnung von μ_{\max} herangezogen wurden. Zur Berechnung der maximal spezifischen Wachstumsrate in Abbildung 3.10 dienten nur Wachstumskurven von *E. coli* ohne Antibiotikum, während für μ_{\max} in Abbildung 3.11 nur der erste Messpunkt bei $0,7 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ von der Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum ermittelt wurde. Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} von $1,5 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ aus Abbildung 3.10 ist zu bevorzugen, da die Berechnung der maximalen Wachstumsrate auf Daten basiert, die ohne Einwirkung eines Antibiotikums ermittelt wurden.

Abbildung 3.12 zeigt die eindeutige Abhängigkeit der Absterberate k von der Konzentration des Antibiotikums, die mit Hilfe einer Sättigungskurve bzw. durch das E_{\max} -Modell beschrieben werden kann. Aus diesem Grund wurde die Absterberate an die Gleichung des E_{\max} -Modells

(3.3) angepasst, um Startwerte für die Parameter E_{\max} (maximaler Effekt) und EC_{50} (Konzentrationen, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist) zu berechnen. Nach der Optimierung wurde für E_{\max} ein Wert von 12,35 [h^{-1}] und für EC_{50} ein Wert von 5,78 [MHK] berechnet. Vergleichbare Werte sind in der Literatur für Ciprofloxacin nicht vorhanden, da aufgrund der unterschiedlichen Modelle die E_{\max} und EC_{50} -Werte von Noting *et al.* [Noting *et al.* 1996] und von Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998] nicht herangezogen werden können.

4.5.2 E_{\max} -Modelle

Der Zusammenhang zwischen dem Effekt und der Konzentration des Antibiotikums lässt sich durch das sogenannte E_{\max} -Modell beschreiben (siehe Gleichung 1.1) [Derendorf *et al.* 2002; Jaehde *et al.* 1998].

Die pharmakodynamischen Parameter R_{\max} und AAC (vergl. Abschnitt 2.2.11) wurden in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums aufgetragen und dienten als Datengrundlage für das E_{\max} -Modell. Sowohl zwischen dem AAC-Wert und der Antibiotikumkonzentration als auch zwischen dem R_{\max} -Wert und der Antibiotikumkonzentration ergibt sich eine hyperbolische Sättigungs-Beziehung. Mit steigender Konzentration ist auch eine Steigerung des Effekts zu beobachten. Der maximale Effekt wurde bei einem AAC-Wert von 187,36 und einem R_{\max} -Wert von 8,62 erreicht. Nach der Anpassung des E_{\max} -Modells an die AAC-Werte wurde eine Standardabweichung der Residuen von 2,55 berechnet, während die Standardabweichung der Residuen nach der Anpassung des Modells an die R_{\max} -Werte nur 0,06 betrug. Der visuelle Vergleich zwischen Abbildung 3.13 (a) und (b) zeigt für beide Optimierungen eine gute Anpassung des E_{\max} -Modells an die pharmakodynamischen Parameter AAC und R_{\max} .

Ein bessere Anpassung an die AAC- und R_{\max} -Werte ist mit Hilfe des Sigmoidalen E_{\max} -Modells (Gleichung 1.2) möglich. Die Standardabweichung der Residuen ist wesentlich kleiner als nach der Anpassung des E_{\max} -Modells. Nach der Anpassung des Modells an die AAC-Werte beträgt die Standardabweichung der Residuen nur noch $S=0,2$, während sie nach der Anpassung des Modells an die R_{\max} -Werte $7,71 \times 10^{-3}$ beträgt. Das Sigmoidale E_{\max} -Modell ist aufgrund des Hill-Faktors die allgemeinere Form des „normalen“ E_{\max} -Modells, da bei letzterem der Hill-Faktor 1 ist. Der Hill-Faktor ermöglicht eine bessere Anpassung, indem ein weiterer Parameter im Modell enthalten ist.

Mouton [Mouton, 2003b] konnte zeigen, dass das Sigmoidale E_{\max} -Modell die Absterberate von *P. aeruginosa* nach Einwirkung von unterschiedlichen konstanten Meropenem- und Tobramycinkonzentrationen berechnen kann. Der Hill-Faktor beschreibt dabei im wesentlichen

den sehr unterschiedlichen Verlauf der beiden Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Während der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Meropenem sehr steil ist, und der maximale Effekt bei sehr geringen Konzentrationen erreicht wird ist bei Tobramycin ein sehr flacher Kurvenverlauf zu beobachten. Der maximale Effekt wird erst bei sehr hohen Tobramycinkonzentrationen erreicht. Folglich ist der Hill-Faktor bei Meropenem, einem vor allem zeitabhängig wirkenden Antibiotikum, mit 3,5 sehr groß, während er bei Tobramycin, einem konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotikum, nur 0,71 beträgt. Bei der Anpassung des sigmoidalen E_{\max} -Modells an die AAC-Werte bzw. R_{\max} -Werte von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur wurde ein Hill-Faktor von 1,42 bzw. von 1,75 bestimmt. Dieser Hill-Faktor liegt zwischen den beiden Hill-Faktoren, die von Mouton bestimmt wurden und bestätigt, dass Ciprofloxacin sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig wirkt.

4.5.3 Modell „Nolting“

Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] entwickelten ein mathematisches Modell (Gleichung 1.3), das die Vorhersage der Wirkung von Piperacillin, einem β -Laktam-Antibiotikum, auf *E. coli* ermöglicht. Das Modell beschreibt das Absterbeverhalten von *E. coli* in Abhängigkeit von der Zeit bei konstanten Konzentrationen in der Batchkultur und bei abnehmenden Konzentrationen im in-vitro Modell.

Der Versuch, mit Hilfe des Modells „Nolting“ das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur zu beschreiben, (Abbildung 3.15) zeigt, dass die Übertragung des Modells auf die Antibiotikagruppe der Chinolone nicht möglich ist. Die systematische Abweichung zwischen Modell und experimentellen Daten wird auch aufgrund der großen Standardabweichung der Residuen von 2,20 deutlich. Ein Grund für diese große Abweichung könnte sein, dass die Wachstumsrate nicht, wie in dem Modell angenommen, unabhängig von der Konzentration des Antibiotikums ist, sondern dass sie mit steigender Konzentration des Antibiotikums sinkt (siehe Abbildung 3.11). Zusätzlich erlaubt das Modell keine Existenz von Persistern. Deshalb ist das Beschreiben eines Wiederanwachsens der Bakterien durch das Modell nicht möglich. Des Weiteren wird das Wachstum der Bakterien nicht durch eine maximale Bakterienanzahl begrenzt. Somit kommt es bei der Wachstumskontrolle zu großen Abweichungen zwischen der berechneten und der experimentell bestimmten Wachstumskontrollkurve. Zusätzlich ist das Modell nicht für eine globale Anpassung an einen experimentellen Datensatz entwickelt worden. Nolting *et al.* [Nolting *et al.* 1996] verwendeten das Modell für die Berechnung des Absterbeverhaltens von *E. coli* an einzelne Piperacillinkonzentrationen und berechneten für jede Konzentration einen

Parametersatz. Die einzelnen Parameter schwanken deshalb je nach eingesetzter Konzentration, was für eine brauchbare Modellierung unzulässig ist.

4.5.4 Modell „Heterogene Population“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population“ (Gleichung 3.4 – 3.10) beinhaltet die Annahme, dass die gesamte Population von *E. coli* aus den zwei Teilpopulationen N_1 und N_2 besteht. Die Teilpopulation N_1 besteht aus „normalen“ *E. coli* Zellen, die zum Wachstum fähig sind und in Anwesenheit des Antibiotikums sterben. Das Wachstum von N_1 ist in der Form von der Konzentration des Antibiotikums abhängig, dass die Wachstumsrate bei steigender Konzentration des Antibiotikums exponentiell abnimmt (siehe oben).

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Konzentration des Antibiotikums ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Absterberate k von N_1 wird, wie auch in den Modellen „Nolting“ und „Yano“, mit Hilfe des E_{\max} -Modells beschrieben [Nolting *et al.* 1996; Yano *et al.* 1998].

Die Teilpopulation N_2 besteht aus persistierenden Zellen, die trotz höherer Konzentrationen des Antibiotikums nicht sterben. Im Gegenteil, sie können, abhängig von der Antibiotikakonzentration, sehr langsam wachsen. Diese Zellen zeigen interessanterweise keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin und sind somit keine genetisch veränderten Zellen.

Dieses Phänomen wird als Toleranz bezeichnet. Toleranz beschreibt die Fähigkeit der Bakterien, in Gegenwart von hohen Antibiotikakonzentrationen zu wachsen, obwohl die MHK der „Toleranz-Bakterien“ nicht verändert ist. Persistierende Bakterien können im Gegensatz dazu nur bei hohen Antibiotikakonzentrationen überleben, aber wachsen können sie hingegen nicht.

Dieses Phänomen wurde erstmalig 1942 von Hobby *et al.* beschrieben [Hobby *et al.* 1942]. Die Ursachen der Toleranz sind bislang unbekannt. Die Toleranz ist vor allem nach der Einwirkung von β -Laktam-Antibiotika beobachtet worden. Es wird angenommen, dass durch die Bindung der β -Laktam-Antibiotika an die Penicillin-Binde-Proteine endogene Inhibitoren der bakteriellen Autolyse inaktiviert werden [Amsterdam, 1996].

Durch Variation der Dichte des Ausgangsinokulums wurde die Anzahl der persistierenden Zellen von *E. coli* nach 4 Stunden Einwirkungszeit von 32-x MHK Ciprofloxacin in der Batchkultur untersucht. Je höher das Ausgangsinokulum ist, desto höher ist auch die Anzahl der persistierenden Bakterien bei einer Ciprofloxacin-Konzentration, die der 32-fachen der MHK von *E. coli* entspricht (Abbildung 3.16). Bei einem Ausgangsinokulum von 1×10^7 KBE/mL beträgt die Anzahl der persistierenden Zellen ungefähr 540 KBE/mL. Das bedeutet, dass in der Population persistierende Bakterien mit einer relativen Häufigkeit oder Wahrscheinlichkeit von

$5,4 \times 10^{-5}$ vorkommen. Dieses Ergebnis bildet die Grundlage für die Annahme 3 (Gleichung (3.8)) in dem Modell „Heterogene Population“. Bigger [Bigger, 1944] zeigte für Staphylokokken nach Einwirkung von Penicillin, dass persistierende Zellen mit einer Wahrscheinlichkeit von 1×10^{-6} überleben, der Anteil der Persister also 10^{-6} beträgt.

Das an die experimentell ermittelten Daten angepasste Modell „Heterogene Population“ (vergl. Abschnitt 3.6.4.3 und Abbildung 3.17) zeigt große Abweichungen zwischen den berechneten Kurven und den Messpunkten bei der Wachstumskontrolle und bei der 0,25-fachen MHK. Durch die Einführung des mathematischen Terms für das logistische Wachstum in das Modell würde das Wachstum der Gesamtpopulation durch eine maximale Bakterienanzahl begrenzt und die Standardabweichung der Residuen verkleinert werden. Dies würde zu einer besseren Anpassung führen. Des Weiteren fällt auf, dass die Wachstumsrate $\mu_{\max 2}$ der Teilpopulation N_2 mit 0,82 doppelt so hoch ist, wie die Wachstumsrate $\mu_{\max 1}$ der Teilpopulation N_1 , die nach der Anpassung des Modells nur noch 0,41 beträgt. Die Wachstumsrate $\mu_{\max 2}$ sollte aber auf jeden Fall kleiner als $\mu_{\max 1}$ sein, da sonst die Population N_1 auch in Abwesenheit des Antibiotikums keinen Vorteil gegenüber N_2 hätte, wodurch sich N_2 in jedem Fall durchsetzen müsste.

Die Veränderung der Wachstumsraten ist auf die Anpassung der Parameter zurückzuführen. Abbildung 3.17 (b) zeigt die berechneten Keimzahlveränderungen der Teilpopulationen N_1 und N_2 nach der Parameter-Anpassung. Die kleinste Standardabweichung der Residuen wird berechnet, wenn N_2 für das Wiederanwachsen der Bakterien verantwortlich ist, da N_1 nicht in der Lage ist, in Anwesenheit des Antibiotikums zu wachsen. Ein Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur ist mit Hilfe des Modells „Heterogene Population“ nicht möglich.

4.5.5 Modell „Alarmon“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Alarmon“ (Gleichung 3.11 – 3.15) beinhaltet im Gegensatz zum Modell „Heterogene Population“ die Annahme, dass die Bakterienpopulation aus einer Gesamtpopulation besteht, die in Anwesenheit des Antibiotikums wächst und stirbt. Die Wachstumsrate nimmt, wie im Modell „Heterogene Population“, exponentiell ab (siehe Abschnitt 4.5.4). Die Absterberate nimmt bei steigender Konzentration des Antibiotikums zu und erreicht bei sehr hohen Konzentrationen eine Maximalrate. Jedes sterbende Bakterium setzt eine bestimmte Menge Alarmon frei. Ab einer bestimmten Alarmonkonzentration, einer Schwellenwertkonzentration, wird der programmierte Zelltod der Zelle inhibiert. Somit würden manche, noch nicht gestorbene Bakterien aufgrund der Alarmonkonzentration im Medium überleben. Diese wären dann persistierende Bakterien.

Es konnten allerdings in der Batchkultur nach Einwirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* keine Alarmonen nachgewiesen werden (vergl. Abschnitt 3.6.5.2). Es zeigte sich kein Unterschied im Absterbeverhalten von *E. coli* durch die Zugabe von antibiotikumbehandelten Kulturüberständen im Vergleich zu den Kontrollen. Falls Alarmonen in den Kulturüberständen vorhanden gewesen wären, hätten diese einen Effekt auf das Absterbeverhalten von *E. coli* zeigen müssen. Untersuchungen von Nikolaev [Nikolaev, 1996] zeigen, dass das Wachstum von *E. coli* in Gegenwart von Tetrazyklinen zur Bildung von unidentifizierten Komponenten im Medium führt, die einen Teil der Population von der Wachstumsinhibition durch das Antibiotikum schützen.

Die berechneten Absterbekurven des Modells „Alarmon“ zeigen große Abweichungen zu den experimentell ermittelten Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur (vergl. Abschnitt 3.6.5.3). Die große Abweichung kann zum einen durch den fehlenden Term für das logistische Wachstum in dem Modell „Alarmon“ erklärt werden, zum anderen ist es mit Hilfe des mathematischen Modells nicht möglich, ein Wiederaanwachsen der Bakterien zu simulieren.

Zusätzlich wurde die Anpassung des Modells aufgrund der unbekanntenen und experimentell nicht direkt zugänglichen Startwerte für die Parameter γ (Menge an Alarmon pro sterbender Zelle) und A_c (Schwellenwert der Alarmonkonzentration) erschwert. Möglicherweise sind ungeeignete Startwerte für diese beiden Parameter verwendet worden, die nach der Anpassung zu einem negativen Wert für γ und somit auch zu negativen Alarmonkonzentrationen führten (siehe Abbildung 13.18 (a)). γ sollte aber in jedem Fall positiv sein. Werden allerdings die angepassten Parameter und ein positiver γ -Wert für die Berechnung der Absterbekurven herangezogen, so führt dies erwartungsgemäß zu einer schlechteren Anpassung. Dann wird die Alarmonkonzentration des Schwellenwertes sofort bei allen eingesetzten Ciprofloxacinkonzentrationen erreicht, was ein Absterben der Bakterien verhindert (siehe Abbildung 13.18 (b)). Das Modell „Alarmon“ kann das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur nicht beschreiben, da das Modell kein Wiederaanwachsen der Bakterien beschreiben kann, und keine Anpassung des Modells mit positiven Alarmonkonzentrationen möglich ist. Zusätzlich konnte auch kein Alarmon im Medium nachgewiesen werden, die die Annahmen des Modells bestätigen würden.

4.5.6 Modell „Yano“

Das von Yano *et al.* entwickelte mathematische Modell (Gleichung 1.4 – 1.7) ermöglicht die Vorhersage der Wirkung der β -Laktam-Antibiotika Meropenem, Imipenem, Cefpirom, Ceftazidim und eines neuen Carbapenems (S-4661) auf die Erreger *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* [Yano *et al.* 1998].

Hier wird gezeigt, dass das Modell „Yano“ auch die Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur scheinbar ermöglicht (siehe Abbildung 3.19 (a)). Allerdings müssen alle Annahmen, die in dem Modell „Yano“ gemacht werden und die publizierten Parametergrößen übernommen werden [Yano *et al.* 1998]. Es konnte jedoch dargestellt werden, dass das Ciprofloxacin während des Versuchszeitraums stabil ist und nicht, wie in dem Modell angenommen wird, zerfällt. Die Stabilität von Ciprofloxacin über 10 Tage bei bis zu 50 °C wird in der Fachinformation von Ciprofloxacin bestätigt [Bayer Vital, 2001]. Wird die Stabilität des Antibiotikums in das Modell integriert, ist die Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* nicht mehr möglich (Abbildung 3.19 (b)). Die berechneten Kurven weichen vor allem im terminalen Teil von den experimentell ermittelten Absterbekinetiken ab. Ein Wiederanwachsen der Bakterien ist nicht möglich, da die Teilpopulation X_1 in Anwesenheit des Antibiotikums stirbt, die Teilpopulation X_2 aber weder wachsen noch sterben kann.

Das Modell „Yano“ zeigt jedoch, dass entweder ein Zerfall des Antibiotikums oder ein Zerfall bzw. Reduktion der Sensibilität nötig ist, der auch als eine Art „Adaptierung“ der Bakterien an das Antibiotikum interpretiert werden kann, um das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur zu beschreiben. Im Modell „Yano“ wird die „Adaptierung“ der Zellen aufgrund des Zerfalls des Antibiotikums „vorgetäuscht“. Dieser Zerfall trifft für die Antibiotika Meropenem, Cefpirom, Ceftazidim und S-4661 gar nicht zu, denn die Hersteller garantieren für die Substanzen eine Stabilität über mindestens 24 h bei Raumtemperatur [www.medizinimdialog.com, 2003]. Obwohl die Annahme des Zerfalls nicht begründet werden kann, ermöglicht sie die Vorhersage der Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* in der Batchkultur. Somit kann das Modell „Yano“ das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur nicht beschreiben.

4.5.7 Modell „Schuck“

Das von Schuck *et al.* [Schuck *et al.* 2002] entwickelte mathematische Modell (Gleichung 1.8 – 1.10) erlaubt eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von

abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell. Eine Übertragung des Modells auf das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur war nicht möglich (vergl. Abschnitt 3.6.7), da die Simulation des Modells unter Verwendung der publizierten Parametergrößen nicht zum publizierten Simulationsergebnis führte. Des Weiteren wurde bei der Simulation des Modells ersichtlich, dass unabhängig von der eingesetzten Initialkonzentration, die Konzentration C_r (Konzentration, die die adaptive Resistenz induziert) zunächst positiv ist, bei der Verzögerungszeit t_{lag} (in der Veröffentlichung $t_{lag} = 4$ h) gleich null ist, und danach negativ wird. Es gibt keine plausible Erklärung für die Annahme, dass C_r keine konstante Konzentration ist, sondern eine Konzentration, die während des Versuchszeitraums abnimmt und nach einer Verzögerungszeit immer negativ wird.

4.5.8 Modell „Mouton“

Das von Mouton [Mouton, 2003b] entwickelte mathematische Modell (Gleichung 1.11) ermöglicht die Vorhersage der Wirkung von konstanten Tobramycin- und Meropenemkonzentrationen auf *P. aeruginosa*.

Der Versuch, mit Hilfe des Modells „Mouton“ das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur zu beschreiben, (Abbildung 3.23) zeigt, dass eine Übertragung des Modells auf die Antibiotikaklasse der Chinolone nicht möglich ist. Die große Abweichung zwischen Modell und experimentellen Daten kommt vor allem durch die schlechte Anpassung der berechneten Kurven an die experimentellen Daten bei hohen Ciprofloxacinkonzentrationen zustande. Eine Simulation des Wiederanwachsens der bakteriellen Kultur ist mit Hilfe des Modells „Mouton“ nicht möglich. Für die Entwicklung des mathematischen Modells von „Mouton“ wurden experimentelle Daten herangezogen, in denen das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* bis zu 4 Stunden nach Zugabe der Antibiotika untersucht wurde. In dieser kurzen Zeit wurde die mögliche Existenz von persistierenden Bakterien nicht erkannt und deshalb in dem Modell auch nicht berücksichtigt. Die Verwendung des sigmoidalen E_{max} -Modells für die bakterielle Absterberate anstelle des „normalen“ E_{max} -Modells ermöglicht durch den zusätzlichen Parameter, den Hill-Faktor, eine bessere Anpassung des Modells an das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa*.

Mathematisch bewirkt der Hill-Faktor eine Veränderung der wirksamen Antibiotikumkonzentration, da ein kleiner Hill-Faktor die Wirkung der Antibiotikumkonzentration auf den Erreger reduziert, währenddessen ein großer Hill-Faktor die Wirkung erhöht.

4.5.9 Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ (Gleichung 3.16 – 3.22) ist eine Weiterentwicklung des Modells „Heterogene Population“ (siehe Abschnitt 4.5.4). Dabei wurden die Annahmen des Modells „Heterogene Population“ schrittweise verändert bzw. neue Annahmen in das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ integriert.

Zunächst wurde das Wachstum der Teilpopulationen N_1 und N_2 durch den mathematischen Term für das logistische Wachstum ergänzt. Damit wird das Wachstum der Gesamtpopulation durch die maximale Bakterienanzahl N_{\max} in der Kultur begrenzt. Diese Veränderung ermöglicht eine bessere Anpassung der berechneten Kurve an die experimentell bestimmte Wachstumskontrolle. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen dem Wachstum der Teilpopulation N_2 und dem Wachstum der Teilpopulation N_1 , der durch die Inhibierungskonstante a bestand, entfernt. Das Wachstum der Teilpopulation N_2 wird nun durch die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max 2}$ und die Inhibierungskonstante a_2 beschrieben. Es unterscheidet sich also nicht nur in der maximal spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} von dem Wachstum der Teilpopulation N_1 , sondern auch in der Konstante a .

Eine weitere Veränderung zum Modell „Heterogene Population“ ist die Integration des Terms (e^{-ht}) in Gleichung (3.21). Der Term beschreibt die „Gewöhnung“ bzw. „Adaptierung“ der Teilpopulation N_1 an das Antibiotikum.

Das mathematische Modell soll das Phänomen der Persistenz und der Toleranz von Bakterien beschreiben. Die Gesamtpopulation besteht zum großen Teil aus Zellen, die in Anwesenheit des Antibiotikums sterben. Es findet aber in Abhängigkeit von der Zeit eine Adaptierung der Zellen an das Antibiotikum statt. Die Zellen der Teilpopulation N_1 „gewöhnen“ sich zunehmend an das Antibiotikum und sterben langsamer. Sie sind jedoch nur bei sehr geringen Konzentrationen des Antibiotikums in der Lage zu wachsen. N_1 besitzt im Vergleich zu N_2 eine hohe Wachstumsrate und einen hohen Inhibierungsterm ($e^{-a_1 \cdot c}$). Bei etwas höheren Konzentrationen des Antibiotikums ist kein Wachstum von N_1 mehr möglich. Die Teilpopulation N_2 zeigt eine größere Toleranz gegenüber dem Antibiotikum als die Teilpopulation N_1 . Sie besitzt im Vergleich zu N_1 eine kleinere Wachstumsrate und einen kleineren Inhibierungsterm ($e^{-a_2 \cdot c}$) und ist auch bei höheren Konzentrationen des Antibiotikums zu geringfügigem Wachstum fähig. Bei sehr hohen Konzentrationen des Antibiotikums sterben sie nicht, zeigen aber auch kein Wachstum (siehe Abbildung 13.26 (b)). Mathematisch bewirkt der „Adaptierungsterm“ eine exponentielle Abnahme der wirksamen Antibiotikumkonzentration mit der Zeit.

Für die mechanistische Vollständigkeit des Modells fehlt noch der Term für den Austausch der Teilpopulation von N_1 zu N_2 und von N_2 zu N_1 , wie er in dem Modell „Yano“ durch die Gleichung (1.6) beschrieben wird. Deshalb wurde das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ um den Austausch zwischen den beiden Teilpopulationen, analog zu Gleichung (1.5) und (1.6) im Modell „Yano“, erweitert. Allerdings stellte sich heraus, dass der Austausch das Modell aufgrund der zusätzlichen Parameter nur verkompliziert. Es erfolgt keine Anpassung der Austauschraten. Dies zeigt, dass die Information für die Austauschraten nicht in den Daten enthalten ist (siehe Anhang 7.5). Das bedeutet, dass bei der Anpassung des Modells an die experimentellen Daten die Werte der Austauschraten nicht verändert wurden, obwohl sehr unterschiedliche Größenordnungen für die Austauschraten gewählt wurden. Aus diesem Grund wurde die Annahme des Austausches zwischen den Teilpopulationen wieder eliminiert.

Der Unterschied des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ zu dem Modell „Yano“ besteht darin, dass im Modell „Yano“ eine generelle Abnahme des Antibiotikums aufgrund des Zerfalls angenommen wird. Alle Prozesse, die von der Konzentration des Antibiotikums abhängig sind, werden dadurch beeinflusst. Da im Modell „Yano“ nur das Sterben der Population X_1 von der Konzentration des Antibiotikums abhängig ist, wird nur diese von dem Zerfall des Antibiotikums beeinflusst. Aus diesem Grund ist eine gute Anpassung des Modells „Yano“ an die experimentellen Daten möglich. Wie aber gezeigt werden konnte, ist auch das Wachstum von der Konzentration des Antibiotikums abhängig.

Das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ ermöglicht eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur. Abbildung 13.26 (a) zeigt eine gute Anpassung der durch das Modell berechneten Kurven an die experimentell ermittelten Daten. Die Simulation des Wiederauwachsens der Bakterien erfolgt in dem Modell aufgrund der Teilpopulation N_2 und ist auch bei höheren Konzentrationen des Antibiotikums möglich. Bei der 16-fachen und der 32-fachen MHK sind die Konzentrationen allerdings so hoch, dass ein Wachstum der Teilpopulation N_2 nicht mehr möglich ist. Bei diesen hohen Konzentrationen zeigt das Modell auch eine weniger gute Anpassung der berechneten Kurven an die geringen Zellzahlen zwischen 1 und 10 KBE/mL. Hier ist die berechnete Zellzahl der Teilpopulation N_2 zu groß. Abbildung 13.26 (b) zeigt, dass die Teilpopulation N_1 aufgrund der hohen Konzentration des Antibiotikums abgestorben ist. N_2 überlebt bei diesen hohen Konzentrationen, kann aber nicht mehr wachsen. Die Zellzahl von N_2 wird durch das Verhältnis v von N_1 zu N_2 bestimmt. Wäre v größer, wären weniger Zellen von N_2 vorhanden und eine bessere Anpassung an geringere Zellzahlen möglich. Die Folge wäre aber eine schlechtere Anpassung bei geringeren Konzentrationen des

Antibiotikums. Ebenfalls wird die Zellzahl von N_2 natürlich auch durch dessen Wachstum bestimmt. Hier ist der Term ($e^{-a_2 \cdot c}$) (vergl. Gleichung (3.19)) im wesentlichen für die hohen Zellzahlen bei hohen Antibiotikakonzentrationen verantwortlich, da er das Wachstums bei hohen Antibiotikakonzentrationen inhibiert.

Eine bessere Anpassung an diese geringen Zellzahlen wäre eventuell möglich durch die Integration einer dritten Teilpopulation in das Modell, die in sehr geringen Zellzahlen, zwischen 1 und 10 KBE/mL, vorkommt. Die Größe der Teilpopulation N_3 wird durch den Austausch zur Teilpopulation N_2 bestimmt. N_2 müsste in Anwesenheit des Antibiotikums sterben, denn sonst hätte N_3 keinen Vorteil gegenüber N_2 . Dabei müsste N_2 aber weniger empfindlich auf das Antibiotikum reagieren als N_1 . Das Modell würde den wahren Ereignissen, die nach der Einwirkung eines Antibiotikums auf eine Bakterienpopulation eintreten, wahrscheinlich sehr nahe kommen. Das mathematische Modell wäre dann aber erheblich komplexer und viele Parameter in dem Modell wären enthalten, deren Größenordnung nur äußerst ungenau geschätzt werden könnten.

Die Simulation des hier vorgestellten Modells zeigt nur eine geringfügig bessere Anpassung der berechneten Kurven an die geglätteten Daten als an die Originaldaten von *E. coli*, die unter Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur bestimmt wurden. Somit ermöglicht das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ die Vorhersage der tatsächlichen Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli*.

Die Übertragung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ auf das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung von Moxifloxacin, Tobramycin und Ampicillin zeigt, dass eine Vorhersage der Wirkung der Antibiotika auf *E. coli* in der Batchkultur mit Hilfe des Modells möglich ist. Obwohl Ampicillin auf das Absterbeverhalten eines Infektionserregers vor allem zeitabhängig wirkt, die Wirkung von Tobramycin und Moxifloxacin aber in erster Linie konzentrationsabhängig ist, ist es mittels des Modells möglich, das Absterbeverhalten von *E. coli* für alle drei Antibiotikaklassen zu beschreiben. Durch die Anpassung des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von Ampicillin wurde für h ein negativer Wert berechnet. Das bedeutet, dass die Zellen sich nicht an das Antibiotikum gewöhnen, sondern empfindlicher gegenüber dem Antibiotikum werden. Mathematisch betrachtet ist die wirksame Antibiotikumkonzentration höher als die tatsächliche Antibiotikumkonzentration und wirkt der Adaptierung entgegen. Dies wird in Abbildung 3.30 anhand der berechneten Absterbekurven von *E. coli* nach Einwirkung von Ampicillin deutlich. Die initiale Abtötungsgeschwindigkeit ist sehr groß. Aufgrund der relativ hohen Wachstumsrate $\mu_{\max 2}$ der Teilpopulation N_2 aber ist ein rasches Wiederaanwachsen der Bakterien im Modell möglich. Das rasche Wiederaanwachsen der

Bakterien im Modell wird jedoch nicht durch die experimentellen Daten gestützt. Gerade bei der Konzentration der MHK erfolgt das Wiederanwachsen der Bakterien erst zwischen den Stunden 6 und 24, während die berechneten entsprechenden Kurven ein Wiederanwachsen der Bakterien nach 3 Stunden anzeigen. Alle anderen Kurven zeigen aber eine befriedigende Anpassung an die experimentellen Daten.

Somit ist es allein durch Variation der Parameter möglich, das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung der Antibiotika in der Batchkultur zu beschreiben. Allerdings zeigen die Anpassungen des Modells an das Absterbeverhalten von *E. coli* nach Einwirkung der anderen Antibiotika wie bei Ciprofloxacin eine schlechtere Anpassung bei hohen Konzentrationen und geringeren Zellzahlen. Der Grund ist auch hier die zu hohe Zellzahl der Teilpopulation N_2 (siehe oben).

Für die Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ an das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur wurde die bakterielle Wachstumsrate $\mu_{\max 1}$ und die maximale Bakterienanzahl N_{\max} in der Kultur anhand der Wachstumskontrolle von *S. aureus* neu bestimmt. Trotzdem ist eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur mit Hilfe des Modells nur eingeschränkt möglich. Das könnte an der schlechteren Wirksamkeit von Ciprofloxacin auf *S. aureus* liegen. Geringe Konzentrationen zeigen keinen Effekt auf *S. aureus*, während bei höheren Konzentrationen schnell eine Sättigung auf niedrigem Niveau eintritt. Somit kann das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin nicht allein durch Variation der Parameter in dem Modell beschrieben werden. Wahrscheinlich müssen andere mathematische Terme, z. B. solche für den Eagle Effekt, in das Modell integriert werden, um das Absterbeverhalten von *S. aureus* zu beschreiben. Untersuchungen von Yano *et al.* [Yano *et al.* 1998] zeigen allerdings, dass durch Variation der Parameter in dem Modell „Yano“ sowohl das Absterbeverhalten von *E. coli*, als auch das Absterbeverhalten von *S. aureus* und *P. aeruginosa* nach Einwirkung verschiedener β -Laktam-Antibiotika reproduziert werden kann. Jedoch wurden für die Entwicklung des Modells „Yano“ experimentelle Daten herangezogen, die über 24 Stunden pro Absterbekurve nur drei bis maximal fünf Messpunkte enthalten. Bei drei experimentell bestimmten Messpunkten ist eine Beurteilung, ob der berechnete Kurvenverlauf die experimentellen Daten befriedigend beschreiben kann, nicht möglich [Yano *et al.* 1998].

4.5.10 Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“

Das Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ wurde für die Übertragung des Modells auf das Absterbeverhalten von *E. coli* bei abnehmender Ciprofloxacinkonzentration im in-vitro

Modell in das Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ verändert. Dieses Modell enthält eine weitere Gleichung, die den exponentiellen Abfall des Antibiotikums in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt. Dafür wurde in Gleichung (3.18) der Term (e^{-ht}), der die Adaptierung der Zellen an das Antibiotikum beschreibt, entfernt. Dadurch wurde das Modell um einen Parameter reduziert, was ein Anpassung des Modells an die experimentellen Daten erleichtert. Die Adaptierung der Zellen an das Antibiotikum ist aber nach wie vor gegeben, da die eingesetzten Zellen die gleichen sind wie in der Batchkultur. Nur ist die Adaptierung in dem Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ aufgrund der exponentiellen Antibiotikumabnahme weniger wichtig. Zusätzlich ist aufgrund der abnehmenden Konzentration im Versuch auch die Zeitkonstante t in dem Term (e^{-ht}) durch die Daten nur ungenügend ermittelbar.

Die Wirkung der abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell kann weder mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ noch mit Hilfe des Modells „Yano“ berechnet werden. Die Anpassung der Modelle an die experimentellen Daten zeigt eine systematische Abweichung der berechneten Kurven von den experimentellen Daten. Die Wirkung des Antibiotikums im in-vitro Modell auf einen Erreger wird offenbar durch weitere Faktoren bestimmt. Dies zeigt auch Tabelle 3.2. Obwohl gleiche Substanzmengen von Ciprofloxacin im in-vitro Modell und in der Batchkultur verwendet wurden, ist die Wirkung auf *E. coli* sehr unterschiedlich (siehe oben Abschnitt 4.2).

Ähnliche Ergebnisse sind bei *S. aureus* zu beobachten. Die Wirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell kann mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ nicht berechnet werden. Eine bessere, aber nicht zufriedenstellende Vorhersage der Wirkung von Ciprofloxacin im in-vitro Modell auf *S. aureus* ist mit Hilfe des Modells „Yano“ möglich. Daraus erschließt sich, dass die Existenz von persistierenden Zellen in dem Modell nicht nötig ist, um das Absterbeverhalten von *S. aureus* im in-vitro Modell zu berechnen. Das Wiederanwachsen und das Überleben der Zellen bei hohen Ciprofloxacinkonzentrationen lässt sich durch die Eliminierung des Antibiotikums ausreichend beschreiben, wenn dies auch nicht mechanistisch erklärbar ist.

Die Parameter, die nach der Anpassung berechnet wurden, sind zum Teil sehr unrealistisch. Die Wachstumsrate $\mu_{\max 2}$ von *E. coli* ist um den Faktor 16 und bei *S. aureus* um den Faktor 2,7 größer als $\mu_{\max 1}$. Auch die hohen E_{\max} und EC_{50} Werte sind nicht realistisch und zeigen die schlechte Anpassung des Modells an die experimentellen Daten. Die Anpassung des Modells „Yano“ an die experimentellen Daten, die im in-vitro Modell bestimmt wurden, zeigen ebenfalls unrealistisch hohen maximal spezifischen Wachstumsraten. Somit kann weder mit dem Modell

„Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ noch mit dem Modell „Yano“ das Absterbeverhalten von *E. coli* und *S. aureus* nach Einwirkung von Ciprofloxacin im in-vitro Modell beschrieben werden.

4.5.11 Modelle im Überblick

Tabelle 3.3 zeigt alle in dieser Arbeit entwickelten und publizierten Modelle im Überblick. Dabei wurde die Benennung der Parameter vereinheitlicht, damit ein besserer Vergleich der einzelnen Modelle möglich ist.

In der Tabelle ist die schrittweise Reduzierung der Standardabweichung der Residuen bei den entwickelten mathematischen Modellen „Alarmon“, „Heterogene Population“, und „Heterogene Population mit Adaptierung“ zu beobachten. Damit einher geht eine bessere Vorhersage der Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* in der Batchkultur. Tabelle 3.3 zeigt auch, dass eine universelle Anwendung der mathematischen Modelle „Nolting“ und „Mouton“ nicht möglich ist. Die Optimierungsergebnisse, die mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ nach der Anpassung an die experimentellen Daten in der Batchkultur berechnet wurden, sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Ein Parametervergleich von *E. coli* zeigt zum Teil Schwankungen in der Größenordnung der einzelnen Parameter.

Obwohl der Parameter $\mu_{\max 1}$ in allen Modellanpassungen gleich sein sollte, da immer der gleiche Bakterienstamm verwendet wurde, schwankt dieser Parameter um den Faktor 1,65. Der Parameter $\mu_{\max 1}$ ist aber mit dem Parameter a_1 gekoppelt. Eine Veränderung von $\mu_{\max 1}$ könnte daher durch eine Veränderung von a_1 kompensiert werden. Das gleiche gilt für $\mu_{\max 2}$ und a_2 . Indem aber auch der zusammengefasste Wert von μ und a im Extremfall um den Faktor 19 schwankt, lassen sich die Schwankungen der einzelnen maximalen Wachstumsraten nicht erklären.

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkung der Antibiotika ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Parameter E_{\max} , EC_{50} , und h schwanken. Sie sollten für jedes Antibiotikum spezifisch sein und durch ihre Variation das Beschreiben der Absterbekinetiken eines Erregers durch die Einwirkung von unterschiedlichen Antibiotika ermöglichen.

N_{\max} wurde in allen Anpassungen konstant gehalten, da diese Größe bei einem Bakterienstamm immer gleich hoch sein sollte. Deshalb schwankt dieser Parameterwert nicht. Der Parameter v , der das Verhältnis der Teilpopulation N_1 zu der Teilpopulation N_2 beschreibt, zeigt leichte Schwankungen um den Faktor von 1,4. v sollte, wenn Persister mit einer Wahrscheinlichkeit von $5,4 \times 10^{-6}$ vorkommen, bei $10^{4,2}$ liegen. Schwankungen in v zwischen $10^{4,4}$ und $10^{6,37}$ bedeuten, dass der Anteil der Persister zwischen 400 und 4 Zellen bei einem Ausgangsinokulum von 10^7

KBE/mL schwankt. Dieser Anzahl entspricht etwa die gemessene Anzahl der Persister von 540 KBE/mL.

Die kleinste Standardabweichung der Residuen wurde nach der Simulation des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ berechnet. Dieses Modell ermöglicht somit von den in dieser Arbeit vorgestellten Modellen die beste Vorhersage der Wirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen auf *E. coli* in der Batchkultur.

4.6 Ausblick

Das sogenannte PK/PD-Modeling versucht, durch die Entwicklung eines mathematischen Modells die Wirkung eines Antibiotikums unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik zu beschreiben und somit eine Beurteilung und Vorhersage der Antibiotikawirkung zu ermöglichen. Bislang sind nur wenige mathematische Modelle in der Literatur beschrieben, die zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika herangezogen werden können.

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ ermöglicht die Vorhersage der Wirkung von Antibiotika aus unterschiedlichen Antibiotikaklassen auf *E. coli* bei konstanten Konzentrationen in der Batchkultur. Die Übertragung des Modells auf andere Spezies erfolgte in dieser Arbeit nur mit Hilfe des gram-positiven Erregers *S. aureus*. Die Ausdehnung des Modells auf andere Antibiotikaklassen und auch auf andere Spezies würde zeigen, ob das Modell eine universelle Anwendung bei konstanten Antibiotikakonzentrationen in der Batchkultur erlaubt.

Eine Vorhersage der antibakteriellen Wirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen auf *E. coli* und *S. aureus* im in-vitro Modell war mit Hilfe des Modells „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ nicht möglich. Innerhalb dieser Arbeit konnte das Modell nicht in der Form verändert werden, dass eine Vorhersage der Wirkung von Ciprofloxacin auf *E. coli* und *S. aureus* im in-vitro Modell mit Hilfe des Modells möglich war. Allerdings wäre wahrscheinlich durch Integration weiterer Terme in das Modell auch eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von Bakterien unter Einwirkung von Antibiotika im in-vitro Modell möglich. Dabei wäre die Vorhersage der Wirkung von Antibiotika auf Bakterien während der Einwirkung eines humanen Konzentrations-Zeit-Verlaufes für die Optimierung von Antibiotikatherapien von großer Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Für die Vorhersage der Wirkung von einzelnen Antibiotikaklassen sollte ein mathematisches Modell entwickelt werden, das die Berechnung des Absterbeverhaltens von einer Spezies von Infektionserregern nach Einwirkung eines Antibiotikums ermöglicht. Grundlage für dieses mathematische Modell bilden experimentell ermittelte Absterbekinetiken, die bei konstanten Antibiotikakonzentrationen in der Batchkultur und bei abnehmenden Antibiotikakonzentrationen im in-vitro Modell bestimmt wurden. Das Absterbeverhalten von *E. coli* konnte nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacin-, Moxifloxacin-, und Ampicillinkonzentrationen in der Batchkultur nicht eindeutig in eine konzentrationsabhängige oder zeitabhängige Wirkung der Antibiotika zugeordnet werden. Dieses gilt auch für das Absterbeverhalten von *S. aureus* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen. Nur Tobramycin zeigte eine eindeutig konzentrationsabhängige Wirkung auf *E. coli*. Weiterhin überlebten trotz hoher Antibiotikakonzentrationen eine geringe Anzahl von *E. coli*- und *S. aureus*-Zellen in der Batchkultur. Diese persistierenden Bakterien zeigten nach der Einwirkung des Antibiotikums keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum. Der Anteil der persistierenden Bakterien in der Batchkultur nach Einwirkung von einer Ciprofloxacinkonzentration, die der 32-fachen MHK von *E. coli* entspricht, wurde mit einer relativen Häufigkeit von $5,4 \times 10^{-5}$ in der Gesamtpopulation bestimmt.

Um zu überprüfen, ob bereits bestehende mathematische Modelle die Wirkung von Ciprofloxacin beschreiben können, wurde dies zunächst anhand des Absterbeverhaltens von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur untersucht. Aufgrund von Limitierungen in den Modellen „Nolting“, „Yano“ und „Mouton“ war eine Vorhersage der Wirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen auf *E. coli* nicht möglich. Dieses begründet sich einerseits darin, dass die Wachstumsrate des Erregers nicht wie in den Modellen angenommen von der Konzentration des Antibiotikums unabhängig ist, und andererseits ist für die Berechnung der Absterbekinetiken die Existenz von Persistenzern nötig.

Bei der Entwicklung eines mathematischen Modells zeigte sich, dass das entwickelte Modell „Alarmon“ nicht die Wirkung von *E. coli* nach Einwirkung von konstanten Ciprofloxacinkonzentrationen in der Batchkultur vorhersagen kann, da das Modell ein Wiederaanwachsen der Bakterien nicht beschreiben kann. Des Weiteren konnten experimentell keine Alarme im Kulturmedium nachgewiesen werden.

Hingegen konnte das entwickelte Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ die Wirkung von konstanten Ciprofloxacin-, Moxifloxacin-, Tobramycin- und Ampicillinkonzentrationen auf

E. coli berechnen. Durch Integration von mathematischen Termen in das Modell, die die Existenz von persistierenden Bakterien und eine antibiotikum-abhängige Wachstumsrate beschreiben, ist eine Vorhersage des Absterbeverhaltens von *E. coli* unter Einwirkung der Antibiotika über 24 Stunden möglich.

Die Berechnung des Absterbeverhaltens von *E. coli* und von *S. aureus* nach Einwirkung von abnehmenden Ciprofloxacinkonzentrationen im in-vitro Modell war mit den Annahmen in dem Modell „Heterogene Population mit Antibiotikumabnahme“ nicht möglich.

6. Literatur

Ambrose PGJ, Owens RC, Grasela D. 2000.

Antimicrobial pharmacodynamics. *Med.Clin.North Am.*2000.Nov.;84.(6.):1431.-46. 2000; 84 (6) :1431-46.

Amsterdam D. 1996.

Lorian V, editors. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins; 1996; 2, Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. p. 52-111.

Athur M, Courvalin P. 1993.

Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1993; 37 :1563-71.

Bauernfeind A. 1993.

Resistenz gegenüber Makroliden. *Chemotherapie Journal* 1993; 2. Jahrgang (Suppl.2) :23-7.

Bayer Vital. 2001.

Ciprobay 250/ -500/ -750. Fachinformation 2001; 0394-U725 :1-6.

Belland RJ, Morrison SG, Ison C, Huang WM. 1994.

Neisseria gonorrhoeae acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol.Microbiol.* 1994; 14 (2) :371-80.

Bigger JW. 1944.

Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancett* 1944; ii :497-500.

Bourne DWA. 1995.Mathematical modeling of pharmacokinetic data. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc.; 1995. 1p.

Brock T.D.; Madigan MT; Martinko JM, et al. 2002.

Mikrobiologie. 1. Nachdruck ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; 2002. 64p.

Coleman T; Branch MA; Grace A. 1999.

Optimization Toolbox User's Guide for use with MatLab. 2. Version ed. Natick, Ma, U.S.: The MathWorks, Inc.; 1999.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999.

Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284 (5418) :1318-22.

Craig WA, Ebert SC. 1991.

Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl.* 1991; 74:63-70. 63-70.

Craig WA. 1995.

Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 1995; 22 (1-2) :89-96.

Dalhoff A, Matutat S, Ullmann U. 1995.

Effect of quinolone against slowly growing bacteria. *Chemotherapy* 1995; 41 :92-9.

Dalhoff A. 1999.

Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *J.Antimicrob.Chemother.* 1999; 43 Suppl B:51-9. 51-9.

Dalhoff A, Schmitz FJ. 2003.

In vitro antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2003; 22 :203-21.

Davis B.D. 1988.

The lethal action of aminoglycosides. *J.Antimicrob.Chemother.* 1988; 22 :1-3.

Debbia EA, Roveta S, Schito AM, Marchese A. 2001.

Antibiotic persistence: The role of spontaneous DNA repair response. *Microb.Drug Resist.* 2001; 7 (4) :335-42.

Derendorf H; Gramatte T; Schäfer HG. 2002.Pharmakokinetik. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2002. 278p.

Deutsches Institut für Normung e.V. 2000.

Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Deutsche Norm 2000; DIN 58940 (Teil 4) :4

Diver JM, Wise R. 1986.

Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* 1986; 18 Suppl D:31-41. 31-41.

Eagle H. 1948.

Speculation as to the therapeutic significance of the penicillin blood level. *Ann.Int.Med.* 1948; 28 :260-78.

Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. 1950.

The bactericidal action of pncillin in vivo: the participation of the host, and the slow recovery of the surviving organisms. *Ann.Int.Med.* 1950; 33 :544-71.

Eagle H. 1952.

Experimental approach to the problem of treatment with penicillin. *Amer.J.Med.* 1952; 13 :389-98.

Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. 1991.

Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards Ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J.Antimicrob.Chemother.* 1991; 27 :177-84.

Fan JY, Sun D, Yu H, Kerwin SM, Hurley LH. 1995.

Self-assembly of a quinobenzoxazine-Mg²⁺ complex on DNA: a new paradigm for the structure of a drug-DNA complex and implications for the structure of the quinolone bacterial gyrase-DNA complex. *J.Med.Chem.* 1995; 38 (3) :408-24.

- Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, Blanche F. 1994.** Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol.Microbiol.* 1994; 13 (4) :641-53.
- Firsov AA, Vostrov SN, Shevchenko AA, Zinner SH, Cornaglia G, Portnoy YA. 1998.** MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an in vitro dynamic model. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1998; 42 (11) :2848-52.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. 1998.** Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1998; 62 (4) :1371-414.
- Gormley NA, Orphanides G, Meyer A, Cullis PM, Maxwell A. 1996.** The interaction of coumarin antibiotics with fragments of DNA gyrase B protein. *Biochemistry* 1996; 35 (15) :5083-92.
- Grasso S, Meinardi G, de Carneri I, Tamassia V. 1978.** New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1978; 13 (4) :570-6.
- Heisig P, Wiedemann B. 2001.** [Action and reaction. Actions and resistance mechanisms of quinolone]. *Pharm.Unserer.Zeit* 2001.;30.(5.):382.-93. 2001; 30 (5) :382-93.
- Hoang AD, Peterson M, Hovde LB, Wright DH, Rotschafer JC . 1999.** Investigation of AUC/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* using trovafloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin and levofloxacin in an in vitro pharmacodynamic model. *American Society for Microbiology* 1999; 5
- Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. 1942.** Observation on the mechanism of action of penicillin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1942; 50 :281-5.
- Holm SE, Odenholt Tornqvist I, Cars O. 1991.** Paradoxical effects of antibiotics. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl.* 1991; 74 (Suppl.) :113-7.
- Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato J, Ikeda H. 1994.** Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1994; 38 (11) :2623-7.
- Höltje JV, Heidrich C. 2001.** Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* 2001.Jan.;83.(1.):103.-8. 2001; 83 (1) :103-8.
- Hyatt JM, Nix DE, Schentag JJ. 1994.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1994; 38 (12) :2730-7.
- Jacobs MR. 2001.** Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin.Microbiol.Infect.* 2001; 7 (11) :589-96.

Jaehde U; Radziwill R; Mühlebach S, Schunack W. 1998.

Lehrbuch der klinischen Pharmazie. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1998. 49p.

Kayser FH; Bienz KA; Eckert J, Zinkernagel RM. 1998.

Medizinische Mikrobiologie. 9. Auflage ed. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 1998. 291p.

Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. 1995.

Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1995; 92 (25) :11801-5.

Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. 2001.

Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control. Antimicrob.Agents Chemother. 2001; 45 (3) :815-24.

Kratz B, Wiedemann B. 1992.

Antibakterielle Aktivität von Chemotherapeutika. Chemotherapie Journal 1992; Heft 4 :151-5.

Kratz, B. 1992.

Analyse der Absterbekinetik von *Escherichia coli* unter dem Einfluß von Ciprofloxacin 1992; Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn;

Labischinski H, Goodell EW, Goodell A, Hochberg ML. 1991.

Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. J.Bacteriol. 1991; 173 (2) :751-6.

Lengeler JW; Drews G; Schlegel HG. 1999.Biology of Prokaryotes. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 1999. 498p.

Lenski RE, Hattingh SE. 1986.

Coexistence of two competitors on one resource and one inhibitor: a chemostat model based on bacteria and antibiotics. J.Theor.Biol. 1986; 122 (1) :83-93.

Lewis K. 2000.

Programmed death in bacteria. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 2000; 64 (3) :503-14.

Löwdin E, Odenholt I, Bengtsson S, Cars O. 1996.

Pharmacodynamic effect of sub-MICs of benzylpenicillin against *Streptococcus pyogenes* in a new developed in vitro kinetic model. Antimicrob.Agents Chemother. 1996; 40 :2478-82.

Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. 1998.

Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. Trends.Genet. 1998; 14 (10) :410-6.

Mizushima T, Matsuo M, Sekimizu K. 1997.

Induction of DnaK and GroEL heat shock proteins by fluoroquinolones in *Escherichia coli*. Antimicrob.Agents Chemother. 1997; 41 (1) :193-5.

Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. 2002.

Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. Int.J.Antimicrob.Agents 2002; 19 (4) :355-8.

Mouton JW. 2002.

Breakpoints: current practice and future perspectives. *Int.J.Antimicrob.Agents* 2002; 19 (4) :323-31.

Mouton, JW. 2003.

The relationship between bacterial killing, the MIC, PK/PD indices and antibacterial effect. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2003;

Mouton, JW. 2003.

May 11; 13th European Congress of Chemotherapy and Infectious Diseases.

Moyed HS, Bertrand KP. 1983.

hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J.Bacteriol.* 1983; 155 (2) :768-75.

Mutschler E; Geisslinger G; Kroemer HK, et al. 2001.

Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2001. 801p.

Naber KG, Wiedemann B. 1994.

Bewertungskriterien für die antibakterielle Chemomtherapie. *Chemotherapie Journal* 1994; 2 :47-52.

Nikaido H, Vaara M. 1985.

Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol.Rev.* 1985; 49 (1) :1-32.

Nikolaev IA. 1992.

Distant interactions between bacterial cells. *Mikrobiologiia.* 1992; 61 (6) :1066-71.

Nikolaev IA. 1996.

[Protective effect of a tetracycline-sensitive strain of *Escherichia coli* on the growth of a tetracycline-resistant strain in the presence of tetracycline in a coculture]. *Mikrobiologiia.* 1996; 65 (6) :745-8.

Nikolaev IA. 1996.

[Multiple protective effect of an exometabolite (exometabolites) released by *Escherichia coli* during treatment with tetracycline]. *Mikrobiologiia.* 1996; 65 (6) :749-52.

Nolting A, Dalla CT, Rand KH, Derendorf H. 1996.

Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin in vitro. *Pharm.Res.* 1996; 13 (1) :91-6.

Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. 1999.

Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1999; 399 (6736) :590-3.

Odenholt I, Holm SE, Cars O. 1989.

Paradoxical effect of Cloxacillin and Benzylpenicillin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 1989; 35 :345-50.

Petersen U. 2001.

[The evolution of quinolone: from nalidixic acid to the quinolones of the third generation]. Pharm.Unserer.Zeit 2001.;30.(5.):376.-81. 2001; 30 (5) :376-81.

Rogers HJ, Forsberg CW. 1971.

Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J.Bacteriol. 1971; 108 :1235-43.

Rowbury RJ. 2001.

Extracellular sensing components and extracellular induction component alarmones give early warning against stress in *Escherichia coli*. Adv.Microb.Physiol.2001.;44.:215.-57. 2001; 44:215-57. 215-57.

Rustige C, Wiedemann B. 1990.

Antibacterial activity of lomefloxacin in a pharmacokinetic in vitro model. Antimicrob.Agents Chemother. 1990; 34 (6) :1107-11.

Rustige, C. 1991.

Pharmakodynamik von 4-Chinolonen 1991; Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn;

Salisbury V, Pfoestl A, Wiesinger-Mayr H, Lewis R, Bowker KE, MacGowan AP. 1999.

Use of a clinical *Escherichia coli* isolate expressing *lux* genes to study the antimicrobial pharmacodynamics of moxifloxacin. J.Antimicrob.Chemother. 1999; 43 :829-32.

Sanchez-Navarro A, Sanchez RM. 1999.

Basis of anti-infective therapy: pharmacokinetic-pharmacodynamic criteria and methodology for dual dosage individualisation. Clin.Pharmacokinet. 1999; 37 (4) :289-304.

Scaglione F. 2002.

Can PK/PD be used in everyday clinical practice. Int.J.Antimicrob.Agents 2002; 19 (4) :349-53.

Schentag JJ, Nix DE, Adelman MH. 1991.

Mathematical examination of dual individualization principles (I): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin, and tobramycin. DICP. 1991; 25 (10) :1050-7.

Schentag JJ, Nix DE, Forrest A, Adelman MH. 1996.

AUIC--the universal parameter within the constraint of a reasonable dosing interval. Ann.Pharmacother. 1996; 30 (9) :1029-31.

Schentag JJ, Gilliland KK, Paladino JA. 2001.

What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? Clin.Infect.Dis.2001.Mar.15.;32.Suppl.1.:S39.-46. 2001; 32 Suppl 1:S39-46. S39-S46

Schlegel HG. 1992.

Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage ed. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 1992. 89p.

Schuck EL, Dalhoff A, Stass H, Derendorf H. 2002. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) evaluation of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. [Abstract] 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002;(27-30 September 2002)A-1254

Shah P, Troche G, Stille W. 1979.

Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime. *J.Antimicrob.Chemother.* 1979; 5 :419-22.

Shah P, Muller S, Kipp J, Stille W. 1989.

In vitro activity of lomefloxacin (NY-198 or SC 47111). *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 1989; 12 (Suppl.3) :97S-101S.

Simon C; Stille W. 1997.

Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 9. Auflage ed. Stuttgart; Germany: F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH; 1997. 44p.

The MathWorks. 2000.

MATLAB - The language of technical computing; using MATLAB. Natick, MA 01760-2098: The MathWorks Inc.; 2000.

The MathWorks. 2000.

Statistics Toolbox for use with MATLAB, User's guide. Natick, MA 01760-2098: The MathWorks, Inc.; 2000.

Tornaletti S, Pedrini AM. 1988.

Studies on the interaction of 4-quinolones with DNA by DNA unwinding experiments. *Biochim.Biophys.Acta* 1988; 949 (3) :279-87.

Vincent S, Glauner B, Gutmann L. 1991.

Lytic effect of two fluoroquinolones, ofloxacin and pefloxacin, on *Escherichia coli* W7 and its consequences on peptidoglycan composition. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1991; 35 (7) :1381-5.

Vosberg HP. 1985.

DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1985; 114:19-102. 19-102.

Watt PM, Hickson ID. 1994.

Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem.J.* 1994; 303 (Pt 3) :681-95.

Wiedemann B; Lode H; Naber KG. 1990.

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, editor.Parameter für die Beurteilung der Erregerempfindlichkeit. 9-2 ed. München: Futuramed Verlag GmbH; 1990. VIIp.

Wiedemann B, Barger A, Fuhst C. 2003.

Pharmakologische Indizes in der Antibiotika-Therapie. *Chemotherapie Journal* 2003; 12 (2) :45-50.

Wolfson JS, Hooper DC, Shih DC, McHugh GL, Schwartz MN. 1989.

Isolation and characterization of an *Escherichia coli* strain exhibiting partial tolerance to quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1989; 33 :705-9.

www.medizinimdialog.com 2003.

Internet Seite

Yano Y, Oguma T, Nagata H, Sasaki S. 1998.

Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics. *J.Pharm.Sci.* 1998; 87 (10) :1177-83.

Yourassowsky E, Van der Linden MP, Crokaert F, Glupczynski Y. 1986.

In-vitro activity of pefloxacin compared to other antibiotics. *J.Antimicrob.Chemother.* 1986; 17 (Suppl.B) :19-28.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAC	Fläche über der bakteriellen Absterbekurve
Abb.	Abbildung
AR	Absterberate
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve
C_{\max}	maximale Plasmaspiegel
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
DIN	Deutsches Institut für Normung
F	Fehlerquadrat
FR	Flussrate
h	Stunde
i.v.	intravenös
K	Kontrolle
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBE/mL	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
k_e	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
kg	Kilogramm
L	Liter
$\log \Delta$ KBE/mL	Differenz zwischen dem Logarithmus der ermittelten Keimzahl und dem Logarithmus der Ausgangskeimzahl
MHK	minimale Hemmkonzentration
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mg	Milligramm
mL	Milliliter
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
OD ₅₆₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm
PBPs	Penicillin-Binde-Proteine
PD	Pharmakodynamik
PI	Pharmakologische Indices

PK	Pharmakokinetik
p.o.	per oral
R _{max}	maximale Keimzahlreduktion
R _{2h}	Keimzahlreduktion nach 2 Stunden
S	Standardabweichung der Residuen
t _{1/2}	Eliminationshalbwertszeit
T _{>MHK}	Zeitraum ab Versuchsbeginn in dem der simulierte Plasmaspiegel über der MHK des Erregers liegt
Tab.	Tabelle
ÜN	Übernachtskultur
ÜN+CIP	Ciprofloxacin-behandelte Übernachtskultur
ÜN-CIP	Übernachtskultur ohne Ciprofloxacin
WR	Wachstumsrate

7.2 Parameterverzeichnis der mathematischen Modelle

E_{\max} - Modell

E	Effekt
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist
C	Konzentration des Antibiotikums

Sigmoidales E_{\max} - Modell

E	Effekt
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für den halbmaximalen Effekt nötig ist
C	Konzentration des Antibiotikums
n	Hillfaktor

Modell „Nolting“

N	Bakterienanzahl
t	Zeit
k	bakterielle Wachstumsrate
k_{\max}	maximale Absterberate
C(t)	Konzentration des Antibiotikums
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
z	Geschwindigkeitskonstante für die Wachstumsverzögerung (lag-Zeit) der Bakterien

Modell „Heterogene Population“

N_{total}	Anzahl der Bakterien in der gesamten Population
N_1	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_1
N_2	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_2
μ_1	Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
$\mu_{\max 1}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
a	Inhibierungskonstante

k_1	Absterberate der Teilpopulation N_1
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
c	Konzentration des Antibiotikums
μ_2	Wachstumsrate der Teilpopulation N_2
$\mu_{\max 2}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_2

Modell „Alarmon“

N	Anzahl der Bakterien
μ	Wachstumsrate der Bakterien
μ_{\max}	maximal spezifische Wachstumsrate
a	Inhibierungskonstante
k	Absterberate der Bakterien
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
C	Konzentration des Antibiotikums
A	Konzentration des Alarmons
A_c	Schwellenwert der Alarmonkonzentration
γ	Menge an Alarmon pro toter Zelle

Modell „Yano“

X_{total}	Anzahl der Bakterien in der gesamten Population
t	Zeit
X_1	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation X_1
X_2	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation X_2
β	bakterielle Wachstumsrate
B_{\max}	maximale Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der Kultur
k_{\max}	maximale Absterberate
KC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
$C(t)$	Konzentration des Antibiotikums
k_1	Transferrate zwischen der Teilpopulation X_1 und X_2

k_2	Transferrate zwischen der Teilpopulation X_2 und X_1
k_d	Zerfallsrate des Antibiotikums

Modell "Schuck"

N	Bakterienanzahl
t	Zeit
k	bakterielle Wachstumsrate
k_1	maximale Absterberate für initiales Absterben
k_2	permante maximale Absterberate
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
IC_{50}	Konzentration, die den halbmaximalen Adaptierungseffekt bewirkt
C_r	Antibiotikumkonzentration, die die adaptive Resistenz induziert
C	aktive Antibiotikumkonzentration
C_0	initiale Antibiotikumkonzentration
t_{lag}	initialer Zeitfaktor für Wachstumsverzögerung (lag-Zeit)
z	Anpassungsfaktor für die Wachstumsverzögerung (lag Phase) der Bakterien
α	Rate, die die abnehmende adaptive Resistenz beschreibt
k_e	Eliminationskonstante des Antibiotikums

Modell "Mouton"

N	Anzahl der Bakterien
μ	maximale spezifische Wachstumsrate
N_{max}	maximale Bakterienanzahl in der Bakterienkultur
k_{max}	maximaler Effekt
C	Konzentration des Antibiotikums
n	Hillfaktor
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist

Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“

N_{total}	Anzahl der Bakterien in der gesamten Population
N_1	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_1

N_2	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_2
N_{\max}	maximale Anzahl der Bakterien in der Kultur
μ_1	Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
$\mu_{\max 1}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
a_1	Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_1
k_1	Absterberate der Teilpopulation N_1
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
h	Adaptierungsrate
C	Konzentration des Antibiotikums
μ_2	Wachstumsrate der Teilpopulation N_2
$\mu_{\max 2}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_2
a_2	Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_2
k_2	Absterberate der Teilpopulation N_2
v	Verhältnis der Teilpopulation N_1 zur Teilpopulation N_2

Modell „Heterogene Population mit Adaptierung und Antibiotikumabnahme“

N_{total}	Anzahl der Bakterien in der gesamten Population
N_1	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_1
N_2	Anzahl der Bakterien der Teilpopulation N_2
N_{\max}	maximale Anzahl der Bakterien in der Kultur
μ_1	Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
$\mu_{\max 1}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_1
a_1	Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_1
k_1	Absterberate der Teilpopulation N_1
E_{\max}	maximaler Effekt
EC_{50}	Konzentration des Antibiotikums, die für die halbmaximale Wirkung nötig ist
C	Konzentration des Antibiotikums
k_d	Eliminationskonstante des Antibiotikums
μ_2	Wachstumsrate der Teilpopulation N_2
$\mu_{\max 2}$	maximal spezifische Wachstumsrate der Teilpopulation N_2
a_2	Inhibierungskonstante der Teilpopulation N_2

k_2	Absterberate der Teilpopulation N_2
v	Verhältnis der Teilpopulation N_1 zur Teilpopulation N_2

7.3 Bestimmung der Wachstumsrate und der Absterberate

7.3.1 Absterberate

Tab.7.1: Messpunkte aus den Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur, die für die Berechnung der Absterberate verwendet wurden

Konzentration [MHK]	Steigung [h^{-1}]	Messpunkte zur Berechnung der Steigung
0	0	0
0,25	0,45	3 – 6
0,5	1,24	1 - 6
1	1,99	1 - 5
2	1,76	1 – 6
4	3,62	1 – 4
8	9,7	1 + 2
16	9,68	1 + 2
32	9,28	1 - 3

7.3.2 Wachstumsrate

Tab.7.2: Messpunkte aus den Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur, die für die Berechnung der Wachstumsrate verwendet wurden

Konzentration [MHK]	Steigung [h^{-1}]	Messpunkte zur Berechnung der Steigung
0	0,702	1 - 5
0,25	0,33	7 – 9
0,5	0,27	9 + 10
1	0,32	9 + 10
2	0,09	6 – 10
4	0,079	9 + 10
8	0,087	6 – 10
16	0,076	9 + 10
32	0,018	9 + 10

7.4 Vereinfachung der experimentellen Daten

Tab. 7.3: Experimentell ermittelte Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur (Originaldaten)

Zeit [h]	eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK								
	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
0,5	2,90E+07	1,10E+07	4,60E+06	1,50E+05	4,70E+05	2,10E+04	6,00E+01	6,00E+01	1,30E+02
1	8,00E+07	1,20E+07	6,80E+05	9,40E+03	1,80E+04	5,90E+01	2,60E+01	2,00E+01	2,50E+01
1,5	1,40E+08	6,80E+06	1,40E+04	2,00E+03	4,40E+03	6,10E+01	1,40E+01	1,00E+01	1,40E+01
2	2,60E+08	2,00E+06	1,20E+04	1,00E+03	8,20E+02	4,00E+01	5,00E+00	9,00E+00	1,20E+01
3	3,40E+08	1,60E+06	4,40E+03	2,80E+02	5,00E+01	6,50E+01	4,00E+00	9,00E+00	1,70E+01
4	2,30E+08	1,70E+06	9,80E+03	2,70E+02	7,00E+01	9,80E+01	4,00E+00	5,00E+00	2,00E+01
5	6,80E+08	3,30E+06	7,00E+03	2,80E+02	1,50E+02	3,10E+01	5,00E+00	3,20E+01	7,00E+00
6	2,10E+09	8,00E+06	6,30E+03	1,30E+02	1,00E+02	1,50E+01	5,00E+00	5,00E+00	1,90E+01
24	1,30E+09	2,60E+08	4,60E+08	6,00E+07	4,80E+03	4,00E+02	2,33E+02	1,15E+02	4,00E+01

Tab. 7.4: Vereinfachte Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin in der Batchkultur (geglättete Daten)

Zeit [h]	eingesetzte Ciprofloxacinkonzentration als Vielfaches der MHK								
	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
0	1,00E+07	7,94E+06	8,13E+06	1,10E+07	1,29E+07	9,33E+06	4,27E+06	4,17E+06	5,62E+06
0,5	2,88E+07	1,10E+07	4,57E+06	1,51E+05	4,68E+05	2,09E+04	6,03E+01	6,03E+01	1,29E+02
1	7,94E+07	1,20E+07	6,76E+05	9,33E+03	1,82E+04	5,89E+01	2,57E+01	2,00E+01	2,51E+01
1,5	1,41E+08	6,76E+06	1,41E+04	2,00E+03	4,37E+03	6,17E+01	1,41E+01	1,00E+01	1,41E+01
2	2,57E+08	2,00E+06	1,20E+04	1,00E+03	8,13E+02	3,98E+01	5,01E+00	8,91E+00	1,20E+01
3	7,94E+08	1,58E+06	1,00E+04	2,82E+02	5,01E+01	3,13E+01	3,98E+00	8,91E+00	1,70E+01
4	1,12E+09	1,70E+06	9,77E+03	2,69E+02	7,08E+01	2,45E+01	3,98E+00	5,01E+00	2,00E+01
5	1,41E+09	3,31E+06	7,08E+03	2,82E+02	8,51E+01	1,95E+01	5,01E+00	5,01E+00	1,95E+01
6	2,09E+09	7,94E+06	6,31E+03	3,16E+02	1,00E+02	1,51E+01	5,01E+00	5,01E+00	1,91E+01
24	2,09E+09	2,57E+08	4,57E+08	6,03E+07	4,79E+03	3,98E+02	2,34E+02	1,15E+02	3,98E+01

7.5 Anpassung des Modells „Heterogene Population mit Adaptierung“ incl. Austausch zwischen den Teilpopulationen N_1 und N_2

Startwerte: $\mu_{\max 1}=1,97$ [log KBE/mL h], $\mu_{\max 2}=1,38$ [log KBE/mL h], $E_{\max}=25,59$ [log KBE/mL h], $EC_{50}=3,23$ [MHK], $a_1=3,58$ [log KBE/(mL h MHK)], $a_2=0,88$ [log KBE/(mL h MHK)], $h=0,29$ [h⁻¹], $r_1=1,0 \times 10^{-3}$ [h⁻¹], $r_2=0,01$ [h⁻¹], $v=5,50$.

Angepasste Parameterwerte: $\mu_{\max 1}=1,81$ [log KBE/mL h], $\mu_{\max 2}=1,00$ [log KBE/mL h], $E_{\max}=27,51$ [log KBE/mL h], $EC_{50}=3,51$ [MHK], $a_1=4,05$ [log KBE/(mL h MHK)], $a_2=0,68$ [log KBE/(mL h MHK)], $h=0,35$ [h⁻¹], $r_1=3,15 \times 10^{-5}$ [h⁻¹], $r_2=0,02$ [h⁻¹], $v=5,85$.

Standardabweichung der Residuen $S=0,476$.

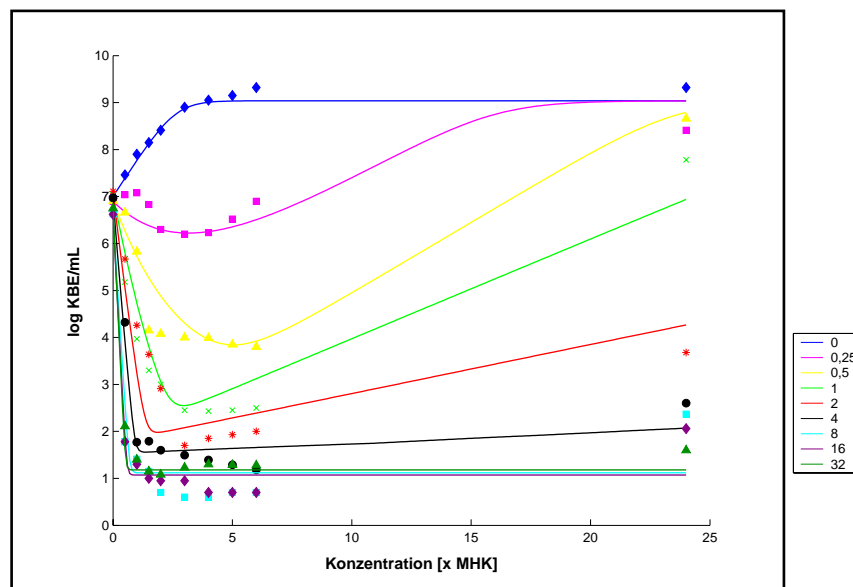


Abbildung 7.1: Berechnete und experimentell bestimmte Absterbekinetiken von *E. coli* durch Einwirkung von Ciprofloxacin mit dem Modell „Heterogene Population mit Adaptierung“ incl. Austausch zwischen den Teilpopulationen N_1 und N_2

7.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Sein stetiges Interesse, sowie seine Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion haben meine Arbeit gefördert und positiv beeinflusst. Die Teilnahme an verschiedenen Kongressen und der Forschungsaufenthalt an der University of Florida in Gainesville während meiner Arbeit haben meine wissenschaftliche Ausbildung sehr gefördert.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Alt möchte ich mich bedanken für die Betreuung im mathematischen Teil meiner Arbeit, für die freundliche Aufnahme als externe Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe und für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. H. Derendorf danke ich für die nette Aufnahme in seine Arbeitsgruppe von Oktober 2000 bis Mai 2001 im Department of Pharmaceutics an der University of Florida in Gainesville, Florida. Das erlernte Wissen, die gewonnenen Einblicke und die geknüpften Kontakte führten zu einer universellen Bereicherung.

Herrn Dr. J. Kreft danke ich ganz besonders für seine starken Nerven, die er während der Betreuung im mathematischen Teil meiner Arbeit gezeigt hat. Sein Interesse an meiner Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft haben nicht nur meine Arbeit sehr positiv beeinflusst, sondern auch mein mathematisches Verständnis und mein „Denken in Matrizen“ gefördert.

Christine Fuhst danke ich für die hilfreichen Ratschläge in allen Lebenslagen während meiner Arbeit, sowie für die vielen gemeinsamen (Labor-)Stunden, für ihr helfende Hand im Labor und für das Korrekturlesen von Seminarvorträgen, Anträgen, Veröffentlichungen und meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. Kunoth und Herrn Prof. Dr. Helfrich sowie Daniel Castello danke für die hilfreichen Tipps beim mathematischen Modelling.

Ich danke allen Mitgliedern der Abteilung „Pharmazeutische Mikrobiologie“ für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft und für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich Beate Henrichfreise und Andrea Schiefer für die vielen interessanten, oft fachunspezifischen Gespräche und Anregungen. Bei Frau B. Bugdaci möchte ich mich bedanken für die Bereitstellung von sterilen Gefäßen und Nährmedien.

Bei Frau Dr. Irith Wiegand möchte ich mich für das Korrekturlesen von Abstracts und Postern, sowie für den besonders netten (Kongress-)Aufenthalt in San Diego/ Kalifornien bedanken.

Jochen Westphal danke ich für das Korrekturlesen, für ein offenes Ohr, für die guten Ratschläge und den hilfreichen Zuspruch in der terminalen Phase meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern für die physische und psychische Unterstützung in Form von Naturalien und durch steten Zuspruch während meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Bei Sieglinde und Jürgen möchte ich mich noch bedanken für die helfenden Hände, die auf Anfrage immer einsatzbereit waren.