

Aus dem
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
(Direktor Prof. Dr. med. habil. Axel Kramer)
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

**Endotoxin-Bindung, bakteriozide Wirksamkeit und Zytotoxizität
silberhaltiger Wundauflagen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Doktorgrades der Medizin
(Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Yvonne Winkler

2010

Wesentliche Teile der Promotionsschrift sind unter folgender Bibliographie bereits veröffentlicht:

Müller G, Winkler Y, Kramer A

Antibacterial activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb[®] Silver 220

Journal of Hospital Infection (2003) 53: 211-214

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Kramer, Greifswald
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann, Berlin
Ort, Raum: Friedrich-Löffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Seminarraum
Tag der Disputation: 23.06.2010

Meiner Mutter,
Erika Braun-Winkler,
in tiefer Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Allgemeines	3
1.2 Wundheilung	3
1.3 Wundauflagen und Antiinfektiva	4
1.4 Wunden und Endotoxine	6
1.4.1 Nachweisverfahren für Endotoxine	8
1.5 Problemstellung und Zielsetzung	9
2 Eigene Untersuchungen	10
2.1 Prüfanliegen	10
2.2 Material	10
2.2.1 Prüfmuster	10
2.2.2 Bakterienstamm	11
2.2.3 Endotoxin	11
2.2.4 Zellen	12
2.2.5 Geräte	12
2.2.6 Verbrauchsmaterial	12
2.2.7 Reagenzien	13
2.2.8 Lösungen und Nährmedien	14
2.3 Methoden	16
2.3.1 LAL-Test	16
2.3.2 Zytotoxizitätstestung im Agarose-Overlay-Test	22
3 Ergebnisse	27
3.1 Ergebnisse aus den LAL-Tests	27
3.1.1 Endotoxin-Standardgerade	27
3.1.2 Vergleich der Endotoxin-Bindungsfähigkeit	27
3.1.3 Endotoxin-Freisetzung bei Exposition der Wundauflagen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Vergleich zur Kontrolle	32
3.2 Vergleich der bakterioziden Wirkung	33
3.3 Vergleich der Zytotoxizität	34
4 Diskussion	35
4.1 Auswahl der Prüfmuster	35

Inhaltsverzeichnis

4.2	Ergebnisse	36
4.3	Schwachpunkte	39
4.4	Schlussfolgerung	41
5	Zusammenfassung/Summary	43
6	Literaturverzeichnis	45
A	Anhang	49
	Eidesstattliche Erklärung	49
	Lebenslauf	50
	Publikationen	50
	Kongressbeiträge	51
	Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Mitglied und Prototyp der Bcl-2-Proteinfamilie; dient der Regulation der Apoptose
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BSA	bovines Serumalbumin
CASO	Caseinpepton/Sojamehlpepton
COX 2	Cyclooxygenase 2
CSA	Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar
CSL	Caseinpepton-Sojapepton-Lösung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> , Zellkultur-Nährlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSM Nr.	Verzeichnisnummer der DSMZ
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbant Assay</i> , immunologisches Nachweisverfahren, auf Basis einer enzymatischen Farbreaktion
EMA	Ethylenmethylacrylat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EU	<i>Endotoxin-Units</i> (Endotoxin-Einheiten [1 EU = 0,09 ng Endotoxin])
FBS	Fötales bovines Serum
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IU	<i>International Unit</i> , internationale Einheit
KbE	Kolonien bildende Einheiten
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysat</i> , Lysat aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses
Ig	Logarithmus zur Basis 10
LPS	Lipopolysaccharid (Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien), Endotoxin
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCMC	Natriumcarboxymethylzellulose
no.	<i>number</i> , Nummer

NCTC	<i>National Collection of Type Culture</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pNA	p-Nitroanilin
PVP-Iod	Povidon-Iod (Poly[1-vinyl-2-pyrrolidon]-Iod-Komplex mit einem Gehalt von 10 % verfügbarem Iod)
QCL	Quantitativer chromogener LAL-Test
RF	Reduktionsfaktor
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response System</i> , systemische, typischerweise entzündliche Abwehrreaktion des Organismus
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Signalmolekül zur Stimulierung von Gefäßneubildung, Migration und Teilung von Endothelzellen
VIS-Licht	„ <i>visible</i> “-Licht, sichtbares Licht
VRE	Vancomycin-resistenter Enterococcus
ZBV	Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Arbeit berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte, eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht in jedem Fall eigens als solche gekennzeichnet sind.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Haut erfüllt wichtige Funktionen wie Sensibilität und Regulation der Körpertemperatur. Sie schützt ihren Träger vor Infektionen und anderen Umwelteinflüssen. Je nach Größe greift eine Verletzung der Körperoberfläche in diese Funktionen mehr oder weniger stark ein. Hinzu kommen unter Umständen mit der Verletzung einhergehende Schmerzen.

Die Art der Wunden ist vielfältig. Neben Hauterkrankungen, mikro- bzw. makroangiopathisch bedingten Ulzera, infizierten Dekubitalulzera und sekundär heilenden Wunden nach operativen Eingriffen finden wir andere, durch mechanische, chemische oder radiogene Einflüsse entstandene Wunden wie z. B. Verbrennungswunden, die ggf. für Transplantate vorbereitet werden müssen (29).

1.2 Wundheilung

Der komplexe Vorgang der Wundheilung wird seit mehr als 120 Jahren erforscht (13, 39). Auch heute noch unterliegt die Wundversorgung der steten Weiterentwicklung und Verbesserung. Hierzu soll vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

Ziel der Wundversorgung ist die sogenannte primäre Wundheilung mit restitutio ad integrum. Kann diese nicht erreicht werden, muss die sekundäre Wundheilung unterstützt werden, um eine funktionell und kosmetisch akzeptable Narbe zu schaffen. Hierzu wird ein „ideales“ Milieu zur Unterstützung des physiologischen Ablaufes der Wundheilung angestrebt. Diese wird in eine exsudative (Abb. 1), resorptive, proliferative (Abb. 2) und regenerative Phase eingeteilt, deren Übergänge teils fließend sind (20, 39).

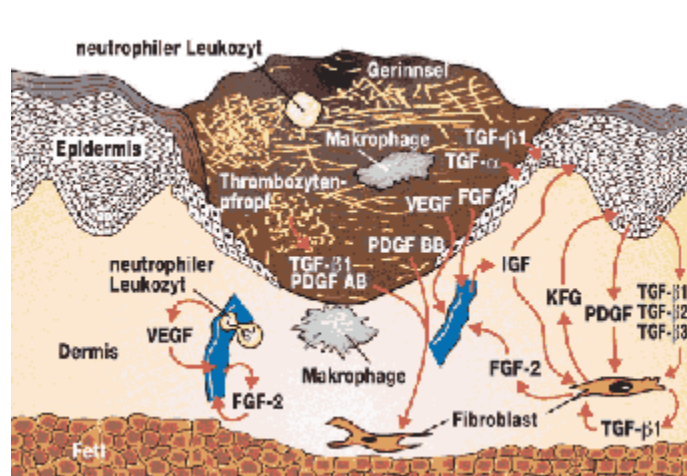


Abb. 1: Wundheilung; Exsudative Phase, Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten (33)

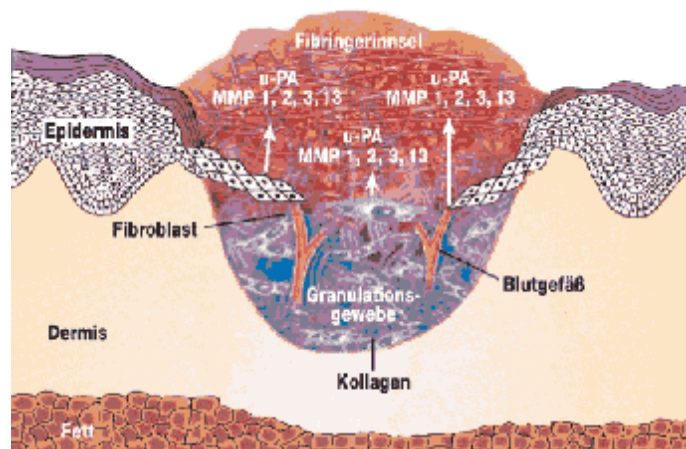


Abb. 2: Wundheilung; Proliferative Phase, Bildung von Granulationsgewebe (33)

1.3 Wundauflagen und Antiinfektiva

Im klinischen Alltag begegnet man täglich der Problematik schlecht heilender Wunden und ihrer Versorgung.

Die optimale Wundauflage sollte folgende Anforderungen erfüllen:

Gute Voraussetzungen für Granulation und Epithelisation, bakteriozide Wirkung, keine bakterielle Resistenzentwicklung, keine lokalen oder systemischen Nebenwirkungen. Die Auswahl einer Wundauflage ist unter Einbeziehung von immunologischen, antiinfektiven, absorptiven sowie olfaktorischen Gesichtspunkten zu treffen (29). Auch sind die Zeitabstände zwischen den Verbandwechseln zu optimieren. Sofern diese Anforderungen erfüllt sind, kann die Wundheilung gefördert und damit die Lebensqualität der Patienten verbessert werden. Durch Verkürzung

der Behandlungsdauer können zugleich die Behandlungskosten gesenkt werden. Ziel muss es sein, für jede Wunde die optimalen Voraussetzungen zur Heilung zu schaffen.

Edwards und Harding (11) konnten nachweisen, dass die mikrobielle Besiedelung einer Wunde ihre Heilung beeinträchtigt. In vielen Fällen gehen Wunden mit einer gemischten Besiedelung einher, so dass die Indikation zur breitbasigen bakterioziden Versorgung besteht. Problemerregern wie MRSA, VRE und multiresistenter *Pseudomonas aeruginosa* ist insofern besondere Aufmerksamkeit zu widmen, als deren Weiterverbreitung unterbunden werden muss. Zur Behandlung kritisch kolonisierter oder infizierter Wunden kommt der Verwendung von Wundauflagen mit Zusatz von Antiinfektiva (29) bzw. bakterioziden Wundauflagen (62) eine große Bedeutung zu. Die Auswahl ist groß und bedarf der differenzierten Bewertung.

Bei lokalen Antiinfektiva sollen gezielt lokal bakteriozid wirkende Gewebespiegel erreicht werden. Dies ist sinnvoll, um das Risiko systemischer Nebenwirkungen zu minimieren oder auszuschalten. Es zeigte sich jedoch, dass die Behandlung mit Problemen wie Applikationsschwierigkeiten beim Aufbringen (z. B. bei Salben), Austrocknung (bei Flüssigkeiten), Entwicklung von Resistenzen, Kontaktallergien (insbesondere bei Aminoglycosid-Antibiotika), zytotoxischen und resorptiven Nebenwirkungen sowie Wirkungsbeeinflussung durch pH-Wert, Blut oder Proteine (25, 29, 31, 63, 64, 79) einhergehen kann. Daher wurde in einer Konsensusempfehlung zusammengefasst, welche Wirkstoffe geeignet sind und welche nicht zum Einsatz kommen sollten. Demzufolge sind Polihexanid und Octenidin Wirkstoffe der Wahl (30). Dennoch ist der kontinuierliche Kontakt einer offenen Wunde mit diesen Lösungen einer strengen Indikationsstellung zu unterziehen, um die Wundheilung nicht zu stören.

Die bakteriozide Wirkung von Silber hat ihre Ursache in der Hemmung der bakteriellen DNA-Synthese. Diese Wirkung ist seit langem bekannt und kommt in der Wundversorgung, insbesondere im hochsensiblen Bereich der Verbrennungswunden, schon seit den sechziger Jahren zum Einsatz (5, 12, 40, 48, 69). Die Wirksamkeit wurde u. a. gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (7, 8); es sind aber auch Fälle einer Resistenzentwicklung beschrieben (17, 18, 43, 49, 56, 60, 65).

Während die positiven Auswirkungen eines feuchten Wundmilieus für die Wundheilung unstrittig sind (3, 75), fehlt für Wundauflagen mit Silberfreisetzung die

Evidenz einer verbesserten Wundheilung. Ursache hierfür dürfte die Zytotoxizität freigesetzten Silbers bei fehlender bakteriozider Wirksamkeit sein (51). Sofern das Silber fest an die Wundauflage gebunden ist, wie es für Actisorb® Silver zutrifft (9), ist eine andere Situation gegeben. Die Zytotoxizität kann nicht zum Tragen kommen und die Wirkungsinaktivierung durch Eiweiß und Blut kommt möglicherweise nicht in vollem Ausmaß zustande. Auch das Risiko einer Kontaktallergie (24, 50) ist nicht gegeben.

Während die lokale Anwendung von Silberverbindungen in Form von Silbernitrat-Lösungen und Silbersulfadiazin (27, 51) aus o. g. Gründen abzulehnen ist, werden Silber-imprägnierte Wundauflagen in großem Umfang eingesetzt (7, 8, 48, 52, 62, 79). Sie sind Antibiotika-imprägnierten Wundauflagen überlegen, da in vitro ohne Belastung kaum Wirkungslücken gegen Antibiotika-resistente Bakterien bestehen. Dies wurde z. B. gegen Vancomycin-resistente Keime nachgewiesen (62). Unabhängig davon sind antibiotische Wundauflagen wegen des Risikos der Resistenzentwicklung kontraindiziert (29, 30).

1.4 Wunden und Endotoxine

Richard Pfeiffer (59) entdeckte 1904 in Versuchen an Meerschweinchen ein thermostabiles bakterielles Gift und prägte den Begriff „Endotoxin“. Hierbei handelt es sich um unterschiedliche Lipopolysaccharidketten in Kombination mit Lipid A, die gemeinsam mit Phospholipiden und Proteinen die Zellwand Gram-negativer Bakterien bilden. Sterben die Zellen ab, werden die Endotoxine freigesetzt. Die toxische Wirkung wird, vom Lipid A ausgehend (42), je nach Polysaccharidanteil durch diesen modifiziert.

In zahlreichen In-vitro-Studien konnte nachgewiesen werden, dass bei Gram-negativen Bakterien unter antibiotischer Therapie erhebliche Mengen Endotoxin freigesetzt werden (6).

Beim Menschen löst der Kontakt mit Endotoxinen verschiedene lokale und systemische Reaktionen aus (Abb. 3). Klinisch reichen die Auswirkungen in Abhängigkeit von Immunstatus, Konzentration und Eintrittspforte von einem negativen Einfluss auf die Wundheilung (28, 47) bis zum septischen Schock mit Multiorganversagen (16). Bereits 100 ng gereinigtes Endotoxin lösen beim Menschen Fieber aus, Dosen im Bereich einiger Milligramm können zum Tod führen.

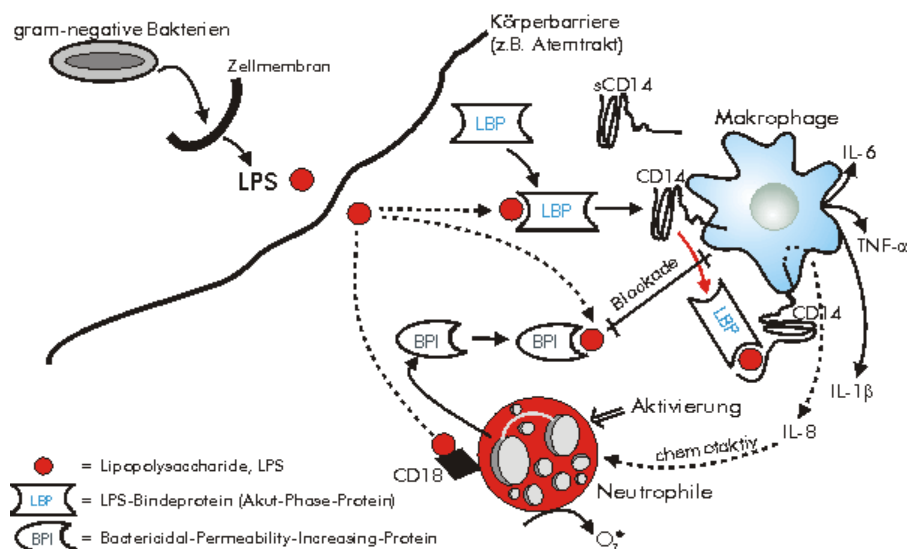


Abb. 3: Wirkmechanismus der Endotoxine (38)

Die Anwesenheit von Endotoxin führt, neben einer Aktivierung der Gerinnungs- und Kininkaskade, der Fibrinolyse sowie der Freisetzung von lysosomalen Enzymen und Peroxid-Radikalen (78), zu einer Verschiebung im Zytokin-Gleichgewicht. In den komplexen Entzündungsvorgängen und Reparationsprozessen haben Zytokine eine regulative Funktion (44). Durch die Aktivierung von Monozyten, Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α) und weiteren Entzündungsmediatoren (Histamin, Kinine, Stickstoffoxide) (10, 73) sowie zu einem Apoptose-Ungleichgewicht zugunsten der Apoptose-fördernden Mitglieder der Bcl-2 Gruppe. Obwohl es auch zu einer Hochregulation von Genen für VEGF und COX 2 kommt, welche eine regenerationsfördernde Wirkung haben, kann keine Verbesserung der Wundheilung erreicht werden (28).

Metzger et al. (47) wiesen bei Ratten in einem Versuch mit lokal auf chirurgischen Wunden appliziertem Endotoxin eine deutliche Verminderung der frühen Zugfestigkeit des neu gebildeten Gewebes nach. Dies wird je nach LPS-Konzentration einerseits mit dem Effekt von LPS auf Fibroblasten (2, 19, 58, 66), andererseits mit dessen Einfluss auf Makrophagen erklärt (45, 46). Die Arbeitsgruppe um Konturek (28) fand heraus, dass die systemische Gabe von Endotoxin die Abheilung von Magenulcera bei Ratten deutlich verzögert, da die Blutzufuhr und damit die Sauerstoffversorgung der Wunde reduziert wird.

Die Besiedelung einer Wunde mit Problemerregern verzögert die Heilung folglich nicht nur durch die direkten Folgen der Infektion wie Entzündung, Eiterbildung und

Gewebezersetzung, sondern bei Gram-negativer Besiedelung auch durch die Endotoxin-Freisetzung. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit neben der bakterioziden Wirkung auch die Endotoxin-Freisetzung und die mögliche Wiederaufnahme in die Wundauflagen untersucht.

1.4.1 Nachweisverfahren für Endotoxine

Ein seit den vierziger Jahren gebräuchliches Nachweisverfahren für Endotoxine, mit dem die gesamte Palette selbst noch unbekannter Pyrogene nachweisbar ist, ist der Kaninchen-Pyrogentest. Allerdings handelt es sich hierbei um einen aufwendigen Tierversuch, dessen Ergebnisse nur eingeschränkt übertragbar sind, da nicht alle humanpyrogenen Substanzen auch beim Kaninchen Fieber erzeugen und der Test stark von äußeren Einflüssen wie z. B. Alter und Geschlecht der Tiere abhängig ist (74).

Frederick Bang (1) machte 1956 die Beobachtung, dass es nach Infektion des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* (Abb. 4) mit Gram-negativen Bakterien zur intravaskulären Blutgerinnung kommt. Dessen Hämolymphe hat nur eine Art zirkulierender Zellen, die „Amöbozyten“ genannten Blutplättchen. Nach Eintreten der Infektion wird durch das Enzymsystem der Amöbozyten ein gerinnungsfähiges Protein, das Coagulagen, gespalten (35-37, 55, 67, 68, 80). Zur Eingrenzung des Infektionsgeschehens reagieren die größeren Coagulagen-Bruchstücke mit Verdichtung zu einem Gel (23).

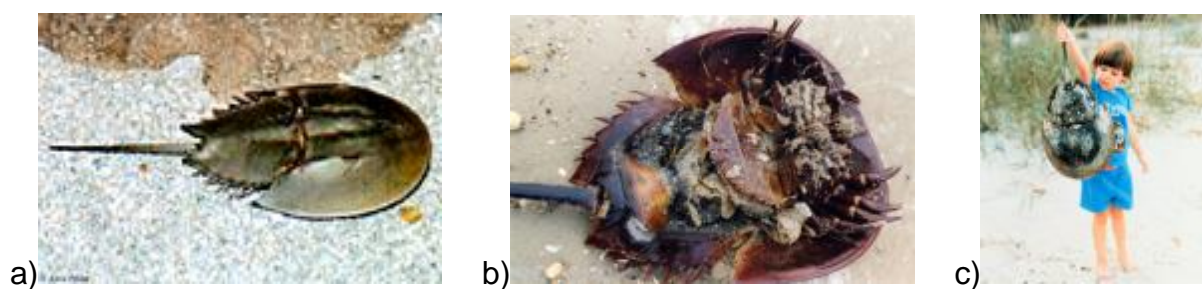


Abb. 4: Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*)

a) Oberseite (76) b) Unterseite (22) c) im Größenvergleich mit einem Kind (21)

Auf dieser Beobachtung basiert der in dieser Arbeit verwendete chromogene Limulus-Amöbozyte-Lysate-Test (LAL-Test). Es handelt sich hierbei um ein quantitatives Nachweisverfahren für Endotoxine. Sind diese in der Probe vorhanden, wird p-Nitroanilin aus dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA freigesetzt,

was in einer Gelbfärbung resultiert. Diese wird im ELISA-Reader gemessen und so eine Aussage über die Menge des anwesenden Endotoxins getroffen.

Zwar konnten Peterbauer et al. (57) nachweisen, dass Endotoxin in stark proteinhaltigen Lösungen mittels LAL-Test nur eingeschränkt nachweisbar ist, in den für vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen ist jedoch nicht von einer Proteinbelastung der Proben auszugehen. Daher zeigte sich der LAL-Test als geeignete Nachweismethode.

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Ärzte und Pflegepersonal sind mit einer Vielzahl verschiedener Wunden konfrontiert, die sehr häufig infiziert sind. Zur Behandlung steht eine große Anzahl an Wundauflagen mit und ohne bakteriozide Wirksamkeit zur Verfügung.

Bezüglich der optimalen Versorgung einer Wunde klaffen die Ansichten weit auseinander und sind in der Praxis von individuellen Vorlieben geprägt. Eine evidenzbasierte Datenlage ist nur in sehr geringem Umfang vorhanden (75).

Ein wichtiger Aspekt für die Entscheidung für eine bestimmte Wundauflage ist ihre bakteriozide Wirksamkeit. Eine hohe bakteriozide Wirksamkeit geht bei einer Infektion durch Gram-negative Bakterien aber zwangsläufig mit der Freisetzung von Endotoxinen einher (6). Daher ist es auch ein wichtiges Auswahlkriterium, ob die Wundauflage Endotoxine bindet oder nicht.

Es ist wichtig, Wundauflagen anhand festgelegter Kriterien zu vergleichen, um die geeignete Wahl treffen zu können. Hierzu werden standardisierte Testverfahren benötigt. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, mit deren Hilfe Wundauflagen reproduzierbar hinsichtlich ihrer bakterioziden Wirkung untersucht und gleichzeitig die Freisetzung und Bindung von Endotoxin bestimmt werden können. Parallel sollte die Zytotoxizität erfasst werden.

Aufgrund der Relevanz wurde als Testorganismus *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt. Es wurden die Abtötungskinetik desselben und gleichzeitig die zeitabhängige Freisetzung von LPS untersucht.

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Prüfanliegen

Verschiedene silberhaltige und silberfreie Wundauflagen wurden in identischen In-vitro-Tests auf bakteriozide Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*, Endotoxin-Bindungskapazität und Zytotoxizität geprüft.

2.2 Material

2.2.1 Prüfmuster

Actisorb[®] Silver 220 (Abb. 5) Aktivkohle-Gewirk mit Imprägnierung mit 220 mg elementarem Silber pro 100 g Aktivkohle, Schutzhülle aus gering haftendem Polyamid-Vlies (Johnson & Johnson)

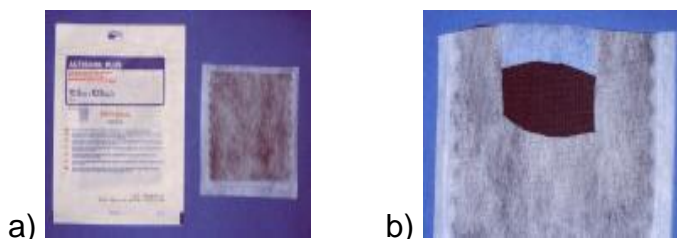


Abb. 5: Fotografien von Actisorb[®] Silver (71)
a) Originalzustand und Verpackung
b) Aufgeschnitten zur Darstellung der Schichten

Aquacel[®] (Abb. 6):

Hydrokolloidverband aus Natriumcarboxymethylzellulose (NaCMC) (ConvaTec)

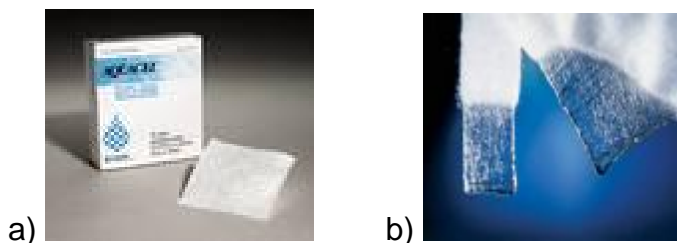


Abb. 6: Fotografien von Aquacel[®]
a) Originalzustand und Verpackung (15)
b) an einer Ecke angefeuchtet (26)

CarboFlex® (Abb. 7) Mehrschicht-Verband bestehend aus: EMA-Schicht (= Ethylen-Methyl-Acrylat) (Schutzhülle), Viskose, Polyethylen, Polypropylen (Absorptionskissen), Aktivkohleschicht, weiterer EMA-Schicht, Alginat/Hydrofaser-Schicht (Wundkontaktfläche) (ConvaTec)

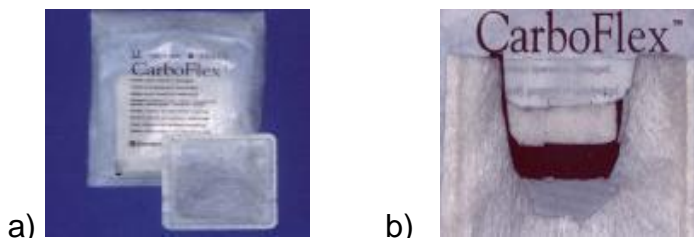


Abb. 7: Fotografien von CarboFlex® (71)

- a) Originalzustand und Verpackung
- b) Aufgeschnitten zur Darstellung der Schichten

Contreet-H® (Abb. 8) mit ionischem Silber imprägnierter Hydrokolloid-Verband, bestehend aus Calciumalginat, Carboxymethylcellulose-Natrium, synthetischem Blockpolymer, Haftmittel, Plastifizierer, Polyurethanfolie (Coloplast)



Abb. 8: Fotografie von Contreet-H®, Originalzustand (15)

Nylon Polyamidhülle von Actisorb® Silver 220 (Johnson & Johnson) (s. Abb. 5)

2.2.2 Bakterienstamm

Pseudomonas aeruginosa, ATCC 15442 (DSM Nr. 939); DSMZ, Braunschweig.

2.2.3 Endotoxin

Endotoxin, O55:B5 *E. coli*-Standard, Product-Nr. 7193 (BioWhittaker).

2.2.4 Zellen

Amerikanische Type Culture Collection CCL 1, NCTC Klon 929 (Bindegewebe, Maus) Klon von Stamm L, nachfolgend als L 929 Zellen bezeichnet (ZBV der BFAV Insel Riems); Mykoplasmen-frei nachgewiesen durch Kulturmethode, DNA-Färbung, Adenosinphosphorylase-Test und PCR; Pilze und Bakterien negativ.

2.2.5 Geräte

Begasungsbrutschrank 37 °C, Modell QMI300SVBA (NUNC)

Begasungsbrutschrank 37 °C (Mettler)

Benchmark EIA-Reader, temperierbar (BioRad)

Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II, Modell 51424/5 (NUNC)

Gefrierschrank für –20 °C und –80 °C

Inverses Durchlichtmikroskop IX 70 (Olympus) mit Video- und Fotoeinrichtung

Kühlschrank für 4 °C

Kühl-Tischzentrifuge Labofuge 400R (Heraeus)

pH-Meter pH320 (WTW)

Pipetten (Eppendorf)

Präzisionswaage BP 210D (Sartorius)

Rührheiztisch TMA 2072 (Hecht-Assistent)

Schüttlerinkubator Titramax 1000 (Heidolph)

Ultrospec III UV/VIS-Spektralphotometer (Pharmacia)

Vortex-Genie-Monomixer (Fisher Scientific)

Waage Basic BA 110 (Sartorius)

Wasserbad mit Schüttelvorrichtung, temperierbar (Mettler)

2.2.6 Verbrauchsmaterial

Barrycidal 36 -Sprühdesinfektionsmittel (Helmut Schröder)

Combitips plus 2,5 ml (Eppendorf Biopur, 0030 069.447)

Combitips plus 5,0 ml (Eppendorf Biopur, 0030 069.455)

Einmaluntersuchungshandschuhe (Unigloves)

Einmalspritzen für 10 ml, steril (B. Braun, Art. Nr. 4606728V)

Einmalspritzen für 20 ml, steril (B. Braun, Art. Nr. 4606736V)

Filterhalter FP 030/35, 0,2 µm, steril und pyrogenfrei (Schleicher & Schüll)

Glasröhrchen, pyrogenfrei (USN 207, BioWhittaker, Europe)

Hämazytometer (Neubauer-Zählkammer; Feinoptik Bad Blankenburg)

Kryoröhrchen 2 ml, steril (Greiner, 122279)

Kulturflaschen (T25) mit Filterkappe (TPP-TC Flask, 25 cm² PS; screw cap PE, 50 x 90 x 28, Biochrom, P 90026)

Kulturflaschen (T75) mit Filterkappe (TPP-TC Flask, 75 cm² PS; screw cap PE, 90 x 150 x 37, Biochrom, P 90076)

Maßkolben verschiedener Größe

Pipettenspitzen, pyrogenfrei, steril 300 µl (Eppendorf Biopur, 0030 065.590)

Pipettenspitzen, pyrogenfrei, steril 1000 µl (Eppendorf Biopur, 0030 065.522)

Reagenzien-Reservoir für Multikanalpipette, steril (Costar, 4870)

Safe-Lock-Gefäße 1,5 ml (Eppendorf Biopur, 0030 121.583)

Sagrosept-Wischtücher (Schülke & Mayr)

Verschlussfilm, selbstklebend, unsteril und steril (Roth, H769.1 und H770.1)

Zellkulturschalen 60 mm, pyrogenfrei, steril (Biochrom, P 93060)

Zellkultur-Testplatten aus Polystyren, 96-well, pyrogenfrei, gamma-sterilisiert (0.31 cm² Wachstumsfläche) (TPP, 92696)

Zellkultur-Testplatten aus Polystyren, 6-well, pyrogenfrei, gamma-sterilisiert, (9,03 cm² Wachstumsfläche) (TPP, 92406)

Zentrifugenröhrchen (13 ml) mit Eindrückstopfen, steril (Sarstedt, 55.468.001)

Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit Schraubkappe, steril (Biochrom, P 91050)

Sämtliche Glaswaren wurden für 30 min autoklaviert und im Anschluss mindestens 3 h bei 210 °C erhitzt, um die Endotoxin-Freiheit zu gewährleisten.

2.2.7 Reagenzien

Agarose-M (Amersham, 17-0422-02)

Antibiotika-Testfilter Ø 9 mm (Schleicher & Schüll, 2268)

Benzalkoniumchlorid

CASO-Bouillon (Merck, 105459)

CASO-Agar (Merck, 105458)

Deionisiertes Wasser

Dimethylsulfoxid (Fluka, 41648)

DMEM-Medium mit stabilem Glutamin, mit 3,7 g/l NaHCO₃, flüssig (Biochrom, FG 0415)

DMEM-Trockenmedium ohne NaHCO₃ (Biochrom, T 041-01)

Dulbeccos PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} = wPBS (Biochrom, L 1815)
Dulbeccos PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} = w/oPBS (Biochrom, L 1825)
Endotoxin-freies Wasser (USW50, BioWhittaker, Europe)
FBS = fötales bovines Serum, USDA (Biochrom, S 0213, Charge 202U)
Folin-Ciocalteus-Reagenz (Merck, 109001)
Kälberserum (Biochrom, S 0123, Charge 118A)
Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat (Merck, 108087)
Kupfersulfat-Pentahydrat (Merck, 102790)
Mycoplasma Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, 1 296 744)
NaCl (Merck, 106404)
Natriumcarbonat-Tetrahydrat (Merck, 106391)
Natriumhydrogencarbonat (Merck, 106329)
Natriumthioglykolat (Merck, 1066910500)
Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid)
Penicillin 10.000 IE/ml – Streptomycin 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, lyophil. (Biochrom, A2210)
QCL-1000 LAL Testkit (You 550-648U; BioWhittaker, Europe)
Stop-Reagenz (25 %ige Essigsäure)
Trypanblau-Lösung 0,5 %-ig (Biochrom, L 6323)
Trypsin 0,05 %/EDTA 0,02 %-Lösung (Biochrom, L 2143)
Trypton (Pepton aus Casein; pankreat. verdaut) (Merck, 107213)

2.2.8 Lösungen und Nährmedien

Für die Endotoxin- und Mikrobiozidie-Tests

CSL

30 g CASO-Bouillon
1000 ml deionisiertes Wasser

CSA

40 g CASO-Agar
1000 ml deionisiertes Wasser

0,1 %-ige Na-Thioglykolat-Lösung

1 g Na-Thioglykolat
1000 ml deionisiertes Wasser

Trypton-NaCl-Lösung

8,5 g NaCl

1 g Trypton

1000 ml deionisiertes Wasser

Die CSL, CSA und Trypton-NaCl-Lösungen wurden jeweils 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Für den Zytotoxizitätstest

3 %-ige Agarose-Lösung

6,0 g Agarose-M wurden in 200 ml entionisiertes Wasser gegeben und anschließend autoklaviert. Der Wasserverlust wurde durch Zugabe von sterilem Wasser zu der noch warmen Lösung ausgeglichen (Differenzwägung). Die Agarose-Lösung wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen in 45 ml-Portionen aufgeteilt und anschließend bis zur Verwendung bei 4 °C maximal 6 Monate zwischengelagert.

Agarose-Medium

Das Agarose-Medium wurde aus gleichen Teilen 2 x DMEM und 3 %-iger Agarose in entionisiertem Wasser hergestellt.

Die geschmolzene Agarose (Wasserbad, Mikrowelle) wurde auf etwa 60 °C abgekühlt, das Medium auf 37 °C gebracht und beides aseptisch gemischt. Es wurde die Verwendungstemperatur von etwa 42 °C erreicht.

Benzalkoniumchlorid-Stammlösung (100 mg/l)

10 mg Benzalkoniumchlorid wurden in 100 ml entionisiertem Wasser gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und maximal 6 Monate verwendet.

Einfriermedium für 100 ml

65 ml konditioniertes Medium (letzter Kulturüberstand vor dem Trypsinieren) oder DMEM-Ausgangsmedium

20 ml FBS

15 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das Medium wurde anschließend über einen 0,2 µm Vorsatzfilter steril filtriert.

Kulturmedium, doppelt konzentriert (2 x DMEM) (enthält 20 % FBS, 7,4 g/l NaHCO₃, 200 IU/ml Penicillin und 200 µg/l Streptomycin); für 500 ml:

DMEM-Trockenmedium für 1 Liter normales Kulturmedium, lyophilisiertes (2 x 5 ml) Penicillin/Streptomycin und 3,7 g NaHCO₃ wurden in 400 ml entionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 100 ml FBS hinzugefügt. Die entstandene Mischung wurde unter sterilen Bedingungen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen in 45 ml-Portionen über ein 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Röhrchen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C zwischengelagert.

Kulturmedium, komplett (enthält 10 % FBS, 3,7 g/l NaHCO₃, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/l Streptomycin); für 500 ml:

Ca. 50 ml DMEM-Kulturmedium mit stabilem Glutamin wurden aus einer 500 ml-Vorratsflasche entnommen. Dazu wurden 50 ml FBS und 5 ml Penicillin-Streptomycin hinzugefügt. Die entstandene Mischung wurde anschließend unter aseptischen Bedingungen in die 500 ml Kultur-Vorratsflasche mit Hilfe einer 20 ml-Einmalspritze und 1-2 Filterhaltern (steril, 0,2 µm) zurückfiltriert.

Das komplette Kulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb eines Monats verwendet; bei 37 °C ist auf Grund des Verlusts der Wirksamkeit der Antibiotika der Einsatz auf maximal 3 d beschränkt.

Neutralrot-Lösungen

Zum Erstellen der Stammlösung wurde 1,0 g Neutralrot in 1000 ml PBS gelöst, auf pH = 7,2 eingestellt und aseptisch filtriert. Die Stammlösung wurde vor Licht geschützt aufbewahrt.

Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit steriler PBS-Lösung frisch vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 gemischt und vor Lichteinfall geschützt.

2.3 Methoden

2.3.1 LAL-Test

2.3.1.1 Prinzip des Verfahrens

Dieser Test dient dem quantitativen Nachweis von Endotoxinen. Wird durch die Anwesenheit von Endotoxin das Enzymsystem aktiviert, wird das gelb gefärbte p-Nitroanilin aus dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA freigesetzt. Je mehr Endotoxin sich in der Probe befindet, desto intensiver ist die resultierende

Gelbfärbung. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Gelbfärbung spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen und weist die Enzymaktivität des Lysates nach (70). Da die Absorption direkt proportional zur vorhandenen Endotoxin-Menge ist, kann die Konzentration mittels einer Standardkurve berechnet werden.

2.3.1.2 Erstellen der Endotoxin-Standardgeraden für den chromogenen LAL-Test

Die Endotoxin-Standardgeraden wurden in Endotoxin-freiem Wasser, PBS und 0,1%-igem Na-Thioglykolat in PBS erstellt. Hierzu wurden aus dem Kit-Endotoxin und den jeweiligen Reagenzien Stammlösungen mit 1 EU/ml gemischt. Diese wurden zu Lösungen mit 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml und 0,125 EU/ml verdünnt, welche als Standards verwendet wurden. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurden die Röhrchen jeweils 1 min gevortext.

Die Bestimmung der Endotoxin-Konzentration erfolgte, wie unten beschrieben, in 96-well Multikulturplatten. Nach der Reaktion mit den LAL-Reagenzien wurde die resultierende gelbe Lösung im Bereich von 0,2 EU/ml bis 1,0 EU/ml in 0,2 EU-Schritten spektralphotometrisch bestimmt. Hierbei wurden die Standardproben in der geeigneten Verdünnung wie die Untersuchungsproben behandelt.

Für die Standardgeraden wurden die erhaltenen Absorptionswerte für Endotoxin-freies Wasser, PBS und Na-Thioglykolat gegen die entsprechende Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

2.3.1.3 Durchführung des LAL-Tests

Zum Ansatz der chromogenen Substratlösung wurde jeweils ein Fläschchen mit 7 mg lyophilisiertem Substrat aus dem Testkit mit 6,5 ml LAL-Wasser rekonstituiert. Die entstandene Lösung wurde bei 37 °C inkubiert.

Daraufhin wurde eine 96-well-Platte mit je 25 µl Blank (LAL-Wasser), Standard (0,5 EU/ml-, 0,25 EU/ml- und 0,125 EU/ml-Verdünnung) und den Proben bestückt. Vor der Bestückung wurden die Proben jeweils 1 min gevortext.

Nach 5 min Vorinkubation der fertigen Platte bei 37 °C im temperierbaren Benchmark EIA-Reader erfolgte die Zugabe von 25 µl LAL pro well. Mit Zugabe der Lösung ins erste well wurde eine Stoppuhr gestartet. Beim Pipettiervorgang wurde eine gleichmäßige Geschwindigkeit eingehalten. Dies ist von äußerster Wichtigkeit, da sich je nach Einwirkzeit der Reagenzien die Ergebnisse verändern.

Nach Beendigung des Pipettiervorgangs wurde die Platte für wenige Sekunden geschüttelt und bis zum Ablauf der ersten 10 min weiter bei 37 °C inkubiert. Durch die Wahl des Zeitrahmens von 10 min erfolgt die Eingrenzung auf ein Testfenster von 1,0 - 0,1 EU/ml. Nach dieser Zeit wurden in gleicher Reihenfolge und Geschwindigkeit 50 µl der vorgewärmten chromogenen Substratlösung in die wells gegeben und die Platte nach kurzem Schütteln weitere 6 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl der Stopplösung. Im Anschluss daran konnte die Platte nach einem letzten kurzen Schütteln bei 405 nm gemessen werden.

Im gesamten Testverlauf wurden jeweils halbmaximale Volumina der einzelnen Reagenzien verwendet. Die Reproduzierbarkeit und Korrektheit der Testergebnisse wurden durch Vorversuche bestätigt.

2.3.1.4 Analyse der Endotoxin-Bindungsfähigkeit

Prinzip des Verfahrens: Die zu prüfende Wundauflage wird mit einer definierten Menge Endotoxins inkubiert, nach festgelegten Inkubationszeiten eine Probe entnommen und deren Restgehalt an Endotoxin mittels LAL-Test bestimmt.

Versuchsaufbau: Unter aseptischen, pyrogenfreien Bedingungen wurden die Kontrollen sowie die Prüfmuster der Wundauflagen nach dem in Abbildung 9 skizzierten Schema auf 6-well-Zellkulturplatten verteilt:

	1	2	3
A	8 ml PBS mit Endotoxin	Wundauflage 1 + 8 ml PBS mit Endotoxin	Wundauflage 2 + 8 ml PBS mit Endotoxin
B	8 ml PBS mit Endotoxin	Wundauflage 1 + 8 ml PBS mit Endotoxin	Wundauflage 2 + 8 ml PBS mit Endotoxin

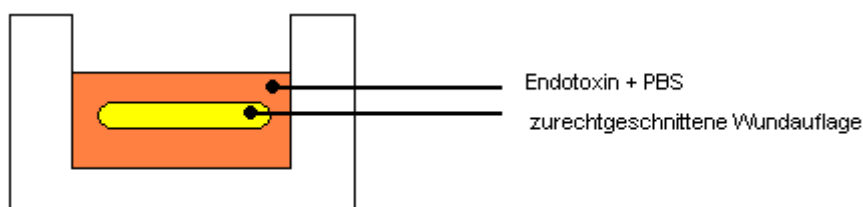


Abb. 9: Versuchsanordnung zur Bestimmung (Doppelansatz) der max. Bindungsfähigkeit für LPS

Jedes Prüfmuster einer Wundauflage wurde zweifach untersucht.

Durch Verdünnen eines Endotoxin-Konzentrats mit pyrogenfreiem Wasser wurde eine Endotoxin-Lösung mit $3,5 \times 10^6$ EU/ml hergestellt und diese durch Zugabe von PBS auf $3,5 \times 10^4$ EU/ml verdünnt.

Anschließend wurden Wundauflagen (2,5 x 2,5 cm) und Kontrollen vorgelegt und jeweils 7,2 ml PBS zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei geschlossenem Deckel für 15 min bei 37 °C gemeinsam mit der $3,5 \times 10^4$ EU/ml Endotoxin-Lösung unter Schütteln inkubiert, um die Temperatur der Testsubstanzen anzugleichen. Dann wurden je 0,8 ml der $3,5 \times 10^4$ EU/ml Endotoxin-Lösung in die wells gegeben und somit eine Endotoxin-Endkonzentration von $3,5 \times 10^3$ EU/ml erreicht. Das entspricht einer Gesamtmenge von 2,52 µg LPS (1 EU = 0,09 ng LPS). Für diese Menge lagen in den Vorversuchen die meisten Messergebnisse im Testfenster.

Mit der hierfür verwendeten Pipettenspitze, wurde vor der ersten Zugabe 20 – 30 mal in der Endotoxin-Lösung hin- und hergespült, um eine gleichmäßige Beschichtung der Pipetteninnenseite mit Endotoxin zu gewährleisten und eventuelle Konzentrationsschwankungen durch ungleichmäßige Adhäsion zu vermeiden.

Nach Zugabe des Endotoxins wurden die Platten erneut verschlossen und nochmals kurz geschüttelt, um das Endotoxin gleichmäßig zu verteilen (Abb.10). In der Folge wurde jegliches Schütteln vermieden. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 30 min, 3 h und 24 h je 0,5 ml Probe pro well entnommen.

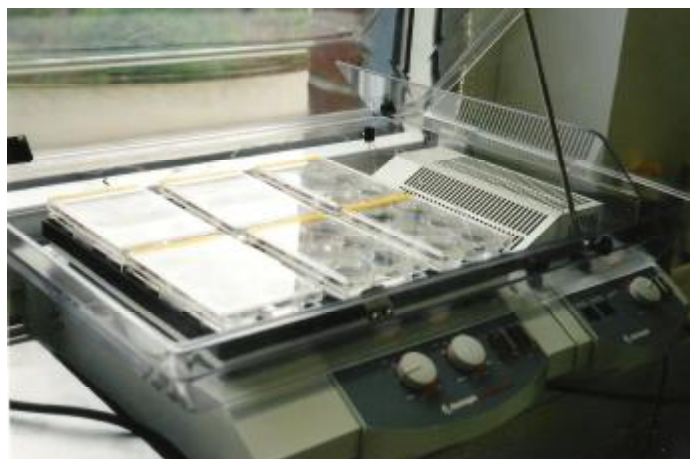


Abb. 10: 6-well-Platten mit Prüfmustern und Kontrollen im Schüttlerinkubator

Vorbereitung der Messung: Die Proben wurden in Endotoxin-freie Glasröhrchen gegeben, in denen jeweils 0,5 ml 0,1%-iges Na-Thioglykolat vorgelegt waren. Dieses diente der Inaktivierung von möglicherweise freigesetzten Silberionen.

Nach Verdünnen dieser Lösungen mit PBS auf 1/2500 wurden die verdünnten Probelösungen sofort in die Mikrotiterplatten gegeben und der LAL-Test durchgeführt.

Diese Verdünnung wurde gewählt, da sich in zahlreichen Vorversuchen gezeigt hatte, dass bei dieser Verdünnung die meisten Werte im Testfenster lagen. Wurden auf diese Weise bei vereinzelt Proben keine verwertbaren Ergebnisse erzielt, wurde die Verdünnung entsprechend angepasst, um auch geringfügig abweichende Werte zu erfassen.

2.3.1.5 Analyse der bakterioziden Wirkung und der Endotoxin-Freisetzung

Prinzip des Verfahrens: Die zu prüfenden Wundauflagen werden mit einer definierten Menge von *Pseudomonas aeruginosa* inkubiert, nach festgelegten Inkubationszeiten Proben entnommen und deren restliche KbE/ml nach Aufstreichen auf CSA-Platten und Inkubation ausgezählt. Zusätzlich wird die freigesetzte Menge Endotoxins mittels LAL-Test bestimmt.

Versuchsaufbau: Die *Pseudomonas aeruginosa*-Bakteriensuspension wurde im Wasserbad bei 37 °C in CSL angezüchtet. Um die Bildung einer Kahm-Schicht zu vermeiden, wurde die Bouillon mit 150 U/min geschüttelt. Nach 5 h konnten mittels Messung der optischen Dichte bei 660 nm im Ultrospec III reproduzierbare Bakteriendichten von 10^8 - 10^9 KbE/ml nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden nach 48 h die KbE geeigneter Verdünnungen auf CSA-Platten ausgezählt.

Die Wundauflagen wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen der *Pseudomonas aeruginosa*-Suspension auf ihre zeitabhängige und maximale mikrobiozide Wirkung sowie die Endotoxin-Freisetzung während der Exposition untersucht.

Die Kontrollen und Prüfmuster der zu untersuchenden Wundauflagen wurden unter aseptischen, pyrogenfreien Bedingungen auf 6-well-Zellkulturplatten vorgelegt. Auch hier erfolgte eine Doppelbestimmung je Wundauflage (Abb. 11).

	1	2	3
A	10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS	Wundauflage 1 + 10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS	Wundauflage 2 + 10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS
B	10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS	Wundauflage 1 + 10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS	Wundauflage 2 + 10^5 - 10^8 KbE/ml in 8 ml PBS

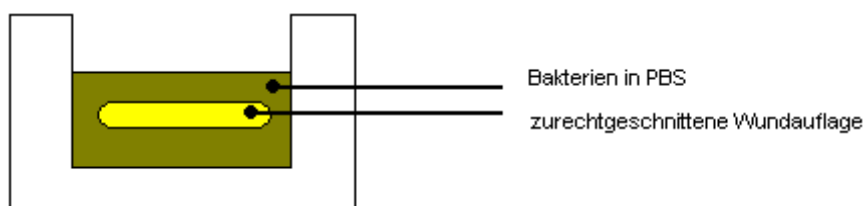


Abb. 11: Versuchsanordnung zur Bestimmung (Doppelansatz) der mikrobioziden Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und der gleichzeitigen Endotoxin-Freisetzung

Nach Zugabe von 7,2 ml PBS pro well wurden die Platten unter Schütteln 15 min bei 37 °C vorinkubiert und im Anschluss 0,8 ml Bakteriensuspension zugegeben, so dass Endkonzentrationen von 10^6 - 10^7 KbE/ml bzw. auf weiteren Testplatten von 10^5 - 10^6 KBE/ml sowie von 10^4 - 10^5 KbE/ml erreicht wurden. Diese wurden beim Einstellen in den Inkubator kurz geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension im well und über den Prüfmustern zu gewährleisten.

Zur Kontrolle der Koloniezahl wurde von jeder Suspension eine CSA-Platte angelegt und nach 48 h ausgezählt.

Vorbereitung der Messung: Nach 30 min, 1 h und 3 h wurden je 0,5 ml Probe pro well zur Bestimmung ihres jeweiligen Gehalts an Bakterien sowie Endotoxin entnommen. Die Proben wurden in Endotoxin-freie Röhrchen gegeben, in denen je 4,5 ml 0,1%-iges Na-Thioglykolat vorgelegt war.

Die weiteren Verdünnungen wurden sofort mit Trypton-NaCl-Lösung erstellt und je 0,1 ml der Verdünnungen zur Koloniezahlbestimmung auf je 3 CSA-Platten ausgestrichen. Diese wurden bei 37 °C inkubiert und nach Ablauf von 48 h die resultierenden KbE ausgezählt.

Zur Berechnung des Reduktionsfaktors wurde der dekadische Logarithmus der gezählten KbE verwendet. Der Ig-Reduktionsfaktor (RF) für die jeweilige Kontaktzeit und Ausgangskoloniedichte wurde entsprechend folgender Gleichung berechnet:

$$RF = \lg n_K - \lg n_W$$

Hierbei entsprechen n_K den „gezählten KbE im **K**ontrollexperiment mit PBS“ und n_W den „gezählten KbE nach dem Kontakt des Inokulums mit der mit PBS durchtränkten **W**undaufgabe“.

Nach Anfertigen der Verdünnungen mit Trypton-NaCl-Lösung und Entnahme der Proben zur Koloniezahlbestimmung wurden die Röhren für 20 min bei 4500 U/min und 16 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser zur Endotoxin-Bestimmung per LAL-Test verwendet.

2.3.2 Zytotoxizitätstestung im Agarose-Overlay-Test

Prinzip des Verfahrens: Der Agarose-Overlay-Test (nach DIN EN ISO 9363-1; 1999) basiert auf der Detektion vitaler Zellen unter einer Agarose-Schicht nach Kontakt derselben mit dem Prüfmuster. Ein direkter Kontakt zwischen Zellen und Prüfmuster besteht dabei nicht, lediglich diffusible Bestandteile gelangen zu den Zellen. Unter Inkubation mit Neutralrot-Lösung reichert sich Neutralrot in den Lysosomen vitaler Zellen an. In geschädigten Zellen oder Lysosomenmembranen kann keine Anreicherung und Speicherung erfolgen. Geschädigte Zellen können somit nicht detektiert werden.

Nach 24 h Kontakt zwischen Agarose-Layer und Prüfmuster wird das Ausmaß der Entfärbung und damit der Zellyse als Zonen-Lyse-Index mikroskopisch ausgewertet.

Vorbereitung der Zellsuspension: Die L 929-Zellen (ATCC CCL 1) wurden in Portionen à 1,5 ml Zellsuspension bei -80 °C tief gefroren aufbewahrt und zur Verwendung zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.

Nach der Überführung in größere Röhren erfolgte die schrittweise Verdünnung mit 10 ml komplettem DMEM. Unter gelegentlichem Schütteln wurden die ersten 5 ml tropfenweise mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/2 min hinzugegeben, bei den nächsten 5 ml wurde die Geschwindigkeit verdoppelt.

Nachdem das komplette DMEM vollständig hinzugegeben worden war, ruhten die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur und wurden daraufhin über 7 min bei 16 °C und 1200 U/min zentrifugiert. Das gewonnene Zell-Pellet wurde anschließend mit komplettem DMEM resuspendiert, bis eine Zelldichte von etwa 2×10^5 bis 4×10^6 Zellen pro ml erreicht war und dann der Vermehrung zugeführt.

Je Zelllinie wurden maximal 2-3 Passagen für den In-vitro-Zytotoxizitätstest verwendet.

Kultivierung der Zellen: Für die Vermehrung der Zellen wurden in T 75-Zellkulturflaschen $8-12 \times 10^5$ Zellen/15 ml komplettem Medium ausgesät.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung unter dem Hämazytometer. Von der durch Verdünnen bzw. erneutes Zentrifugieren und Verdünnen auf ca. $2 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellten Suspension wurden 50 μ l 1:1 mit 0,5 %-iger Trypanblau-Lösung gemischt, nach 30 s eine ausreichende Menge in die Zählkammer des Hämazytometers pipettiert und die Zellen unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt.

Nach 24 h Inkubation im Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ in Luft wurden nochmals 15 ml komplettes Medium zugefügt und die Zellen weitere 48 h unter den gleichen Konditionen inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen wieder für 24 – 48 h inkubiert. Sofern nach dieser Zeit eine Fläche von > 80 % des Flaschenbodens bewachsen war, wurden die Zellen trypsinisiert, falls nicht, wurden ein weiterer Mediumwechsel und erneutes 24–48-stündiges Inkubieren angeschlossen, um ein dichteres Wachstum und damit eine größere Zellausbeute nach dem Trypsinieren zu erreichen.

Bei 80 %-igem Bewuchs wurde das Inkubieren beendet und das überstehende Medium (konditioniertes Medium) in ein steriles Röhrchen überführt. Dieses wurde eingefroren und als Rückstellprobe zur Kontrolle auf eine Mykoplasmenkontamination verwendet.

Trypsinieren der Zellen: Die Zellen wurden in den Flaschen mit 2 x 10 ml w/oPBS 1 min lang gewaschen und danach die Waschflüssigkeit abgegossen. Danach wurden 2 ml einer auf Raumtemperatur vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und die Kulturflaschen vorsichtig geschwenkt. Nach etwa 6 min hatten die Zellen unter dem Mikroskop eine kugelige Form angenommen und konnten durch Beklopfen der Zellkulturflasche vollständig abgelöst werden.

Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 20 ml 5 %-iges FBS in w/oPBS in die Flasche gegeben und die Zellen in der inaktivierten Zellsuspension auf 5 Röhrchen verteilt. Diese wurden bei Raumtemperatur und 1200 U/min für 7 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, 11 ml komplettes Medium/Flasche zur Resuspension zugegeben und alle Röhrchen in 2 weiteren zu je gleichen Teilen zusammengeführt.

Im Anschluss erfolgte erneut eine Bestimmung der Zellzahl und danach, evtl. nach erneutem Zentrifugieren und Resuspension, in der Verdünnung $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml der Einsatz im Agarose-Overlay-Test.

2.3.2.1 Durchführung des Agarose-Overlay-Tests

In diesem Versuch wurden 4,5 ml der Zellsuspension in sterile Petrischalen mit 60 mm Durchmesser ausgesät, die Platten leicht geschwenkt, mit dem dazugehörigen Deckel versehen und 24 h bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 %-igem CO₂-Luftgemisch im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Hierbei wurde darauf geachtet, die Zellen insbesondere während der ersten Stunden vollkommen in Ruhe zu lassen, um eine gleichmäßige Adhäsion zu ermöglichen.

Am Folgetag wurde mit einer Pipette das überstehende Medium abgesaugt und die Platten mit 4,5 ml eines 42 °C warmen Agarose-Mediums überschichtet. Hierfür wurde die Agarose zuerst auf > 90 °C erhitzt und anschließend das Abkühlen bis auf ca. 60 °C abgewartet. Dann wurde die Agarose 1:1 mit vorgewärmtem zweifach konzentriertem DMEM gemischt, wobei sich eine Endtemperatur von etwa 42 °C ergab. Um ein zu schnelles Erkalten und Erstarren des Agarose-Mediums während des Beschichtens der Platten zu verhindern, wurde es in einem Wasserbad bei 42 °C aufbewahrt. Bis zum Erstarren des Agarose-Mediums (nach ca. 30 min) wurden die Platten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden pro Platte 4,5 ml frisch zubereitete, 0,01 %-ige Neutralrot-Vitalfarbstofflösung zugegeben, die Platten weitere 30 min unter Lichtausschluss im Begasungsbrutschrank inkubiert und anschließend die überschüssige Farblösung abgesaugt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Prüfkörper blasenfrei, mit der aktiven Seite, d. h. der Wundkontaktfläche nach unten, in die Mitte der Petrischale auf die von einer Agaroseschicht bedeckten und eingefärbten Prüfzellen gelegt. Ein unmittelbarer Kontakt zwischen Prüfzellen und Prüfmuster wurde somit vermieden, diffusiblen Bestandteilen hingegen ermöglicht, zu den Zellen zu gelangen.

Als Positivkontrolle wurden 50 µl einer Benzalkoniumchlorid-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml, als Negativkontrolle 50 µl steriles PBS auf sterile Antibiotika-Testfilter mit 9 mm Durchmesser gegeben, die vorher in 2-Propanol eingelegt und wieder getrocknet worden waren. Die Antibiotika-Testfilter wurden wie die Wundaufgaben auf das Zelllayer-Agarose-Sandwich aufgelegt. Ein Testansatz pro Prüfmuster bestand aus vier Kulturschalen, je zwei Kulturschalen mit einem Prüfmuster und je einer Kulturschale für die Positiv- und die Negativkontrolle.

Sofern vorhanden, erzeugen zytotoxische Substanzen in der Zellschicht eine Lyse und damit eine Entfärbung. Nach 24 h Inkubation im Begasungsbrutschrank wurde die Reaktion des gefärbten Zell-Monolayers mittels Invers-Mikroskopie bei 100facher Vergrößerung überprüft und das Ausmaß der Entfärbung unter und in der unmittelbaren Umgebung des Prüfmusters als Zonen- (Tab. 1) und Lyse-Index (Tab. 2) beurteilt. Ein hoher Lyse-Index beschreibt die Stärke der Zytotoxizität, ermöglicht aber keine Aussage über die unmittelbar auf die Kontaktfläche begrenzte Wirkung hinaus. Für die Beurteilung der Umgebungsbeeinflussung wird der Zonenindex herangezogen. Bei hohem Zonenindex ist von vielen diffusiblen Bestandteilen der Wundaufgabe auszugehen, die eine zytotoxische Wirkung haben. Bei niedrigem Zonenindex ist hingegen von einer stark lokal begrenzten Wirkung auszugehen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Prüfmuster wird der Reaktionsindex hinzugezogen, der sich nach der Gleichung $\text{Reaktionsindex} = (\text{Zonenindex} + \text{Lyseindex})/2$ berechnet (Tab. 3).

Tabelle 1: Auswertungsschema für den Zonen-Index (Z) nach DIN EN ISO 9363-1 (1999)

Zonen-Index, Z	Beschreibung der Zone
0	Keine Zone unter oder um das Prüfmuster nachweisbar.
1	Die Zone ist auf den Bereich direkt unter dem Prüfmuster beschränkt.
2	Die Zone ist nicht größer als 5 mm um das Prüfmuster herum.
3	Die Zone ist nicht größer als 10 mm um das Prüfmuster herum.
4	Die Zone ist größer als 10 mm um das Prüfmuster herum, bedeckt jedoch nicht die gesamte Platte.
5	Die Zone bedeckt die gesamte Platte.

Tabelle 2: Auswertungsschema für den Lyse-Index (L) nach DIN EN ISO 9363-1 (1999)

Lyse-Index, L	Beschreibung des Ausmaßes der Lyse
0	Keine Lyse zu beobachten.
1	Lyse von bis zu 20 % der Zellen.
2	Lyse von über 20 % bis zu 40 % der Zellen.
3	Lyse von über 40 % bis zu 60 % der Zellen.
4	Lyse von über 60 % bis zu 80 % der Zellen.
5	Lyse von über 80 % der Zellen.

Tabelle 3: Auswertungsschema für den Reaktions-Index ($R = (Z+L)/2$) nach DIN EN ISO 9363-1 (1999)

Bewertung	Interpretation	Reaktionsindex R (Mittelwert zweier Prüfmuster)
0	Nicht zytotoxisch	0/0 bis 0,5/0,5 ¹⁾ oder 1/0
1	Leicht zytotoxisch	1/1 bis 1,5/1,5
2	Mäßig zytotoxisch	2/2 bis 3/3
3	Stark zytotoxisch	4/4 bis 5/5

¹⁾ Wenn sich aus dem Mittelwert zweier Prüfungen mit den Ergebnissen 1/1 und 0/0 ein Reaktions-Index von 0,5/0,5 ergab, war die Prüfung zu wiederholen, um das Ergebnis „nicht zytotoxisch“ oder „leicht zytotoxisch“ zu sichern.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus den LAL-Tests

Die statistische Auswertung erfolgte unter Annahme einer Normalverteilung der erhobenen Daten mittels one-way-ANOVA und Kruskal-Wallis-Test und dem Programm Graph Pad Prism, wobei p-Werte < 0,05 einen signifikanten Unterschied darstellten.

3.1.1 Endotoxin-Standardgerade

Zunächst wurden die Standardgeraden für die Endotoxin-Wiederfindungsrate in PBS, Na-Thioglykolat und Endotoxin-freiem Wasser dargestellt. Es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit in den untersuchten Lösungen (Abb. 12). Die verhältnismäßig geringen Absorptionswerte bei 405 nm sind das Ergebnis des halben Ansatzes der verwendeten Reagenzien.

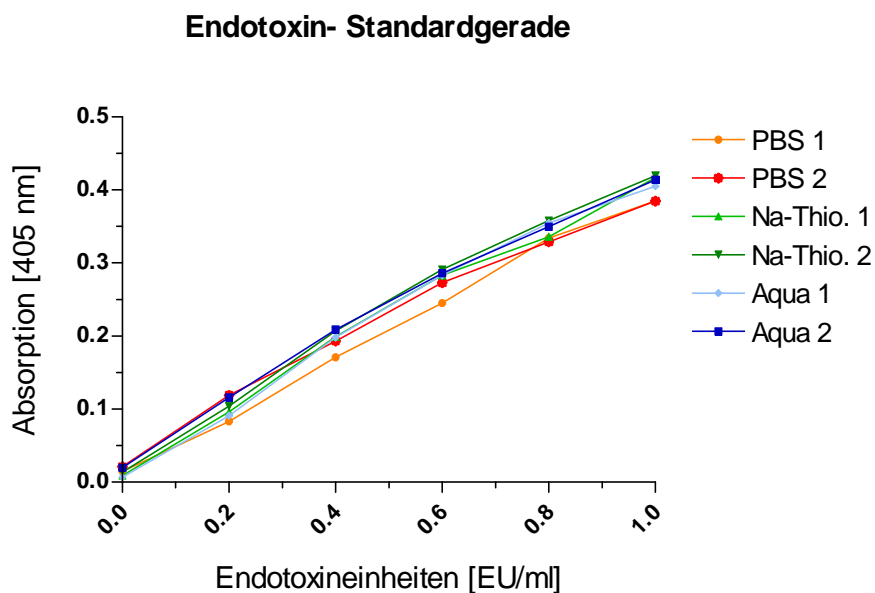


Abb. 12: Endotoxin-Standardgeraden in PBS, Na-Thioglykolat und Endotoxin-freiem Wasser unter Anwendung des chromogenen LAL-Tests und halbmaximaler Volumina der vorgeschriebenen Reagenzien.

3.1.2 Vergleich der Endotoxin-Bindungsfähigkeit

Kontrollgruppe (PBS): In den Kontrollen mit PBS ließen sich nach 24 h von den zugesetzten 2,52 µg noch etwa 2,44 µg LPS nachweisen, was einer Bindung von lediglich 0,08 µg LPS an die Wand der Zellkulturplatten entspricht. Auffällig ist, dass sich der Wert nachweisbaren Endotoxins unter Fortschreiten der Versuchszeit erhöht

(allerdings nie über den Ausgangswert) statt erniedrigt (0,5 h: 1,89 μg , 3 h: 2,36 μg , 24h: 2,44 μg). Signifikante Unterschiede bestanden nach 3 h zu Aquacel[®] und nach 24 h zu Aquacel[®] und Actisorb[®] Silver (Abb.13).

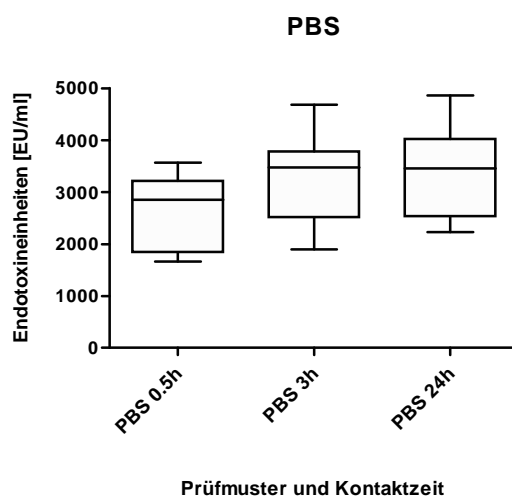


Abb. 13: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Nylon: Für Nylon konnte keine Zeitabhängigkeit der Bindung nachgewiesen werden (0,5 h: 1,6 μg , 3 h: 2,05 μg , 24 h: 1,87 μg) (Abb. 14). Signifikante Unterschiede, auch zu den übrigen Prüfmustern oder zu den Kontrollen, zeigten sich im gesamten Versuchsverlauf nicht.

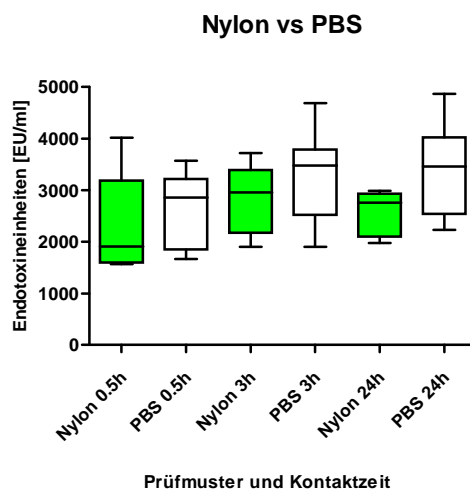


Abb. 14: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von Nylon in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS im Vergleich mit der Kontrolle ohne Wundaufgabe (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Actisorb[®] Silver: Actisorb[®] Silver weist eine deutliche, zeitabhängige Endotoxin-Bindung auf. Es konnten nach 0,5 h 1,21 μg , nach 3 h 0,64 μg und nach 24 h nur noch 0,11 μg Endotoxin nachgewiesen werden, d. h. nach 24 h war nahezu die

gesamte Menge an Endotoxin absorbiert (Abb.15). Ein signifikanter Unterschied zu Kontrolle mit PBS zeigte sich bei Actisorb[®] Silver nach 24 h ($p < 0,01$).

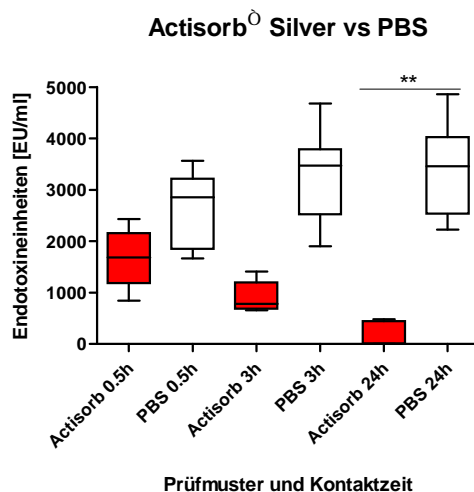


Abb. 15: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von Actisorb[®] Silver in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS im Vergleich mit der Kontrolle ohne Wundauflage (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

CarboFlex[®]: Bei CarboFlex[®] konnten nach 24 h 1,93 μ g LPS nachgewiesen werden. Die Werte zeigten sich über den Versuchsverlauf weitgehend konstant (0,5 h: 2,17 μ g, 3 h: 2,19 μ g), so dass eine Zeitabhängigkeit nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.16). Zu keiner Zeit bestanden signifikante Unterschiede zu PBS oder einem der anderen Prüfmuster.

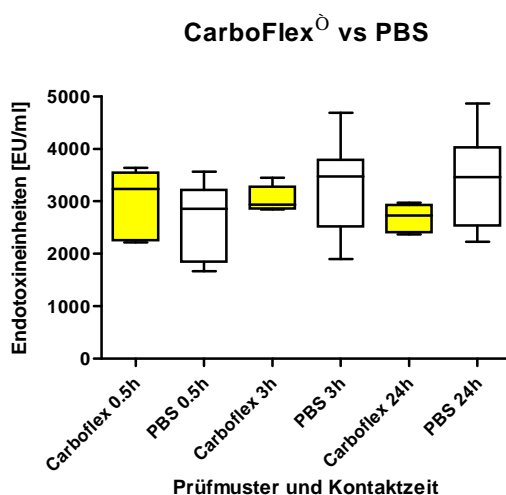


Abb. 16: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von CarboFlex[®] in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS im Vergleich mit der Kontrolle ohne Wundauflage (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Contreet-H[®]: Bei Contreet-H[®] zeigte sich eine Zeitabhängigkeit bezüglich der Endotoxin-Konzentration. Nach 0,5 h fanden sich 2,56 μ g, nach 3 h 2,8 μ g und nach

24 h 3,14 µg LPS. Die gefundene Menge LPS überstieg hierbei von Anfang an die vorgelegte Menge (Abb.17).

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber PBS ließ sich über den gesamten Versuchsablauf bei Contreet-H[®] nicht nachweisen.

Es fanden sich jedoch signifikante Unterschiede bereits nach 3 h zwischen Contreet-H[®] und Actisorb[®] Silver (3h: $p < 0,05$, 24 h: $p < 0,001$) sowie über den gesamten Zeitverlauf im Vergleich Contreet-H[®] und Aquacel[®] (0,5 h: $p < 0,05$, 3 h; $p < 0,001$, 24 h: $p < 0,001$).

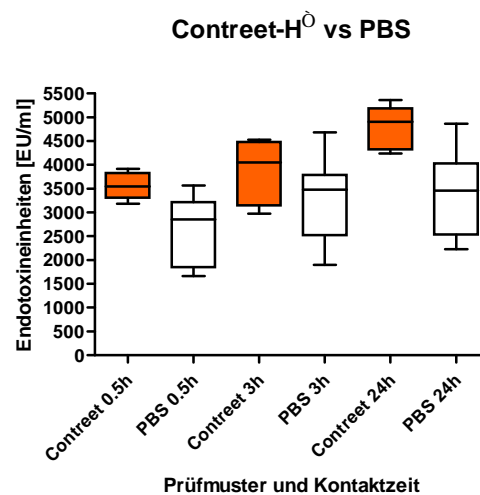


Abb. 17: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von Contreet-H[®] in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS im Vergleich mit der Kontrolle ohne Wundauflage (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Aquacel[®]: Aquacel[®] zeigte signifikante Unterschiede gegenüber PBS nach 3 h ($p < 0,01$) und 24 h ($p < 0,01$). Die Wiederfindungsrate für LPS betrug bereits nach 0,5 h nur 0,35 µg. Nach 3 h war die gesamte Menge des zugegebenen Endotoxins gebunden und wurde über den Versuchsverlauf auch nicht wieder freigesetzt (Abb. 18). Im Vergleich mit Contreet-H[®] bestanden signifikante Unterschiede bereits nach 0,5 h (0,5 h: $p < 0,05$, 3 h; $p < 0,001$, 24 h: $p < 0,001$).

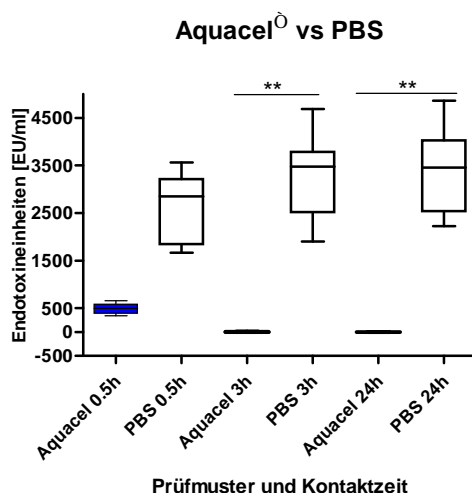


Abb. 18: Box-and-Whisker-plots mit Median und Standardfehler des resultierenden Endotoxin-Gehalts im Überstand nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation von Aquacel[®] in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS im Vergleich mit der Kontrolle ohne Wundauflage (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Gesamtvergleich der Endotoxin-Bindung: Der Vergleich zeigt die guten Bindungseigenschaften insbesondere von Aquacel[®] aber auch von Actisorb[®] Silver mit signifikanten Unterschieden zu Contreet-H[®] nach 3 h (Aquacel[®]: $p < 0,01$) und 24 h (Aquacel[®]: $p < 0,001$; Actisorb[®] Silver: $p < 0,001$) (Abb. 19).

Endotoxin-Bindung der Wundauflagen

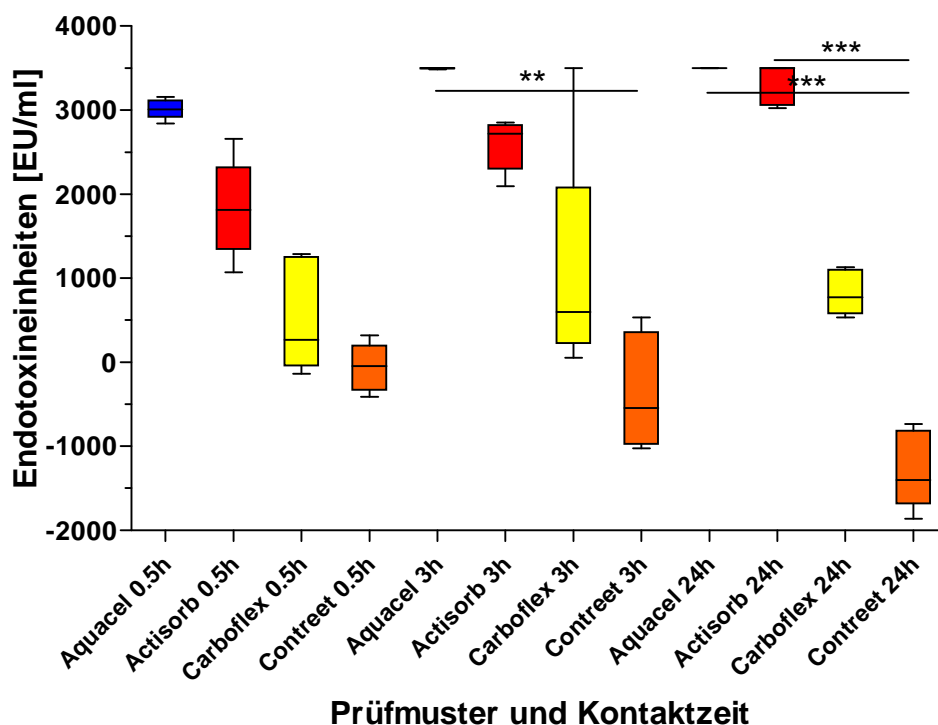


Abb. 19: Box-and-Whisker-plots mit Anzeige der gebundenen Menge Endotoxins durch die Wundauflagen nach 0,5 h, 3 h und 24 h Inkubation der Prüfmuster in 8 ml Endotoxin-Lösung ($3,5 \times 10^3$ EU/ml) in PBS (Dunn's multiple comparison test/1 way Anova)

Auch aus Tabelle 4 ist deutlich die Überlegenheit von Aquacel[®] hinsichtlich der Bindungskapazität zu ersehen. Die zweitbesten Werte werden von Actisorb[®] Silver erzielt, wobei die Bindungskapazität dieser Wundauflage hauptsächlich auf den Aktivkohlekern zurückzuführen ist, da durch Nylon lediglich 0,65 µg/24 h gebunden werden. Contreet-H[®] erzielt keine Bindung, es wird sogar eine größere Menge Endotoxin wiedergefunden, als anfangs zugegeben wurde.

Tabelle 4: Gebundene Mengen Endotoxin je Wundauflage insgesamt und pro cm² Prüfmuster

Wundauflage		Bindung in 24 h			
		Insgesamt		pro cm ² Wundauflage	
		in EU	in µg	in EU	in µg
Aquacel [®]		28000	2,52	4480	0,40
Actisorb [®] Silver		26820	2,41	4291	0,39
Davon	Aktivkohle	19564	1,76	8695	0,78
	Nylon	7256	0,65	1014	0,09
CarboFlex [®]		6528	0,59	1044	0,09
Contreet-H [®]		-6888	-0,62	-1102	-0,10

3.1.3 Endotoxin-Freisetzung bei Exposition der Wundauflagen mit *Pseudomonas aeruginosa* im Vergleich zur Kontrolle

Es konnten maximal 100 EU/ml in der Prüflüssigkeit nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Abhängigkeit von der Inokulum-Dichte; die höchsten Endotoxin-Werte traten jeweils bei den höchsten Endkoloniezahldichten auf.

Tabelle 5: Kontaktzeiten, eingesetzte Endkoloniezahldichte des Inokulums *Pseudomonas aeruginosa* und freigesetzte Endotoxin-Menge der Prüfmuster sowie der Kontrolle in PBS ohne Wundauflage.

Kontaktzeit	Endkoloniezahldichte	freigesetzte Endotoxine [EU/ml]					
		PBS	Actisorb [®] Silver	Nylon	Aquacel [®]	CarboFlex [®]	Contreet-H [®]
0,5	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	0	3,4	0
	10 ⁵ -10 ⁶	0	0	0	0	0	0,4
	10 ⁶ -10 ⁷	7,5	20,5	32,3	0	43,9	0
1,0	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	0	0	0
	10 ⁵ -10 ⁶	0	0	0	0	0	0
	10 ⁶ -10 ⁷	6,8	22,8	27,2	0	33	0
3,0	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	0	0	1,3
	10 ⁵ -10 ⁶	0	0	0	0	0	1,2
	10 ⁶ -10 ⁷	13,7	23,2	*	1,3	100,1	1,3

*nicht messbar, oberhalb des Standards

3.2 Vergleich der bakterioziden Wirkung

In den nach 0,5 h entnommenen Proben konnte nur eine minimale bakteriozide Wirkung nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete Contreet-H[®], bei der bereits nach dieser Zeit ein vergleichsweise hoher RF-Wert zu verzeichnen war (Tab. 6).

Auch nach 1 h Inkubation mit den Prüfmustern zeigte sich – wieder mit Ausnahme von Contreet-H[®] - nur eine schwache bakteriozide Wirkung.

Nach 3 h konnte, insbesondere bei den silberhaltigen Wundauflagen Actisorb[®] Silver und Contreet-H[®], ein deutlicher Anstieg des Reduktionsfaktors nachgewiesen werden. Im Falle von Actisorb[®] Silver konnte nach Inokulation mit 10^6 - 10^7 KbE/ml die bakteriozide Wirkung aus den Versuchen mit geringerer Zelldichte nicht reproduziert werden.

Aquacel[®] und CarboFlex[®] zeigten, als Vertreter der Wundauflagen ohne bakteriozide Wirkstoffe, nur eine sehr geringe zeitabhängige Reduktion, aber eine tendenzielle Steigerung des Reduktionsfaktors je nach Höhe der eingesetzten Zelldichte.

Bei Nylon ließ sich nach 3 h im Bereich der niedrigen log-Stufen ein relativ hoher Reduktionsfaktor von 1,5 nachweisen.

Tabelle 6: Kontaktzeiten, eingesetzte Endkoloniezahldichte des Inokulums *Pseudomonas aeruginosa* und resultierende Reduktionsfaktoren (RF) in Anwesenheit der jeweiligen Prüfmuster.

Kontaktzeit	Endkoloniezahldichte	RF-Wert				
		Nylon	Actisorb [®] Silver	Aquacel [®]	CarboFlex [®]	Contreet-H [®]
0,5	10^4 - 10^5	0,177	0,320	0,221	0,373	1,301
	10^5 - 10^6	0,189	0,362	0,141	0,638	0,508
	10^6 - 10^7	0,243	0,215	0,547	0,717	0,831
1,0	10^4 - 10^5	0,110	0,809	0,247	0,561	1,541
	10^5 - 10^6	-0,003	0,784	0,222	0,740	0,562
	10^6 - 10^7	0,372	0,430	0,688	0,783	0,965
3,0	10^4 - 10^5	1,513	4,796	0,391	0,643	4,580
	10^5 - 10^6	0,717	5,863	0,551	1,104	5,317
	10^6 - 10^7	-0,238	2,396	1,077	1,155	6,361

3.3 Vergleich der Zytotoxizität

Im Agarose-Overlay-Test zeigte sich Actisorb[®] Silver stark zytotoxisch (Tab. 7).

Für die ebenfalls silberhaltige Wundauflage Contreet-H[®] konnte eine leichte zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden (Tab. 7).

CarboFlex[®], als Vertreter der Aktivkohle-haltigen Wundauflagen, wies eine leichte zytotoxische Wirkung auf (Tab. 7).

Auch für Aquacel[®] konnte eine leichte zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden (Tab. 7).

Tabelle 7: Bewertung des Agarose-Overlay-Tests der Prüfmuster mit Zonen-, Lyse- und Reaktions-Index gegenüber L929-Zellen.

	Zonen-Index	Lyse-Index	Reaktions-Index	Bewertung
Positivkontrolle	3	5	4	stark zytotoxisch
	3	5	4	
Negativkontrolle	1	0	0,5	nicht zytotoxisch
	1	0	0,5	
Actisorb[®] Silver	3	5	4	stark zytotoxisch
	2	5	3,5	
Contreet-H[®]	3	0	1,5	leicht zytotoxisch
	3	0	1,5	
CarboFlex[®]	1	1	1	leicht zytotoxisch
	1	0	1	
Aquacel[®]	1	1	1	leicht zytotoxisch
	1	1	1	

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Prüfmuster

Für die optimale Versorgung einer Wunde ist eine sorgfältige Beurteilung derselben von entscheidender Bedeutung. So ist eine nässende, infizierte Wunde anders zu behandeln, als eine trockene, nicht infizierte; eine chronische Wunde anders, als z. B. eine frische OP-Wunde. Für jede Wunde und für jedes Stadium gibt es auf die aktuellen Bedürfnisse abgestimmte Wundauflagen. Die Auswahl ist jedoch nicht leicht zu treffen, zumal das medizinische Personal diesbezüglich häufig nicht fortgebildet ist und die Wahl der Wundauflage daher nicht selten schlicht persönlichen Vorlieben entspricht.

In Anbetracht der Resistenzlage vieler Bakterien gegenüber gängigen Antibiotika, wurde der Entschluss zur Untersuchung einer Silber-Aktivkohle-Auflage und ihr Vergleich mit anderen Wundauflagen gefällt. Ausgehend von Actisorb[®] Silver, deren bakteriozide Wirkung über die Verwendung einer Silber-Aktivkohle-Verbindung erzeugt wird, erfolgte die Auswahl der übrigen Prüfmuster:

Actisorb[®] Silver: Silber- und Aktivkohle-haltig

Contreet-H[®]: Silber- und Alginat-haltig

CarboFlex[®]: Aktivkohle-, Alginat- und Hydrofaser-haltig

Aquacel[®]: Hydrokolloidverband

Zusätzlich wurde die Polyamidhülle (Nylon) von Actisorb[®] Silver separat getestet. Es sollte untersucht werden, inwieweit das Nylon für die Endotoxin-Bindung in Frage kommt.

Somit wurde eine Auswahl an Wundauflagen untersucht, mittels welcher verschiedene Wundformen behandelt werden können. Da bei einer Wunde die Indikation für verschiedene Wundauflagen bestehen kann (z. B. für eine bakteriozide aber auch für eine absorbierende Wundauflage, wenn die Wunde infiziert ist und nässt), war es das Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, mit der Wundauflagen untereinander verglichen werden können. Es wurde ein Versuchsmodell entwickelt, mittels welchem bakteriozide Wirkung und Endotoxin-Aufnahmekapazität parallel untersucht werden können und so eine weitere Entscheidungshilfe für die Auswahl der richtigen Wundauflage geschaffen.

4.2 Ergebnisse

Nach Festlegung des Versuchsablaufs sollte zunächst überprüft werden, ob und in welchem Maße durch die Prüfmuster eine Endotoxin-Bindung erfolgt. Hierzu wurden als erster Schritt LPS-Bindungsstudien mit Hilfe eines Endotoxin-Standards durchgeführt.

In der Kontrollgruppe (PBS) erhöhte sich der Wert nachweisbaren Endotoxins unter Fortschreiten der Versuchszeit (Abb. 13). Ursächlich kommt eine unvollständige bzw. reversible Bindung an die Kavitätenwände in Betracht.

Für die Bindung des Endotoxins an bzw. in die Wundauflagen kommt zum einen die Fähigkeit der Wundauflagen zu quellen und damit Flüssigkeit zu speichern in Betracht. Es ist aber auch von elektrostatischen Wechselwirkungen auszugehen, da z. B. im Falle von Aquacel[®] zwar viel, aber nicht alle Flüssigkeit gebunden werden konnte. Dennoch wurde selektiv Endotoxin gespeichert.

Aquacel[®] war das Prüfmuster mit der höchsten Bindungskapazität für LPS, dicht gefolgt von Actisorb[®] Silver.

Die Nylonumhüllung von Actisorb[®] Silver hat eine Größe von 2,5 x 2,5 cm, wobei jedoch der Aktivkohle-Silber-Kern nur eine Größe von 1,5 x 1,5 cm aufweist. Die Bindung an die Nylonhülle beträgt 0,65 µg/24 h (Tab. 4). Bei einer Bindung von 2,41 µg/24 h insgesamt an Actisorb[®] Silver kann daher von einer Endotoxin-Aufnahmefähigkeit des Aktivkohle-Silber-Gewirks von 0,78 µg/cm² ausgegangen werden. Dies entspricht einer Menge von 8691 EU/cm², wobei dies immer als ein Mindestwert gesehen werden muss, da die Möglichkeit besteht, dass über einen längeren Zeitraum bzw. bei größerer zugegebener Menge noch mehr LPS gebunden werden könnte. Somit ist die Endotoxin-Bindungskapazität in erster Linie durch den Aktivkohlekern bedingt (Tab. 4). Dass für die ebenfalls Aktivkohle-haltige Wundauflage CarboFlex[®] keine nennenswerte Endotoxin-Bindungskapazität nachgewiesen werden konnte, ist durch die unterschiedlichen Umhüllungen der jeweiligen Aktivkohlekerne erklärbar (Abb. 5+7). Es ist zu vermuten, dass die deutlich dickere Hülle von CarboFlex[®] die Aufnahme von Endotoxin in den Aktivkohlekern behindert.

Bei Contreet-H[®] konnte in der Probe mehr Endotoxin nachgewiesen werden, als ursprünglich hinzugegeben worden war. Signifikante Unterschiede zu Actisorb[®] Silver bestanden bereits nach 3 h und auch noch nach 24 h (Abb. 18). Hier ist die Möglichkeit eines endogenen Endotoxin-Gehalts gegeben. Ob es sich hierbei um

eine akzidentelle Kontamination der Charge handelt oder einer der Bestandteile per se Endotoxin-haltig ist, konnte nicht ermittelt werden. Da es sich aber um einen zeitabhängigen Anstieg der Endotoxin-Konzentration handelt, ist eine rein oberflächliche Kontamination eher unwahrscheinlich. Ferner kommt in Betracht, dass aus der Wundaufgabe eine Substanz gelöst wurde, die die Enzyme des LAL-Testes zusätzlich aktiviert und somit eine höhere Endotoxin-Menge vortäuscht. Diese Wirkung konnte in Versuchen von Ludwig et al. (41) für zugesetzte Füllstoffe in Endotoxin-Zubereitungen festgestellt werden und ist theoretisch auch auf lösliche Komponenten aus Contreet-H[®] übertragbar. Ob und welche Stoffe hier gelöst würden, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Im zweiten Schritt erfolgte die Überprüfung der bakterioziden Wirkung und parallel hierzu der Endotoxin-Freisetzung. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Wundaufgaben im Hinblick auf ihre bakteriozide Wirkung untersucht.

Hier schnitten erwartungsgemäß die silberhaltigen Wundaufgaben Actisorb[®] Silver und Contreet-H[®] am besten ab. Damit bestätigen die Versuche dieser Arbeit andere, bereits in der Literatur vorliegende Ergebnisse (14, 77, 79). Es ergab sich in der frühen Testphase eine Überlegenheit von Contreet-H[®], die sich mit fortschreitender Zeit im Testverlauf jedoch nahezu relativierte (Tab. 6). Dies ist gut durch die Ergebnisse von Thomas und McCubbin (72) zu erklären. Sie untersuchten die antimikrobiellen Effekte u. a. von Actisorb[®] Silver und Contreet-H[®] und konnten für Contreet-H[®] eine stärkere unmittelbare antimikrobielle Aktivität nachweisen, wohingegen Actisorb[®] Silver die antimikrobiellen Effekte weniger im Bereich der Wunde zeigte, die Erreger jedoch in der Wundaufgabe aufnehmen und bis zu ihrer Inaktivierung binden konnte. Auch die Tatsache, dass die antimikrobielle Wirkung von Actisorb[®] Silver im Bereich höherer Inokulum-Dichten wieder abfällt, lässt sich durch diesen Mechanismus und eine zu vermutende Sättigung der Speicherkapazität gut erklären. Für die Polyamidhülle von Actisorb[®] Silver (Nylon) ließ sich nach 3 h im Bereich der niedrigen Koloniezahldichten ein relativ hoher Reduktionsfaktor von 1,5 nachweisen. Es ist zu anzunehmen, dass auch Nylon nach längerem Kontakt die Fähigkeit zur Bindung des Inokulums besitzt, bei steigender Bakteriendichte aber rasch eine Sättigung erreicht ist.

Für CarboFlex[®] und Aquacel[®] konnten aufgrund der fehlenden bakterioziden Agenzien erwartungsgemäß keine hohen Reduktionsfaktoren ermittelt werden. Die Reduktion der eingesetzten Koloniezahldichte um maximal $RF = \sim 1$ ist damit eher auf

das natürliche Bakteriensterben sowie die Bindung von Bakterien an und in diese Wundauflagen, als auf eine bakteriozide Wirkung zurückzuführen. Die hohe Bindungskapazität der Prüfmuster für Wundsekrete ergibt somit auch eine hohe Bindungskapazität für die im Inokulum bzw. in vivo im Wundsekret enthaltenen Bakterien, ohne diese jedoch aktiv zu zerstören. Marginal ist CarboFlex® Aquacel® überlegen (Tab. 6).

Im selben Schritt wurde auf Basis der LPS-Bindungsstudien die Fähigkeit der Auflagen untersucht, das bei der Zerstörung Gram-negativer Bakterien freiwerdende Endotoxin zu binden. Eine Endotoxin-Freisetzung von mehr als 5 EU/ml konnte im Bereich der Koloniedichten bis 10^6 KbE/ml bei keinem der Prüfmuster nachgewiesen werden (Tab. 5). Nun könnte man annehmen, dass zwar Endotoxin freigesetzt, durch die Wundauflagen aber sofort wieder gebunden wird. Da aber auch bei Contreet-H® – für das keine Bindungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte – trotz guter mikrobiozider Wirkung kein nennenswerter Endotoxin-Anstieg gemessen werden konnte, ist davon auszugehen, dass im Bereich dieser Koloniezahlen keine relevante Endotoxin-Freisetzung unter bakteriozider Wirkung erfolgt. Im Falle der Untersuchungen mit der höchsten Koloniezahldichte (10^7 KbE/ml) war – mit Ausnahme von Aquacel® - bei allen Prüfmustern und selbst in der Kontrolle eine kleine Menge Endotoxin nachweisbar (max. 100 EU/ml) (Tab. 5). Die Menge an nachweisbarem LPS wäre durchaus im Rahmen des Fehlers, welcher bei einer Messung auftreten kann. Da die Menge jedoch regelhaft bei den Proben mit der höchsten Koloniezahldichte - und dies auch in der Kontrolle mit PBS - nachzuweisen war, muss hier von einer vergleichsweise höheren Endotoxin-Freisetzung durch das Absterben der Bakterien ausgegangen werden. Hier ist, bei einer derart großen Menge Bakterien und eingeschränktem Nahrungsangebot, auch der physiologische Bakterientod zu beachten.

100 EU entsprechen rund 10 ng Endotoxin. Bei größeren Wunden mit hoher Besiedelung kann es daher durchaus zu einer Beeinflussung der Wundheilung oder gar zu systemischer Beeinflussung kommen. In diesen Fällen besteht die Indikation für eine Endotoxin-absorbierende Wundauflage.

Abschließend wurden die Wundauflagen mit einem Agarose-Overlay-Test auf ihre Zytotoxizität untersucht. Hier zeigte Actisorb® Silver eine starke Zytotoxizität, für alle übrigen Wundauflagen konnte nur eine leichte Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Die zytotoxische Wirkung silberhaltiger Wundauflagen ist bekannt. So konnten z. B. Müller und Kramer (51) 2008 in ihren Untersuchungen eine hohe Zytotoxizität für silberhaltige Antiseptika nachweisen. Bereits 2007 stellten Burd et al. (4) im Gewebe-Explantattest ab dem 7. Tag eine deutliche Einschränkung der Reepithelisation unter Verwendung der silberhaltigen Wundauflagen Acticoat und Contreet-Schaumverband fest. Sie konnten auch nachweisen, dass die Zytotoxizität silberhaltiger Wundauflagen mit der Menge freigesetzten Silbers anstieg. Zwar ist die starke Zytotoxizität von Actisorb[®] Silver sehr wahrscheinlich auf den Silbergehalt zurückzuführen, bisher wurde jedoch davon ausgegangen, dass sich die bakteriozide Wirkung in der Wundauflage abspielt und keine Silberionen freigesetzt werden (9). Dies wird auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt (Tab. 6). Demgegenüber fällt die Zytotoxizität der ebenfalls silberhaltigen Auflage Contreet-H[®] in dieser Untersuchung deutlich geringer aus, obwohl hier von einer Freisetzung von Silberionen ausgegangen wird (9). Es ist auffällig, dass Actisorb[®] Silver nahezu einen genauso großen Zonenindex aufweist, wie Contreet-H[®] (Tab. 7), was vermuten lässt, dass entweder die Silberionen doch nicht fest in die Wundauflage gebunden sind, oder aber, dass ein anderer Bestandteil der Wundauflage für die Zytotoxizität verantwortlich ist. Als ursächlich für die Zytotoxizität von Actisorb[®] Silver kommen somit auch die Polyamidhülle und der Aktivkohlekern in Betracht, allerdings wurden sie in dieser Arbeit nicht separat untersucht. In anderen Analysen (32) mittels Gewebeexplantationstest und Wachstumsinhibitionstest konnte für Contreet-H[®], nach Gewinnung von Extrakten aus demselben, eine starke Zytotoxizität nachgewiesen werden, was die Ergebnisse aus oben genannten Untersuchungen (4, 51) zur Zytotoxizität silberhaltiger Wundauflagen stützt.

Somit ist der Agarose-Overlay-Test allein für diese Wundauflagen kein ausreichendes Untersuchungsverfahren. Zur weiteren Beurteilung der Zytotoxizität sollten zusätzliche Untersuchungen wie z. B. Wachstumsinhibitionstests oder Gewebeexplantationstests durchgeführt werden.

4.3 Schwachpunkte

Möglicherweise erfolgt eine Beeinflussung des LAL-Tests durch eine Anheftung des Endotoxins an das Material der Untersuchungsbehältnisse, wodurch weniger Lipid A für den Test zur Verfügung steht. Auch kann eine Behinderung oder Steigerung der Test-Enzyme durch aus den Behältnissen gelöste Substanzen (z. B. Weichmacher,

Cellulose) bzw. Stoffe aus dem Herstellungsprozess (mit denen z. B. die Untersuchungsbehältnisse aus der Gussform gelöst werden) erfolgen (34, 53). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Zugabe bestimmter Füllstoffe in der Endotoxin-Zubereitung die Endotoxin-Absorption an die Materialien verhindern kann (41). So führte z. B. Wasser, das vor der Verwendung im LAL-Test in Polystyren-Behältern aufbewahrt wurde, zu einer Steigerung der Werte des LAL-Tests, obwohl eine Endotoxin-Kontamination des Wassers ausgeschlossen werden konnte. Novitski et al. (54) konnten nachweisen, dass es abhängig vom Material der Endotoxin-Aufbewahrungsröhrchen zu unterschiedlichen Wiederfindungsraten für Endotoxin kommt. Hierbei schnitten Glas und Polystyren besser ab als beispielsweise Polypropylen. Diese Ergebnisse konnten von Roslansky et al. (61) 1991 bestätigt werden. Weiter fanden sie heraus, dass die Endotoxin-Wiederfindungsrate sich sowohl in den Kunststoff-Materialien als auch in den Glas-Materialien erhöht, wenn man 0,05% Triethylamin (TEA) in die Endotoxin-Lösung gibt. Hierdurch verbessert sich die Löslichkeit von Endotoxin in Wasser. Auch bei Glas ist also keine 100 %ige Wiederfindungsrate gegeben.

In den Versuchen dieser Arbeit wurden pyrogenfreie Glas-Materialien und Polystyren-Zellkulturplatten verwendet. Von den fünf durch Roslansky et al. (61) untersuchten Polystyren-Mustern verschiedener Hersteller konnte für zwei keine Beeinflussung der Endotoxin-Wiederfindungsrate nachgewiesen werden. Bei den restlichen drei Mustern konnte mehr Endotoxin wiedergefunden werden, als ursprünglich zugegeben worden war. Insbesondere traf das für jene Polystyren-Behältnisse zu, die speziell für Zellkulturen ausgewiesen waren. Inzwischen wird empfohlen, Plastikmaterialien vor Durchführung von Endotoxin-Tests bezüglich der Endotoxin-Wiederfindungsmenge zu untersuchen (34). Diese Empfehlung wurde aber ausgesprochen, als die Untersuchungen dieser Arbeit bereits abgeschlossen waren. Somit ist für alle Versuche die Möglichkeit einer Beeinflussung der Endotoxin-Wiederfindungsrate durch die Untersuchungsbehältnisse gegeben. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit eine reversible Bindung von Endotoxin in der PBS-Kontrolle nachgewiesen werden. Da es sich jedoch um quantitative Versuche handelt und für alle Versuche die gleichen Materialien verwendet wurden, bleibt die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unbeeinflusst.

In den Berechnungen der Bindungskapazität/cm² wurde nur eine Seite der Wundauflage mit einbezogen, obwohl beide Seiten mit der Inkubationslösung in

Kontakt kamen. Die Entscheidung hierzu wurde getroffen, da auch in vivo nur eine Seite auf dem Patienten liegt und ausgehend hiervon die Größe und Bindungskapazität berechnet werden sollten. Kennzeichen einiger der Auflagen ist, dass sie sehr viel Flüssigkeit aufnehmen und behalten, wodurch die Fasern aufquellen und das Endotoxin speichern (z. B. Aquacel®). Zwar haben einige der Wundaufgaben zwar unterschiedliche Ober- und Unterseiten, das Wundexsudat kann die Wundaufgabe aber komplett durchtränken und somit alle Schichten erfassen. Diese Eigenschaften wären in der zweiseitigen Betrachtung unberücksichtigt geblieben. Die geringe Menge des zusätzlich an die Oberfläche der Auflagenoberseite gebundenen Endotoxins scheint somit vernachlässigbar.

Es muss bedacht werden, dass die Umsetzung der hier gewonnenen In-vitro-Erkenntnisse ggf. nur eingeschränkt auf die In-vivo-Situation übertragen werden können. Zwar konnten wir in einer proteinbelasteten Untersuchungsreihe (hier nicht aufgeführt) Ergebnisse erzielen, die den hier publizierten entsprechen, jedoch bleiben Faktoren wie z. B. der Kontakt mit Blut und Blutprodukten, die Einflussnahme unterschiedlicher Feuchtigkeitsgrade der Wunde, gemischte Keimflora, pH-Wert-Veränderungen und Verbandswechsel nach > 24 h unberücksichtigt.

4.4 Schlussfolgerung

Erstes und wichtigstes Kriterium für die Wahl einer Wundaufgabe ist nach wie vor die Betrachtung der gesamten Wunde. Hierbei müssen die Festlegung des Wundstadiums sowie des Exsudations- und Infektionsgrades erfolgen und die betroffene Körperfläche ermittelt werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können lediglich isolierte Empfehlungen hinsichtlich der Wahl bei bakteriell belasteten und Endotoxin-gefährdeten Wunden (z. B. großflächigen Verbrennungswunden) ausgesprochen werden.

Actisorb® Silver ist in diesem Vergleich bei bakteriell und mit Endotoxin belasteten Wunden als überlegen einzustufen und daher für diese zu empfehlen.

Contreet-H® kann für bakteriell belastete, nicht aber für Endotoxin-gefährdete Wunden empfohlen werden.

Da Aquacel® für Endotoxin-gefährdete Wunden gut geeignet ist, jedoch keine bakteriozide Wirkung zeigt, kann keine isolierte Anwendung auf bakteriell belasteten Wunden empfohlen werden. Hier könnte in der Praxis eine Kombination mit einem antibakteriellen Wirkstoff erfolgen.

Für CarboFlex® kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine Empfehlung abgeleitet werden.

Stark vereinfacht sind diese Empfehlungen in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Vereinfachte Darstellung der Empfehlung zur Verwendung der Wundauflagen

Wundauflage Wunde	Actisorb® Silver	Aquacel®	Contreet-H®	CarboFlex®
Bakteriell belastet	+	-	+	-
Endotoxin- gefährdet	+	+	-	-

+ = zu empfehlen

- = nicht Auflage der ersten Wahl

Empfehlungen hinsichtlich der Zytotoxizität wurden bewusst nicht ausgesprochen, da die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung für eine abschließende Beurteilung nicht ausreichend ist.

Diese Arbeit liefert wichtige Kriterien zur Wahl der richtigen Wundauflage und stellt eine weitere Methode zur vergleichenden Untersuchung von Wundauflagen zur Verfügung. Weitere Forschung in diesem Bereich ist jedoch dringend erforderlich.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Wundauflagen hinsichtlich ihrer bakterioziden Wirksamkeit und ihrer Fähigkeit zur Endotoxin-Bindung untersucht und verglichen. Hierzu wurden die Wundauflagen in einer Endotoxin- bzw. Bakterien-Lösung inkubiert und nach festgelegten Kontaktzeiten der Endotoxin- bzw. der Bakteriengehalt im Überstand gemessen. Der Endotoxin-Nachweis erfolgte jeweils mittels LAL-Test, die Bakteriensuspensionen wurden auf CSA-Platten kultiviert und ausgezählt. Abschließend erfolgte die Untersuchung der Wundauflagen auf Zytotoxizität in einem Agarose-Overlay In-vitro-Zytotoxizitätstest.

Für den Hydrokolloidverband Aquacel[®] ergab sich die höchste Bindungskapazität für LPS. Dem Aktivkohlekern der Wundauflage Actisorb[®] Silver kann ebenfalls eine hohe Endotoxin-Bindungskapazität bescheinigt werden. Die Aktivkohle-Auflage CarboFlex[®] bindet nur eine viel geringere Menge Endotoxins. Sie unterscheidet sich von Actisorb[®] Silver unter anderem durch eine deutlich dickere Umhüllung des Aktivkohlekerns. Bei Contreet-H[®] kommt es – am ehesten bedingt durch einen endogenen Endotoxin-Gehalt oder durch eine Aktivierung der Testenzyme - zu einem Anstieg der Endotoxin-Konzentration nach Inkubation.

Die silberhaltigen Wundauflagen Actisorb[®] Silver und Contreet-H[®] zeigten die beste bakteriozide Wirksamkeit. CarboFlex[®] und Aquacel[®] konnten die Bakterien in geringem Umfang binden, zeigten aber keine bakteriozide Wirksamkeit im eigentlichen Sinne.

Unter Inkubation mit der Bakteriensuspension bis Koloniezahldichten von 10^7 KbE/ml kam es zu einer maximalen Endotoxin-Freisetzung von 100 EU/ml (nach 3 h bei CarboFlex[®]). Auffällig war, dass die höchsten Endotoxin-Werte jeweils bei den höchsten Endkoloniezahldichten auftraten.

Der Zytotoxizitätstest ergab für Actisorb[®] Silver eine starke, für die übrigen Wundauflagen eine leichte Zytotoxizität. Weitere Tests wie Wachstumsinhibitions- und Gewebeexplantationstest sollten allerdings ergänzend durchgeführt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Methode entwickelt und angewendet werden, mittels welcher Wundauflagen hinsichtlich Endotoxin-Bindungskapazität, bakteriozider Wirkung und Endotoxin-Freisetzung - als Ergebnis der Wechselwirkungen der Wundauflage mit dem aufgetragenen Testbakterium - miteinander verglichen werden können.

5 Summary

In this study, various types of dressings were tested and compared regarding their bactericidal effectiveness and their ability to bind endotoxin. The dressings were incubated in a solution of endotoxin or bacteria and after determined contact times the content of endotoxin or bacteria in the supernatant was measured. The endotoxin detection was carried out using LAL test; the bacterial suspensions were cultivated on CSA plates and counted.

Finally, the wound dressings were tested for cytotoxicity in an agarose-overlay in-vitro-cytotoxicity-test.

The hydrocolloid dressing Aquacel[®] showed the highest binding capacity for LPS. The activated-carbon-core of the wound dressing Actisorb[®] Silver can also be certified a high endotoxin-binding capacity whereas the activated-carbon-dressing CarboFlex[®] binds only a much smaller amount of endotoxin. It differs from Actisorb[®] Silver e.g. through a much thicker coating of the activated-carbon-core. For Contreet-H[®] there was - most likely due to an endogenous endotoxin-content or by activating the test enzymes – an increase in endotoxin-concentration after incubation. The silver-containing dressings Actisorb[®] Silver and Contreet-H[®] showed the best bactericidal activity. CarboFlex[®] and Aquacel[®] could bind the bacteria in small scale but there was no real bactericidal activity.

Under incubation with the bacterial suspension up to bacterial quantities of 10^7 cfu/ml, there was a maximum endotoxin release of 100 EU/ml (after 3 h at CarboFlex[®]). It was striking that the highest endotoxin levels in each case occurred in the highest bacterial quantities.

The cytotoxicity-test showed a strong cytotoxicity of Actisorb[®] Silver, all other wound dressings presented only a slight cytotoxicity. Other tests, such as growth-inhibition-test and tissue-explantation-test should be carried out supplementing.

Concluding, a method could be developed and applied for the first time, by means of which wound dressings can be compared with one another regarding their endotoxin-binding-capacity, bactericidal effectiveness and endotoxin-release as a result of the interaction of the dressing and the applied test bacterium.

6 Literaturverzeichnis

1. **Bang FB.** A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 98: 325-351, 1956.
2. **Bartold PM, Narayanan AS, and Page RC.** Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *J Periodontal Res* 27: 499-505, 1992.
3. **Bishop SM, Walker M, Rogers AA, and Chen WY.** Importance of moisture balance at the wound-dressing interface. *J Wound Care* 12: 125-128, 2003.
4. **Burd A, Kwok CH, Hung SC, Chan HS, Gu H, Lam WK, and Huang L.** A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen* 15: 94-104, 2007.
5. **Cason JS, Jackson DM, Lowbury EJ, and Ricketts CR.** Antiseptic and aseptic prophylaxis for burns: use of silver nitrate and of isolators. *Br Med J* 2: 1288-1294, 1966.
6. **Crosby HA, Bion JF, Penn CW, and Elliott TS.** Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J Med Microbiol* 40: 23-30, 1994.
7. **Deitch EA, Marino AA, Gillespie TE, and Albright JA.** Silver-nylon: a new antimicrobial agent. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 356-359, 1983.
8. **Deitch EA, Marino AA, Malakanok V, and Albright JA.** Silver nylon cloth: in vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activity. *J Trauma* 27: 301-304, 1987.
9. **Donaty E.** Silber in der Wundtherapie. *Österreich Pflegezeitschr*: 14-15, 2006.
10. **Dunn DL.** Role of endotoxin and host cytokines in septic shock. *Chest* 100: 164S-168S, 1991.
11. **Edwards R and Harding KG.** Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 17: 91-96, 2004.
12. **Fox CL, Jr., Rappole BW, and Stanford W.** Control of pseudomonas infection in burns by silver sulfadiazine. *Surg Gynecol Obstet* 128: 1021-1026, 1969.
13. **Friedrich PL.** Das Verhältnis der experimentellen Bakteriologie zur Chirurgie. Leipzig. Verlag von Wilhelm Engelmann, 1897.
14. **Furr JR, Russell AD, Turner TD, and Andrews A.** Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate. *J Hosp Infect* 27: 201-208, 1994.
15. **Futuremed.ca.** Fotografien von Aquacel®. <http://www.futuremed.ca/convatec.asp>.
16. **Glaser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, and Cohen J.** Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338: 732-736, 1991.
17. **Gupta A, Matsui K, Lo JF, and Silver S.** Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* 5: 183-188, 1999.
18. **Gupta A, Phung LT, Taylor DE, and Silver S.** Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiol* 147: 3393-3402, 2001.
19. **Hill SJ and Ebersole JL.** The effect of lipopolysaccharide on growth factor-induced mitogenesis in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 67: 1274-1280, 1996.
20. **Hofstadter F.** [Pathology of wound healing]. *Chirurg* 66: 174-181, 1995.
21. **Hollinger M.** Pfeilschwanzkrebs im Größenvergleich mit einem Kind. <http://www.photolib.noaa.gov/htmls/line0682.htm>, 1985.
22. **Hollinger M.** Pfeilschwanzkrebs Unterseite. <http://www.photolib.noaa.gov/htmls/line2632.htm>, 2002.
23. **Holme R and Solum NO.** Electron microscopy of the gel protein formed by clotting of *Limulus polyphemus* hemocyte extracts. *J Ultrastruct Res* 44: 329-338, 1973.
24. **Jankicevic J, Vesic S, Vukicevic J, Gajic M, Adamic M, and Pavlovic MD.** Contact sensitivity in patients with venous leg ulcers in Serbia: comparison with contact dermatitis patients and relationship to ulcer duration. *Contact Derm* 58: 32-36, 2008.

25. **Kimura M and Kawada A.** Contact sensitivity induced by neomycin with cross-sensitivity to other aminoglycoside antibiotics. *Contact Derm* 39: 148-150, 1998.
26. **Kirudan.dk.** Fotografie von Aquacel®, an einer Ecke angefeuchtet.
http://www.kirudan.dk/seneste_nyheder/153.html.
27. **Klasen HJ.** A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26: 131-138, 2000.
28. **Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Dembinski A, and Hahn EG.** Influence of bacterial lipopolysaccharide on healing of chronic experimental ulcer in rat. *Scand J Gastroenterol* 36: 1239-1247, 2001.
29. **Kramer A, Bergemann R, Bruck J, Kammerlander G, Metelmann H-R, Roth B, and Rudolph P.** Indikationen und Auswahlkriterien für lokale Wundantiseptika und Wundauflagen im Rahmen der chirurgischen Wundbehandlung. *Beck*Eikmann*Tilkes - Hygiene in Krankenhaus und Praxis* 6. Erg.-Lfg., 1999.
30. **Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Andriessen A, Aspöck C, Bergemann R, Eberlein T, Gerngross H, Görtz G, Heeg P, Jünger M, Koch S, König B, Laun R, Peter RU, Roth B, Ruff C, Sellmer W, Wewalka G, and Eisenbeiß W.** Konsensusempfehlung Wundantiseptik, Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. *Z Wundh* 9: 110-120, 2004.
31. **Kramer A, Daeschlein G, Müller G, Roth B, and Assadian G.** Indikationen und Wirkstoffe zur antiinfektiösen Therapie sekundär heilender Wunden – Möglichkeiten und Grenzen. *Med Prax*: 42-54, 2004.
32. **Kramer A and Müller G.** In-vitro-Untersuchungen zur Abschätzung der Bioverträglichkeit der Wundauflage Contreet-H. *Prüfbericht*, 2002.
33. **Kujath P and Michelsen A.** Wunden - von der Physiologie zum Verband. *Ärztebl* 105: 239-247, 2008.
34. **Laurie AF and Dawson ME.** Laboratory Disposables and the LAL Test. *LAL Update* 22: 1-4, 2005.
35. **Levin J and Bang FB.** Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 19: 186-197, 1968.
36. **Levin J and Bang FB.** A Description of Cellular Coagulation in the Limulus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115: 337-345, 1964.
37. **Levin J and Bang FB.** The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115: 265-274, 1964.
38. **Liebers V and Raulf-Heimsoth M.** Endotoxine - Wirkung und Nachweisverfahren: BGFA-Info, 01/2003.
39. **Lippert H.** *Wundatlas, Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. Stuttgart, New York, 2006.
40. **Lowbury EJ, Jackson DM, Ricketts CR, and Davis B.** Topical chemoprophylaxis for burns: trials of creams containing silver sulphadiazine and trimethoprim. *Injury* 3: 18-24, 1971.
41. **Ludwig JD and Avis KE.** Recovery of endotoxin preparations from the surface of glass capillary tubes. *J Parenter Sci Technol* 43: 276-278, 1989.
42. **Manthous CA, Hall JB, and Samsel RW.** Endotoxin in human disease. Part 1: Biochemistry, assay, and possible role in diverse disease states. *Chest* 104: 1572-1581, 1993.
43. **McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, and Swartz MN.** Salmonella typhimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet* 1: 235-240, 1975.
44. **McKay IA and Leigh IM.** Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 124: 513-518, 1991.

45. **Metzger Z, Berg D, and Dotan M.** Fibroblast growth in vitro suppressed by LPS-activated macrophages. Reversal of suppression by hydrocortisone. *J Endod* 23: 517-521, 1997.
46. **Metzger Z, Hoffeld JT, and Oppenheim JJ.** Suppression of fibroblast proliferation by activated macrophages: involvement of H₂O₂ and a non-prostaglandin E product of the cyclooxygenase pathway. *Cell Immunol* 100: 501-514, 1986.
47. **Metzger Z, Nitzan D, Pitaru S, Brosh T, and Teicher S.** The effect of bacterial endotoxin on the early tensile strength of healing surgical wounds. *J Endod* 28: 30-33, 2002.
48. **Modak SM and Fox CL, Jr.** Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Pharmacol* 22: 2391-2404, 1973.
49. **Modak SM and Fox CL, Jr.** Sulfadiazine silver-resistant *Pseudomonas* in Burns. New topical agents. *Arch Surg* 116: 854-857, 1981.
50. **Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, and Monafo WW, Jr.** Treatment of Large Human Burns with 0.5 Per Cent Silver Nitrate Solution. *Arch Surg* 90: 812-867, 1965.
51. **Müller G and Kramer A.** Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 61: 1281-1287, 2008.
52. **Müller G, Winkler Y, and Kramer A.** Antibacterial activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb Silver 220. *J Hosp Infect* 53: 211-214, 2003.
53. **Novitsky T.** The problems with plastics. *LAL Update* 6: 1-3, 1988.
54. **Novitsky TJ, Schmidt-Gengenbach J, and Remillard JF.** Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. *J Parenter Sci Technol* 40: 284-286, 1986.
55. **Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, and Kawai T.** A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clin Chim Acta* 149: 55-65, 1985.
56. **Percival SL, Bowler PG, and Russell D.** Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* 60: 1-7, 2005.
57. **Peterbauer A, Werner ER, and Werner-Felmayer G.** [Further development of a cell culture model for the detection of bacterial pyrogens]. *Altex* 16: 3-8, 1999.
58. **Pitaru S, Solding M, Madgar D, and Metzger Z.** Bacterial endotoxin inhibits migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts in vitro and delays collagen gel contraction. *J Dent Res* 66: 1449-1455, 1987.
59. **Rietschel ET and Cavailon JM.** Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris). *J Endotoxin Res* 8: 71-82, 2002.
60. **Rosenkranz HS, Coward JE, Wlodkowski TJ, and Carr HS.** Properties of silver sulfadiazine-resistant *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 5: 199-201, 1974.
61. **Roslansky PF, Dawson ME, and Novitsky TJ.** Plastics, endotoxins, and the *Limulus* amoebocyte lysate test. *J Parenter Sci Technol* 45: 83-87, 1991.
62. **Rudolph W and Kramer A.** Studies on the microbial efficacy of Wound Dressings. *Hyg Med* 5: 184-186, 2000.
63. **Rudzki E and Rebandel P.** Cross-reactions with 4 aminoglycoside antibiotics at various concentrations. *Contact Derm* 35: 62, 1996.
64. **Schretlen-Doherty JS and Troutman WG.** Tobramycin-induced hypersensitivity reaction. *Ann Pharmacother* 29: 704-706, 1995.
65. **Silver S.** Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 27: 341-353, 2003.
66. **Singer RE and Dutton WG.** A comparison of the effects of endotoxin upon fibroblast proliferation and macromolecular syntheses. *J Dent Res* 58: 1634-1639, 1979.

67. **Solum NO.** The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb Res* 2: 55, 1973.
68. **Solum NO.** Some characteristics of the clottable protein of *limulus polyphemus* blood cells. *Thromb Diath Haemorrh* 23: 170-181, 1970.
69. **Stanford W, Rappole BW, and Fox CL, Jr.** Clinical experience with silver sulfadiazine, a new topical agent for control of pseudomonas infections in burns. *J Trauma* 9: 377-388, 1969.
70. **Teller JD and Kelly KM.** A turbidimetric *Limulus* amebocyte assay for the quantitative determination of Gram negative bacterial endotoxin. *Prog Clin Biol Res* 29: 423-433, 1979.
71. **Thomas S, Fisher B, Fram PJ, and Waring MJ.** Odour-absorbing dressings. *J Wound Care* 7: 246-250, 1998.
72. **Thomas S and McCubbin P.** A comparison of the antimicrobial effects of four silver-containing dressings on three organisms. *J Wound Care* 12: 101-107, 2003.
73. **Tobias PS and Ulevitch RJ.** Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiol* 187: 227-232, 1993.
74. **van Dijck P and van de Voorde H.** Factors affecting pyrogen testing in rabbits. *Dev Biol Stand* 34: 57-63, 1977.
75. **Voshege M and Wozniak G.** Was ist evidenzbasiert in der Behandlung chronischer Wunden? *Gefäßchir* 8: 269-276, 2003.
76. **White J.** Pfeilschwanzkrebs Oberseite. <http://www.scinexx.de/dossier-detail-202-207.html>.
77. **Williams C.** Actisorb Plus. *Br J Nurs* 3: 786-788, 1994.
78. **Winchurch RA, Thupari JN, and Munster AM.** Endotoxemia in burn patients: levels of circulating endotoxins are related to burn size. *Surg* 102: 808-812, 1987.
79. **Yin HQ, Langford R, and Burrell RE.** Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing. *J Burn Care Rehabil* 20: 195-200, 1999.
80. **Young NS, Levin J, and Prendergast RA.** An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J Clin Invest* 51: 1790-1797, 1972.

A Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Yvonne Winkler

Lebenslauf

Geboren:	15.09.1977 in Karlsruhe
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Eltern:	Erika Braun-Winkler, Georg Seitz
Seit 08/2004	Ärztin in der Klinik für Chirurgie, EMAU Greifswald
06/2004	3. Staatsexamen
03/2003	2. Staatsexamen
03/2001	1. Staatsexamen
03/2000	Ärztliche Vorprüfung
10/1997	Studienbeginn der Medizin an der EMAU-Greifswald
1988-1997	Thomas-Mann-Gymnasium Stutensee
1986-1988	Grundschule Büchig
1984-1986	Grundschule Karlsruhe

Publikationen

Müller G, Winkler Y, Kramer A

Antibacterial activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb[®] Silver 220

Journal of Hospital Infection (2003) 53: 211-214

Kramer A, Müller G, Winkler Y

Entfernung von Endotoxinen kann Wundheilung fördern – In vitro Untersuchung zu Actisorb[®] Silver 220

Pflegen Ambulant 6 (2003): 52-53

Winkler Y, Kramer A, Müller G

Mikrobiozide Wirksamkeit der Actisorb[®] Silver Wundauflage und Einfluss auf Endotoxine in vitro. ZfW (2002), 3:111

Kongressbeiträge

Kramer A, Müller G, Winkler Y (2003)

The bacterial endotoxin binding activity of a silver impregnated activated charcoal dressing.

13th Conference European Wound Management Association, Pisa, 22.-24.05.2003

Kramer A, Müller G, Winkler Y, Greenhalgh DJ (2003)

The bacterial endotoxin binding activity of a silver impregnated activated charcoal dressing.

The 16th Annual Symposium on Advanced Wound Care & Medical Research Forum on Wound Repair, Las Vegas, 28.04.-01.05.2003

Müller G, Winkler Y, Kramer A (2002)

Antibacterial activity and endotoxin binding capacity of Actisorb[®] Silver 220 (Poster).

10. Konferenz der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Öffentliche Gesundheit (GHU) gemeinsam mit der 6. Konferenz der International Society of Environmental Medicine (ISEM), Greifswald, 25.- 27.09.2002

Winkler Y, Kramer A, Müller G (2002)

Mikrobiozide Wirksamkeit der Actisorb[®] Silver Wundauflage und ihr Einfluss auf Endotoxine in vitro.

6. Kongress der DGfW, Hamburg, 13.-14.6.2002

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Kramer für das interessante Thema. Er hat durch seine engagierte Arbeit am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universität Greifswald überhaupt erst die Möglichkeiten für diese Arbeit geschaffen.

Dr. Gerald Müller möchte ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit sowie die Organisation der finanziellen Mittel danken.

Ebenso gilt mein Dank Frau Ivonne Harfenstein, Frau Katrin Böttcher, Frau Ulrike Weber und Frau Annette Giermann. Ihre sachkundige Unterstützung und Beratung bei der Ausführung der Versuche, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke Frau Susanne Dorn. Sie hat mich bei der Durchführung der Zytotoxizitätstests durch ihre Erfahrung maßgeblich unterstützt. Mein Dank geht auch an Frau Tina Kettner, die mir organisatorisch eine große Hilfe war.

Allen Freunden und Kollegen vielen Dank für die zahlreichen Schubse und Stupse in die richtige Richtung sowie die Freiräume und die Zeit, die sie mir geschaffen haben.

Frau Dr. Pia Körner danke ich für die Unterstützung im Bereich Statistik. Sie war mir eine große Hilfe. Ihr und Frau Dr. Alexandra Busemann sei auch für das Korrekturlesen der Arbeit gedankt.

Meinem Mann Andreas Winkler möchte ich für seine ruhige und besonnene Art danken, die mir im gesamten Verlauf der Arbeit häufig erst die Kraft gegeben hat, Schwierigkeiten neu und von verändertem Standpunkt anzugehen. Meist war er es, der mich über Fehlschläge und Misserfolge im Zusammenhang mit dieser Arbeit hinweg gebracht und mich tatkräftig unterstützt hat. Er hat mir gezeigt, dass man niemals aufgeben sollte.

Meinen Kinder Louisa Amélie und Jakob Aeneas danke ich für das Glück und die Lebensfreude, die sie mir vermitteln. Sie geben mir die Kraft, Herausforderungen täglich neu anzupacken.

Ich danke meiner Mutter Erika Braun-Winkler. Ohne ihre Unterstützung wäre vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Sie hat immer an mich geglaubt. Ihr möchte ich diese Arbeit widmen.