# Universität Ulm

Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie Ärztlicher Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Florian Gebhard

# Präklinische Untersuchungen zum Einfluss von Wundauflagen aus bakteriellem Alginat auf Entzündungsmediatoren und Keiminaktivierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

**Melissa Fischer** 

Marburg/ Lahn

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Gebhard
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius
- Tag der Promotion: 15.12.2017

Meinem Mann und meinen Söhnen

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsve	erzeichnis	IV
Abkürzu	ngsverzeichnis	VI
1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologie	1
1.2.	Überblick über den Wundheilungsprozess	2
1.2.1.	Ablauf einer regelrechten Wundheilung	2
1.2.2.	Pathomechanismus chronischer Wunden	
1.2.2.1.	Proinflammatorische Zytokine	4
1.2.2.2.	Wundinfektion	8
1.3.	Aktuelle Probleme der Wundversorgung	9
1.4.	Wundbehandlung mit kommerziellen Wundauflagen	9
1.4.1.	Trockene und feuchte Wundbehandlung	9
1.4.2.	Kommerzielle Wundauflagen	10
1.5.	Wundauflagen aus Alginat	12
1.5.1.	Kommerzielle Wundauflagen aus marinem Alginat	12
1.5.2.	Alginat aus Algen	13
1.5.2.1.	Struktur und Gewinnung	13
1.6.	Alginat aus Azotobacter vinelandii	15
1.7.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.2.	Kits	20
2.1.3.	Geräte und Materialien	20
2.1.4.	Zellkulturmedien, Puffer und Substanzen	21
2.1.5.	Wundauflagen	22
2.2.	Methoden	25
2.2.1.	Biotechnologische Herstellung von Alginatwundauflagen	25
2.2.1.1.	Kultivierung von Azotobacter vinelandii	26
2.2.1.2.	Bakterielle Alginatisolation	26
2.2.1.3.	Charakterisierung des bakteriellen Alginats	27
2.2.1.4.	Faserherstellung	28
2.2.1.5.	Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Alginatfasern	28
2.2.1.6.	Herstellung von Alginatvliesen	29
2.2.1.7.	Quellversuche mit Absorptionsvergleich	29

2.2.2. Entzünd	Untersuchungen des Einflusses bakterieller Alginatwundauflagen auf ungsmediatoren und Keiminaktivierung	30
2.2.2.1.	Zytokinbestimmung mittels Immunassay ELISA	. 31
2.2.2.2.	Wundauflagen-/ Zytokin-Inkubation und Elution der Stanzlinge	. 33
2.2.3.	Mikrobielle Untersuchungen	. 39
2.2.3.1.	Shake Flask Test	. 39
2.2.3.2.	Bindungsversuche mit mCherry-exprimierenden E.coli	42
2.2.3.3.	Statistik	. 43
3.	Ergebnisse	. 44
3.1.	Ergebnisse der biotechnologischen Herstellung von Alginatwundauflagen	44
3.1.1. Alginatis	Voruntersuchungen: Kultivierung von Azotobacter vinelandii und bakterielle solation	44
3.1.2.	Chemische Charakterisierung bakteriellen Alginats	44
3.1.3.	Faserherstellung	45
3.1.4.	Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Alginatfasern	46
3.1.5.	Herstellung von Alginatvliesen	48
3.1.6.	Quellversuche mit Absorptionsvergleich	49
3.2.	Untersuchungen zur Zytokinbindung von Alginatwundauflagen	52
3.2.1.	Bindung von TNF-α	. 52
3.2.2.	Bindung von MMP-2	. 53
3.2.3.	Bindung von Interleukin 8 / IL-8	. 55
3.2.4.	Bindung von PMN Elastase	. 56
3.3.	Untersuchungen zur Inhibition freier Radikale durch Wundauflagen	. 58
3.4.	Untersuchung der Keiminaktivierung mittels Shake Flask Test mit P.aeruginosa	. 59
3.5.	Untersuchung der Keiminaktivierung mittels Shake Flask Test mit MRSA	. 61
3.6.	Bindeversuche mit mCherry-exprimierenden E.coli	. 63
4.	Diskussion	. 65
4.1.	Quellversuche mit Absorptionsvergleich	. 65
4.2.	Bindungsfähigkeit von Zytokinen und freien Radikalen	. 68
4.3.	Keiminaktivierung	. 74
4.4.	Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick	. 75
5.	Zusammenfassung	. 78
6.	Literaturverzeichnis	. 80
7.	Danksagung	. 87
8.	Lebenslauf	. 88
9.	Publikationen	. 89

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
° C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
<sup>1</sup> H-NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASTM	American Society of Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated total reflection
Ba <sup>2+</sup>	Bariumion
BMBF	Bundesministerium für Bildung und
	Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Calziumion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CASO	Casein-Soja-Pepton
CaSO <sub>4</sub>	Calciumsulfat
Cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CMC	Carboxymethylcellulose
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
D <sub>2</sub> O	Deuteriertes Wasser
Da	Dalton
DCl	Deuterierte Salzsäure
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
	ļ

DANN	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
e.V.	Eingetragener Verein
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	et altri
FeSO <sub>4</sub>	Eisen(II)sulfat
G	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH u. co KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung &
	Compagnie Kommanditgesellschaft
GPC	Gelpermeationschromatographie
Н	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Streptavidin-Meerettich-Peroxidase
i.d.R.	In der Regel
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KBE	Kolonie bildende Einheit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
М	Meter
М	Mol
mA	Milliampere
mAb	Monoclonal antibody / Monoklonaler
	Antikörper
Mbar	Millibar
Mg	Milligramm

MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimol
Mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mrd.	Milliarden
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus
	aureus
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	Negativ
NF-ĸB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'
	of activated B-cells
Ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
no.	Nummer
o.g.	Oben genannt
O <sub>2</sub> -	Superoxid
OD	Optical density
OH-	Hydroxylradikal
OP	Operation
OSC.	Oszillation
P.aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCMV/IE	human cytomegalievirus immediate early
	promotor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PES	Polyester

Pg	Pikogramm
РНВ	Poly-β-Hydroxybutyrat
PMN	Polymorphnuclear
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revolutions per minute/ Umdrehungen pro
	Minute
sec	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TGF-β	Transforming Growth Factor $\beta$
T <sub>H</sub> -2 Zelle	T-Helferzelle vom Subtyp 2
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Nekrosefaktor alpha
TTHA	Triethylenetetramine-N,N,N',N",N"',N"'-
	hexaacetic Acid
u.U.	Unter Umständen
UV	Ultraviolett
VRE	Vancomycin resitente Enterokokken
w/v	Weight/volume
WHO	World Health Organization
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

# 1. Einleitung

# 1.1. Epidemiologie

Aktuell sind in Deutschland etwa 4 Millionen Patienten von schlecht heilenden oder chronischen Wunden betroffen. Schätzungen zufolge erfahren lediglich 800.000 dieser Patienten eine adäquate Wundtherapie [27]. Für die Betroffenen stellen chronische Wunden ein enormes soziales Problem dar: Sie leben aufgrund der reduzierten Lebensqualität, der eingeschränkten Mobilität und der Schmerzen häufig zurückgezogen. Auch für die Gesellschaft und das Gesundheitswesen sind chronische Wunden belastend. Allein venöse Abflussstauungen - eine mögliche Ursache chronischer Wunden - tragen beispielsweise in 1,2 % aller Fälle zu Arbeitsausfalltagen in Deutschland bei. Insgesamt ergibt sich nach statistischen Berechnungen durch die Behandlung von Patienten mit chronischen Wunden eine finanzielle Belastung der gesetzlichen Krankenkassen von 2 bis 2,5 Milliarden Euro; anderen Schätzungen zufolge liegt der Betrag teilweise sogar bei 4 bis 5 Milliarden Euro [20, 84]. Die Inzidenz chronischer Wunden liegt unter allen Patienten über 65 Jahren bei bis zu 3 %. Circa die Hälfte aller Ulcerawunden bleibt dabei über ein Jahr offen; 8 % verschließen sich gar erst nach 5 Jahren, wodurch weitere jährliche Kosten zur Wundversorgung anfallen [77]. Die Mehrzahl aller chronischen Wunden betrifft die unteren Extremitäten, die Inzidenz dort liegt bei etwa 0,78 %. Die Prävalenz steigt mit zunehmenden Alter, bei Patienten über 80 Jahren liegt sie bei 0,87 bis 3,38 %. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung in Deutschland gehen Experten davon aus, dass in den kommenden Jahren die Zahl an Patienten mit chronischen Wunden weiter steigen wird [20, 84].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der modernen Wundversorgung, insbesondere mit den zur Verfügung stehenden Alginatwundauflagen und deren Einfluss auf das Wundmilieu. Dieser Einfluss wird *in vitro* untersucht. Zunächst soll ein Überblick über die (unkompliziert ablaufende) primäre Wundheilung und den Pathomechanismus chronischer Wunden erfolgen. Anschließend werden Wundauflagen in Aufbau und Wirkweise näher beschrieben.

# 1.2. Überblick über den Wundheilungsprozess

# 1.2.1. Ablauf einer regelrechten Wundheilung

Bei der regelrechten Wundheilung liegen nicht infizierte, klare Wundverhältnisse vor, wie beispielsweise nach einem chirurgischen Schnitt. Hierbei laufen festgelegte Phasen ab, die teilweise zeitlich überlappen. Die regelrechte Wundheilung beginnt stets mit der inflammatorischen Phase. Nach einer kurzen initialen Wundkonstriktion kommt es zur Vasodilatation im Wundbereich infolge derer massenhaft Thrombozyten und Leukozyten in die Wunde übertreten. Die Thrombozyten führen zu einer Blutstillung und geben dabei Wundmediatoren / Zytokine und Wachstumsfaktoren ab, wie z.B. Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin-like Growth Faktor-1 (IGF-1), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Die genannten Wachstumsfaktoren wirken wiederum chemotaktisch, um weitere Zellen der Wundheilung anzulocken, beispielsweise Lymphozyten, Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen [59, 68]. Innerhalb von 24 Stunden bildet sich an den Wundrändern ein Fibrinpfropf, welcher die Wunde verschließt. Neutrophile Granulozyten wandern in das Wundgebiet und den Fibrinpfropf ein, um eingedrungene Mikroben zu bekämpfen.

Damit beginnt die resorptive Phase. In dieser differenzieren sich vorwiegend Makrophagen aus Monozyten heraus, welche über Phagozytose Zelltrümmer / Detritus abbauen und sich zugleich an der Infektabwehr beteiligen. Zusätzlich werden eine Reihe von Proteasen und Hydrolasen freigesetzt, die bereits abgestorbenes Gewebe enzymatisch auflösen. Die genannten Mechanismen tragen dazu bei, dass eine erste Wundreinigung und Infektabwehr stattfindet [59].

Die proliferative Phase beginnt einen Tag nach dem Wundereignis; sie kann bis zu 2 Wochen anhalten. Bis zum dritten Tag nach der Läsion werden die bereits eingewanderten neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen und Mastzellen ersetzt und erstes Granulationsgewebe wird im Wundspalt abgelagert. Auch die Makrophagen sezernieren zahlreiche Zytokine, Wachstums- und Angiogenesefaktoren, welche gemeinsam eine wichtige Rolle bei der Bildung von Granulationsgewebe, der Proliferation von Keratinozyten und der Angiogenese spielen [65]. Im Bereich des Hautdefekts bilden sich Kapillaren, die das neue Granulationsgewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Innerhalb von zwei weiteren Tagen erreicht diese Neovaskularisierung ihren Höhepunkt. Kollagenfasern überspannen nun den Wundspalt. Gegen Ende der proliferativen Phase proliferieren von den Wundrändern aus Keratinozyten. Sie geben dabei Basalmembrankomponenten frei, migrieren zur Wundmitte hin auf einander zu und bedecken so die Läsion mit einer ersten zarten Hautschicht.

Zuletzt beginnt die reparative Phase, in welcher die Ansammlung von Kollagen und die Proliferation von Fibroblasten dominieren. Die im Rahmen der Neovaskularisierung entstandenen Kapillaren bilden sich nun größtenteils wieder zurück, sodass nach etwa einem Monat eine bindegewebige Narbe entstanden ist, welche von normaler Epidermis bedeckt wird [48].

# 1.2.2. Pathomechanismus chronischer Wunden

Dauert die Wundheilung länger als 6 Wochen spricht man definitionsgemäß von einer chronischen Wunde. Typische klinische Beispiele chronischer Wunden sind Dekubiti, Wunden im Rahmen des diabetischen Fußsyndroms oder Ulcera crurum. Eine gängige Theorie zur Entstehung chronischer Wunden begründet sich auf einer noch ungeklärten Dominanz neutrophiler Granulozyten, welche im Rahmen der Infektabwehr nicht nur in die Wunde eingedrungene infektiöse Zellen mittels freier Radikale angreifen, sondern zugleich auch gesunde körpereigene Zellen vernichten [65]. Ein wichtiges Kennzeichen bei der die Aufrechterhaltung chronischer Wunden Entstehung und ist verlängerte Entzündungsreaktion, an welcher Entzündungsmediatoren wie Tumor Nekrosefaktor-a (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$ , Interleukin (IL)-6, IL-10, Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (TGF-β1) und Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt sind [118]. Hauptrisikofaktor für die Aufrechterhaltung chronischer Wunden ist Entstehung und eine veränderte Mikrozirkulation, welche durch Stase dazu beträgt, Epithelschäden der Wunde aufrecht zu erhalten [77]. Ebenfalls häufig am Pathomechanismus chronischer Wunden beteiligt ist eine zu starke Wundexsudation, bedingt durch ein Wundödem oder bakterielle Infektion der Wunde, was die Wundheilung zusätzlich verzögert [31]. Zudem bilden chronische Wunden durch nekrotisches Gewebe und Zelltrümmer den idealen Nährboden für einige Bakterien, welche die Wundoberfläche mit einem Biofilm überziehen können. 60 Prozent aller chronischen Wunden sind mit einem solchen Biofilm überzogen. Im Vergleich dazu sind bei akuten Wunden lediglich 6 % betroffen. Solche Biofilme können die Funktion von Leukozyten, Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten massiv beeinträchtigen und die Immunantwort auf die entstandene Wunde beeinflussen. Dies ist mit ein Grund für die verlängerte Entzündungsreaktion chronischer Wunden. Durch die in der Wunde lokal abgeschwächte Immunabwehr ist eine Infektion derselben leicht möglich [112]. Die im Biofilm eingeschlossenen Bakterien sind durch die Dicke des Biofilms, welche eine Medikamentendiffusion verhindert, deutlich resistenter gegenüber Antibiotika als andere Bakterien [69]. Hinzu kommt, dass die Biofilme häufig in Kompartimente unterschiedlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften unterteilt sind, sodass beispielsweise innerhalb eines Biofilms unterschiedliche pH-Werte auftreten, was die Wirkung eines Antibiotikums erschwert [5, 114]. Zuletzt liegen die Bakterien in Biofilmen häufig als Sporen vor, welche besonders resistent gegenüber harschen Umweltbedingungen und Angriffen durch Antibiotika sind. Daher sind alternative Versuchsansätze, chronische Wunden zu therapieren, Ziel der aktuellen Forschung [117].

# 1.2.2.1. Proinflammatorische Zytokine

Behm et al. wiesen im Wundexsudat chronischer Wunden erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine nach, welche die Wundheilung behindern. Zahlreiche wundtherapeutische Ansätze verfolgen daher die Modulation von Zytokinen [6]. Bei Zytokinen handelt es sich um Zellwachstum und -differenzierung regulierende, niedermolekulare Proteine, die trotz ihrer variierenden strukturellen Unterschiede zu einer Gruppe zusammen gefasst werden können, da sie sich in ihren physiologischen Wirkungen ähneln. Zytokine steuern zudem die Immunantwort des Körpers, indem sie Gene zur DNA-Synthese, Zellteilung oder anderer Proteinexpression aktivieren. Sie werden von Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK) sowie Fibroblasten gebildet. Typische Zytokinvertreter sind Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine, Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und transformierende Wachstumsfaktoren (TGF). Da sich die vorliegende Arbeit mit Alginatwundauflagen und ihrem Einfluss auf das Wundmilieu beschäftigt, werden die wichtigsten Zytokine, welche zur Entwicklung und Aufrechterhaltung chronischer Wunden beitragen, im Folgenden eingehender beschrieben.

# Tumor-Nekrosefaktor-α (TNF-α)

Das proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wurde im Jahr 1984 zum ersten Mal isoliert [1]. Es moduliert sowohl die frühe als auch die späte Immunantwort des Wirts. In der Literatur wird TNF-α gerne als "zweischneidiges Schwert" bezeichnet, da er - je nach zellulärem Kontext - entweder über NF-kB einen proinflammatorischen Signalweg auslöst, oder aber die Zelle in die Apoptose treibt [1, 81]. Über diese Wege fördert TNF- $\alpha$  zum einen die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Zelldifferenzierung; auf der anderen Seite jedoch auch den programmierten Zelltod [60]. Daher moduliert TNF- $\alpha$ einerseits reguläre Abläufe des Körpers wie Immunantworten, Hämatopoese und Morphogenese. And erse its ist TNF- $\alpha$  aber auch an pathologischen Vorgängen beteiligt, wie z.B. Tumorgenese, Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate, septischen Schock, viraler Replikation, Knochenresorption bis hin zur Rheumatischen Arthritis [1]. Nahezu alle Liganden der TNF-a-Rezeptoren werden durch Zellen des Immunsystems wie B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten oder Dendritischen Zellen exprimiert [39]. TNF-α liegt dann entweder membrangebunden vor oder er wird als Ligand sezerniert [81]. Bei der Wundheilung stimuliert TNF-a die Proliferation von Fibroblasten, induziert die Produktion von Prostaglandinen und die Genexpression von Kollagenasen. Zudem induziert TNF- $\alpha$  die Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren [16, 63, 66, 86, 101]. Während der Wundheilung treten bei komplikationslos abheilenden Wunden lediglich zu Beginn der Abheilung erhöhte TNF-α Spiegel auf, die dann am dritten Tag nach dem Wundereignis wieder absinken. Im Wundexsudat chronischer Wunden sowie in nicht ausreichend hydrierten Wunden finden sich jedoch längerfristig erhöhte TNF-α Konzentrationen [24, 92, 115].

# Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2)

Matrix-Metalloproteinasen sind eine Gruppe Zink-abhängiger Endopeptidasen, welche vorrangig den Abbau von Extrazellularmatrixkomponenten beeinflussen. Des Weiteren sind Matrix-Metalloproteinasen am Abbau von Oberflächenproteinen, der Modulation der Zellproliferation, Zellmigration und der Angiogenese beteiligt. Die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) wird als inaktive Vorstufe sezerniert und durch proteolytische Degradation aktiviert [7]. In der Wundheilung ist MMP-2 am Remodeling und der

Resolution des Wundgewebes beteiligt (weiterhin an physiologischen Vorgängen wie der Entwicklung und Morphogenese, Tumorigenese embryonalen der und der Infektionsabwehr). Zudem moduliert MMP-2 die angeborene Immunfunktion, indem das Enzym die IL-12 Funktionen hemmt und die Expression des OX40L Rezeptors auf dendritischen Zellen steigert. Dies führt zu einer Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Lymphozyten [28]. Des Weiteren findet man eine MMP-2 Überexpression bei speziellen Infektionen, in denen eine effektive T<sub>H</sub>2-Antwort essentiell zur Erregerabwehr ist [72, 87]. So können beispielsweise Toxoplasmen und Plasmodien zu erhöhten MMP-2 Konzentrationen führen [56, 62]. MMP-2 ist stets ein wichtiger Bestandteil der Wundheilung [7, 9]: MMP-2 wird von ortsständigen Fibroblasten und eingewanderten Makrophagen sezerniert und beteiligt sich bei normalen Wundverhältnissen beim Abbau von Detritus, sodass sich neues Granulationsgewebe ausbilden kann. Zudem beeinflusst MMP-2 direkt die Angiogenese [42]. Bei chronischen, entzündeten Wunden ist die Aktivität von MMP-2 gesteigert, sodass neu gebildetes Gewebe frühzeitig degradiert wird, was die Wundheilung verzögert.

# Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin- 8 (IL-8) ist ein Zytokin, welches direkt nach dem Wundereignis aus intrazellulären Speichern umliegender Keratinozyten freigesetzt wird. IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile und basophile Granulozyten sowie T-Lymphozyten. Die daraufhin in das Wundgebiet einwandernden polymorphkernigen PMN Granulozyten produzieren ihrerseits IL-8, sodass die Konzentration an IL-8 in der Wunde weiter ansteigt [82]. Über den CXCR1/2 Rezeptor nimmt IL-8 seinerseits nun Einfluss auf phagozytierende Zellen. So führt die IL-8 Ausschüttung zu einer verstärkten Migration von neutrophilen Granulozyten in das Wundgebiet, welche einerseits diverse Pathogene eliminieren, zum anderen jedoch zur Gewebszerstörung und zum Erhalt der Wunde beitragen [41, 89]. Dadurch fördert IL-8 mitunter die Entzündung der Wunde, was einer Janusfunktion entspricht. Zudem sind erhöhte IL-8 Konzentrationen mit einer hypertrophen Narbenbildung assoziiert [83]. Interessanterweise finden sich besonders hohe Konzentrationen an IL-8 im Wundexsudat von Verbrennungswunden [55].

# PMN Elastase

Unter PMN Elastase versteht man das Enzym Elastase, welches von polymorphkernigen Granulozyten (polymorphonuclear - PMN) produziert wird. Die PMN Elastase - eine Serinprotease - baut im normalen Wundheilungsgeschehen Detritus ab und unterstützt so den Aufbau neuen Gewebes. Im Wundexsudat nicht heilender Wunden wurden erhöhte Konzentrationen an PMN Elastase nachgewiesen. Durch die vermehrte proteolytisch wirksame Elastase wird zum einen neu gebildetes Gewebe zerstört, zum anderen werden die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und Proteinase-Inhibitoren, wie MMP-Inhibitoren (TIMPs, Tissue inhibitors of metalloproteinases) reduziert. Dadurch werden die Matrix-Metalloproteinasen, insbesondere MMP-2, weniger gehemmt und sie bauen in erhöhtem Ausmaß Kollagene, Elastin und Fibronektin ab, wodurch die Extrazellularmatrix abnimmt [107]. Hieraus resultiert ein Ungleichgewicht zwischen Abbau und Umbau/Remodeling der Wunde [12, 12, 36, 88]. Chronische Wunden werden konstant durch PMN Granulozyten infiltriert, welche ihrerseits weitere PMN Elastase produzieren [19][12]. In chronischen Wunden ist PMN Elastase eines der Hauptenzyme, welches wichtige Wachstumsfaktoren degradiert. Hierdurch persistiert die Wunde in der inflammatorischen Phase der Wundheilung, was die Entstehung chronischer Wunde begünstigt [88].

# Freie Radikale (reactive oxygen species-ROS)

Während der inflammatorischen Phase der Wundheilung werden im Rahmen eines Wundereignis neben Zytokinen auch so genannte freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) freigesetzt [6]. Auslöser zur Ausschüttung freier Radikale sind verletzte Gefäße und Wundkonstriktion sowie Wundinfektionen, Erkrankungen und das Einbringen fremder Materialien in den Körper im Rahmen einer Operation. Zu freien Radikalen zählen z.B. Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxylradikal (OH<sup>-</sup>) oder auch Hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Das intrazelluläre Enzym NADH-Oxidase katalysiert beispielsweise die Bildung freier Radikale auf folgende Weise:

 $NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + 2 O_2^- + 2 H^+$ 

asma und

8

Anschließend an diese Reaktion werden weitere ROS im Zytoplasma und im Extrazellularraum gebildet. So entsteht beispielsweise Hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durch den spontanen Zerfall von Superoxid (O2<sup>-</sup>) und Konversion durch die Superoxiddismutase (SOD) [10]. Während der Wundheilung liefern vor allem die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen den größten Anteil an freien Radikalen [45]. Sind Makrophagen zudem proinflammatorischen Stimuli ausgesetzt, wie proinflammtorischen Zytokinen, Interferonen, Lipopolysacchariden oder Hitzeschockproteinen, so wirken sie ebenfalls proinflammatorisch und sezernieren nun ihrerseits Mediatoren und Zytokine wie NO, IL-1/6/12, TNF- $\alpha$  sowie Chemokine, mit dem Ziel, weitere Leukozyten anzulocken [47]. Bei einer unkomplizierten Wunde dienen freie Radikale der Infektionsabwehr gegenüber Bakterien und Pilzen [45]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine niedrige Konzentration an Hydrogenperoxid (H2O2) chemotaktisch auf Keratinozyten und neutrophile Granulozyten wirkt. Im Normalfall liegt daher ein Gleichgewicht zwischen freien Radikalen (ROS) und deren Gegenspielern vor - den ROS-neutralisierenden Stoffen zu denen Vitamin C, Vitamin E oder auch Glutathion zählen. In chronischen Wunden jedoch besteht darin ein Ungleichgewicht: Es werden massenhaft freie Radikale und nur wenige Gegenspieler produziert. Dadurch wird die inflammatorische Phase der Wundheilung aufrechterhalten und ein Abheilen der Wunde verzögert [6, 90]. Auch beim Wundschluss schaden freie Radikale durch oxidativen Stress der Proliferation von Keratinozyten, welche die Wunde infolge dessen nicht mit neuem Epithel bedecken können [6, 10].

# 1.2.2.2. Wundinfektion

Zu einem verzögerten Abheilen oder gar der Chronifizierung von Wunden tragen - neben den erhöhten Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen im Wundexsudat - auch Wundinfektionen bei [103]. Werden diese Infektionen im klinischen Setting erworben, zählen zu den Erregern häufig nosokomiale Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)*. Dissemond et al. konnten zeigen, dass 10-40 % der Gesamtpopulation mit *Staphylococcus aureus* kolonisiert sind. Bei Patienten mit chronischen Wunden sind sogar 71 % mit *Staphylococcus aureus* besiedelt sowie 30 % der Wundpatienten mit *MRSA* [21]. Bei ausgeprägter bakterieller Kolonisation der Wunde kommt es zur Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus der Wunde; die Wundheilung wird verzögert [79].

## 1.3. Aktuelle Probleme der Wundversorgung

Aufgrund der breiten Spektren an Wunden - von exsudativen Verbrennungswunden bis hin zu fibrinbelegten Ulcera - kann es für viele Ärzte im Alltag mitunter schwierig werden, die für den Patienten ideale Wundauflage auszuwählen. Hinzu kommt eine Vielzahl unterschiedlichster Materialarten, was zu einem Massenangebot an diversen Wundauflagen, -schäumen und -tamponaden führt. Selbst die Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. erhebt in ihrer aktuellen Versorgungsleitlinie zur Lokaltherapie chronischer Wunden aufgrund der Vielzahl an lokaltherapeutischen Optionen und Wundauflagen keinen Anspruch auf Vollständigkeit [17]. Zusätzlich besteht noch der Druck des Gesundheitswesens, Wunden möglichst kostenminimal zu versorgen [43].

Je nach Beschaffenheit der Wunde kommt zudem ein anderes Therapiekonzept zum Einsatz. Eine stark exsudierende Wunde bedarf beispielsweise einer Wundauflage mit hohem Absorptionsvermögen. Wird eine stark absorbierende Wundauflage jedoch auf einer vorwiegend trockenen Wunde appliziert, führt dies i.d.R. zu schmerzhaften Verklebungen der Wundauflage mit der Wundfläche und zum Verbleib von Fasern der Wundauflage nach dem Verbandswechsel. Es ist daher ratsam, individuell für die jeweilige Wunde die passende Wundauflage auszuwählen. Im Folgenden werden deshalb die gängigsten Wundversorgungsarten und Wundauflagen im Überblick dargestellt.

## 1.4. Wundbehandlung mit kommerziellen Wundauflagen

## 1.4.1. Trockene und feuchte Wundbehandlung

# Trockene Wundbehandlung

Eine Wunde sollte möglichst dann trocken versorgt werden, wenn sie mit trockenen Nekrosen bedeckt ist, wie beispielsweise bei Wunden aufgrund arterieller Minderperfusion. Ebenfalls trocken behandelt werden Wunden nach Bagatelltraumen, chirurgische Nähte ohne Komplikationen sowie Wunden im abschließenden Epithelialisierungsprozess. Hier kommen trockene Mullbinden oder Gazen zum Einsatz.

# Feuchte Wundbehandlung

Schon vor Jahrtausenden nutze man mit Umschlägen mit Wein oder Honig die Vorteile einer feuchten Wundbehandlung. Bahnbrechend waren die Arbeiten von Winter [111], der als Begründer der modernen, feuchten Wundbehandlung gilt. Er zeigte 1962, dass eine wasserdichte Abdeckung der Wunde mit einer Polyurethanfolie die darunter liegende Wundheilung beschleunigte. Zudem wurde klar, dass die feuchte Wundbehandlung kein erhöhtes Risiko birgt, dass sich die Wunde infiziert. Indikationen zur feuchten Wundtherapie sind sekundär heilende und chronische Wunden, mit Fibrin oder nekrotischem Material bedeckte Wunden sowie großflächig exponiertes Granulationsgewebe.

Wundauflagen zur feuchten Wundtherapie müssen einige Eigenschaften erfüllen. So sollten sie ein feuchtes Wundmilieu aufrechterhalten, Wundexsudat entfernen und nekrotische Anteile der Wunde hydratisieren, den Wundrand vor Mazeration schützen, eine thermische und mechanische Barriere gegenüber Temperatur, Keimen und Schmutz bieten, zugleich den Gasaustausch ermöglichen, sich atraumatisch von der Wundfläche lösen lassen, um so das darunter liegende frische Gewebe zu schonen sowie einfach zu wechseln und kostengünstig sein. Dies sind die klassischen Definitionen eines idealen Wundverbands nach Turner [99].

## 1.4.2. Kommerzielle Wundauflagen

Es gibt eine Vielzahl aktuell auf dem Markt erhältlicher Wundauflagen, die jeweils unterschiedliche Eigenschaften mit sich bringen. Grundsätzlich werden inaktive, aktive und interaktive Wundauflagen unterschieden.

<u>Inaktive Wundauflagen</u> nehmen in begrenztem Umfang Wundexsudat aus der Wunde auf, ohne ein feuchtes Wundmilieu zu schaffen. Zu den inaktiven Wundauflagen zählen Gazen, Mullkompressen und Vliesstoffauflagen. Diese Art der Wundauflagen finden sich klassischerweise in Erste-Hilfe Kästen zur Erstversorgung von Wunden. Zudem kommen sie bei der trockenen Wundtherapie zum Einsatz [38].

Interaktive Wundauflagen hingegen sind zur feuchten Wundversorgung geeignet, da sie das Wundmilieu oder Mikroklima der Wunde verändern und dadurch die Wundheilung beschleunigen. Anhand ihrer spezifischen Eigenschaften lassen sich interaktive

Wundauflagen weiter klassifizieren. Wundauflagen aus Hydrokolloiden sind beispielsweise bei mäßig exsudierenden Wunden und kleineren OP-Nähten indiziert. Ihre innere Schicht nimmt Wundexsudat auf und geliert dabei. Allerdings riecht dieses Gel schnell unangenehm, was häufigere Wundverbandswechsel erfordert. Weitere interaktive Wundauflagen sind Hydropolymere, welche in ihre Schaumstoffstruktur ebenfalls Wundexsudat aufnehmen können. Sie sind in diversen Formen und Ausführungen auf dem Markt erhältlich. Hydropolymere sind bei mäßig bis stark exsudierenden Wunden indiziert. Interaktive Wundauflagen aus Alginat sind für stark exsudierende Wunden geeignet, da sie bei Kontakt mit Flüssigkeit gelieren können. Sie werden im Verlauf der Arbeit noch genauer aufgeführt. Hydrofasern sind ebenfalls zur Versorgung stark exsudierender Wunden geeignet, da sie ähnlich wie die Alginate, ausgeprägte Gelierungseigenschaften aufweisen. Des Weiteren sind Wundauflagen aus Hydrogelen auf dem Markt erhältlich, welche sowohl Wundexsudat binden, als auch die Wunde hydrieren können. Hydrogele sind daher vor allem bei austrocknungsgefährdeten Wunden indiziert. Wundauflagen mit Zusätzen wie Aktivkohle wiederum können unangenehme Gerüche binden. Zuletzt wird eine Vielzahl an Aseptikahaltigen Wundauflagen angeboten, welche über Silber oder PVP-Jod lokal antiseptisch wirken [27, 38].

Eine Sonderstellung nehmen sogenannte aktive Wundauflagen ein. Sie greifen - wie der Name vermuten lässt - aktiv in den Wundheilungsprozess oder den Pathomechanismus ein, indem sie beispielsweise gezielt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) inhibieren oder Wachstumsfaktoren aktiv in die Wunde abgeben. Die MMP-Inhibitoren hemmen die Neubildung oder die Konzentration von Matrix-Metalloproteinasen, welche in der Wunde Gewebe abbauen. Sie sind eine Wundauflage zweiter Wahl, wenn vorausgegangene Wundversorgungen nicht zum Erfolg führten. Wundauflagen mit Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGF) sollen durch Chemotaxis von Makrophagen und Fibroblasten die Wundheilung fördern. Durch ihren hohen Preis haben sich diese Wundauflagen am Markt nicht durchgesetzt [38].

Da sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss von Wundauflagen aus Alginat auf Zytokine und Keime der Wundfläche beschäftigt, werden diese Wundauflagen im Folgenden ausführlicher dargestellt.

## 1.5. Wundauflagen aus Alginat

# 1.5.1. Kommerzielle Wundauflagen aus marinem Alginat

Kommerzielle Alginatwundauflagen bestehen vorwiegend aus Calcium-Alginat, welches aus marinen Rot- oder Braunalgen gewonnen und aufgereinigt wurde. Die Alginat-Tamponaden oder Kompressen können unterschiedlich fest, schneid- und reißbar sein. Meist werden sie locker in die Wunde eingebracht und mit einem Sekundärverband abgedeckt. Durch Abgabe von Calcium-Ionen in die Wunde und Aufnahme von Natrium-Ionen aus dem Wundsekret entsteht in situ ein Gel, das vorteilhaft nicht mit der Wundoberfläche verklebt (siehe Abbildung 1) [38].



Abb. 1: Schematische Darstellung des Ionenaustausches zwischen einer Alginatwundauflage und einer Wundfläche. Dabei kommt es zu einem Austausch der Calcium-Ionen des Alginats gegen Natrium-Ionen des Wundexsudats was zur Gelierung führt.

Die vom Alginat ins Wundmilieu abgegebenen Calcium-Ionen führen darüber hinaus zu einem hämostyptischen Effekt, da sie die Aktivierung sowohl von Thrombozyten, als auch der gesamten Blutgerinnungskaskade stimulieren [78]. Das Alginatgel besitzt eine ausgesprochene Hydrophilie. Es ist daher in der Lage, das bis zu 20-fache seines Eigengewichts an Wundsekret aufzunehmen. Dabei passt es sich den Wundverhältnissen exakt an und ist somit auch für tiefe Wunden geeignet [57]. Ebenso wird durch diesen Verschluss das Wundmilieu feucht gehalten, was zu einer verbesserten Wundheilung führt. Wundauflagen aus Alginat sind in der Lage, Keime aus der Wunde aufzunehmen und zwischen den Fasern einzuschließen, sodass diese beim Verbandswechsel mit entfernt werden [78]. Zum Wechseln der Wundauflage kann diese mit etwas Kochsalzlösung angespült und atraumatisch von der Wunde abgenommen werden, wodurch dem bisher gebildeten Granulationsgewebe keine neuen Läsionen zugefügt werden [54]. Indikation für Wundauflagen aus Alginat sind sezernierende, zerklüftete oder unterminierte Wunden [38]. Aktuelle, auf dem Markt befindliche Wundauflagen aus Alginat, sind beispielsweise Nobaalgin (Noba Verbandmittel Danz GmbH u. co KG) oder Sorbalgon (Paul Hartmann AG) [102].

Des Weiteren werden auch antibakterielle Wundauflagen aus Alginat angeboten, z.B. mit Zusatz von Silber. Hierdurch erweitert sich der Wirkungsbereich der Alginatwundauflagen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) führt Silber offiziell als Antiinfektivum auf [50]. Die desinfizierende Wirkung des Silbers basiert auf der Abgabe von Silber-Ionen. Diese binden an Oberflächenproteine von Zellen, was zu einer Umstrukturierung der Zellmembran und letzten Endes zum Funktionsverlust der Zellen führt. Daneben werden Strukturproteine und Enzyme zerstört, wodurch auch deren katalysierte Zellabläufe, wie beispielsweise die Replikation der DNA, gestört werden [49]. Das Wirkspektrum von Silber umfasst Bakterien (Aerobier und Anaerobier sowie grampositive und gramnegative Erreger), Pilze und Hefen und z.T. auch Viren [11]. Im Gegensatz zu den meisten Antibiotika wirkt Silber auch gegen multiresistente Keime wie den Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA) oder den Erythromycin-resistenten Staphylococcus pyogenes [50]. Eine aktuell erhältliche Alginatwundauflage mit Silberzusatz ist beispielsweise Silvercel® (Systagenix), welche mit silberbeschichteten Nylonfasern verstärkt ist. Alternativ gibt es auch kommerzielle Alginatwundauflagen, welche mit einem ionischen Silberkomplex aus Silber-Natriumhydrogen-Zirkoniumphosphat, wie es z.B. bei Tegaderm<sup>™</sup> Alginat Ag der Firma 3M der Fall ist.

## 1.5.2. Alginat aus Algen

# 1.5.2.1. Struktur und Gewinnung

Alginate sind Salze der Alginsäure, welche aus linearen, unverzweigten Ketten aus  $\beta$ -D-Mannuronsäure und deren Epimer, der  $\alpha$ -L-Guluronsäure, bestehen. Diese beiden Komponenten sind 1,4-glykosidisch miteinander verknüpft [22]. Alginate sind damit Polyuronide. Durch partiellen Säureaufschluss finden sich innerhalb des Alginats ganze Abschnitte aus reiner  $\beta$ -D-Mannuronsäure (MMMMM) oder  $\alpha$ -L-Guluronsäure (GGGGG),

den sogenannten M- bzw. G-Blöcken. An anderen Stellen liegen die beiden Monomere alternierend vor (MGMGM) [94]. Der Strukturaufbau wird in Abbildung 2 deutlich.



Abb. 2: Strukturformeln von Mannuronsäure- und Guluronsäure-Bausteinen in Alginaten sowie deren Verknüpfung; Draget, K. I., Smidsrød, O. & Skjåk-Bræk, G. Steinbüchel, Alexander / Rhee, Sang Ki (Herausgeber), Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, 4, in *Biopolym. Online*, Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, mit freundlicher Genehmigung [22].

Die Verknüpfung der Blöcke trägt entscheidend zu den physikochemischen Eigenschaften des gesamten Alginats bei. Beispielsweise sind reine G-Blöcke steifer und weniger löslich bei niedrigem pH-Wert als die alternierenden Abschnitte. Die Steifigkeit steigt mit der Anzahl der reinen G-Blöcke und lässt sich wie folgt abstufen: MG < MM < GG.

Technisch betrachtet wird Alginat konventionell hauptsächlich aus Braunalgen gewonnen. Es verleiht den Pflanzen Struktur und sorgt für mechanische Kraft und Flexibilität. Je nach geografischem Ursprung der Algen variiert die Zusammensetzung der Mannuronsäure- und Guluronsäure-Abschnitte des Alginats. So weisen küstennahe Braunalgenpflanzen einen hohen Anteil an Alginat aus G-Blöcken auf und sind damit steifer und widerstandsfähig gegenüber mechanischer Beanspruchung der Brandung. Braunalgen, die in fließendem Wasser wachsen, haben dagegen deutlich weniger G-Blöcke, sind damit flexibler und können im fließenden Wasser treiben. Werden zwei G-Blöcke benachbarter Ketten mit multivalenten Kationen wie  $Ca^{2+}$  oder  $Ba^{2+}$  über Wechselwirkungen zwischen ihren Carboxylgruppen verknüpft, bildet sich ein Gel aus [3]. Diese Gelierung ist temperaturabhängig und entscheidend für die Vorteile, welche Wundauflagen aus marinem Alginat mit sich bringen.

Unter den ca. 2.000 verschiedenen Arten der Braunalgen wird vor allem *Macrocystis pyrifera* zur Alginatextraktion verwendet, welche an den Küsten Nord- und Südamerikas, Neuseelands, Australiens und Afrikas natürlich vorkommt. Weitere häufig verwendete Braunalgenarten sind *Laminaria*, *Ecklonia* und *Aschophyllum nodosum* [26]. Charakteristisch für die Braunalgen ist ein rapides Wachstum, sodass diese bis zu viermal jährlich geerntet werden können. Dadurch ist jedes Jahr eine Alginatausschöpfung von etwa 40.000 Tonnen möglich. Die Algen werden vor der Weiterverarbeitung gereinigt; danach wird das Alginat extrahiert, geklärt und ausgefällt und über weitere Schritte zu einem Pulver verarbeitet. Die gängigen Methoden der Alginatgewinnung orientieren sich am sogenannten "Stanford"-Prozess des Briten E.C.C. Stanford, der sich diese Methode der Alginatextraktion 1881 patentieren ließ [22];[32].

# 1.6. Alginat aus Azotobacter vinelandii

Gegenüber der herkömmlichen Extraktion aus marinen Algen kann Alginat auch biotechnologisch mittels Bakterien gewonnen werden. Linker und Jones gelang 1964 erstmals die mikrobiologische Extraktion von Alginat aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, einem typischen nosokomialen Keim, welchen sie aus dem Speichel von Patienten mit zystischer Fibrose gewannen [58]. Zwei Jahre später, im Jahre 1966, isolierten Gorin und Spencer Alginat erfolgreich aus dem Bakterium *Azotobacter vinelandii* [30]. *Azotobacter vinelandii* und *Pseudomonas aeruginosa* sind gramnegative Bakterien, welche Alginat auf molekular ähnliche Weise produzieren. Die Gene zur Alginatproduktion sind annähernd identisch bei beiden Bakterienstämmen, der Zweck und die physikochemischen Eigenschaften des Endproduktes unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. So produziert *Pseudomonas aeruginosa* Alginat, um einen dicken extrazellulären Biofilm zu bilden, während *Azotobacter vinelandii* ein im Vergleich steiferes Alginat produziert, welches eng an die Zelle bindet, um austrocknungsresistente Zysten zu bilden. [35].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Alginat aus *Azotobacter vinelandii* gearbeitet. *Azotobacter vinelandii* ist ein aerobes, diazotrophes Bakterium, welches in Erdböden, Gewässern und gelegentlich auf Pflanzen vorkommt. Es handelt sich hierbei um ein Stäbchenbakterium, das sowohl einzeln, als auch in Ketten und in Haufen angeordnet auftritt. Das Bakterium ist in der Lage, unter extremen Bedingungen resistente Zysten zu bilden und kann so auch extremen Klimabedingungen trotzen. Daher findet man das Bakterium weltweit, von Sibirien bis Indien.

Bemerkenswert ist, dass das Genom von *Azotobacter vinelandii* deutlich mehr DNA enthält als andere Bakterien. So weist *Azotobacter vinelandii* beispielsweise den 40-fachen DNA Gehalt eines *E.coli* Bakteriums auf. Eine weitere Besonderheit des Bakteriums ist die Eigenschaft, Stickstoff aus der Atmosphäre zu fixieren. Dank dreier verschiedener Nitrogenasen wird der Stickstoff in Ammoniak umgewandelt, welcher dann zur Proteinbildung zur Verfügung steht. Bedeutsam ist auch die Tatsache, dass *Azotobacter vinelandii* mit einigen Schutzmechanismen für die eigentlich stark sauerstoffsensible Nitrogenase eine relative Toleranz gegenüber Sauerstoff entwickelt. Zudem ist *Azotobacter vinelandii* in der Lage, Poly-β-Hydroxybutyrat (PHB) und Alginat zu synthetisieren, die dem Bakterium primär als Virulenzfaktoren dienen [14, 18].

Azotobacter kann Alginat sowohl im Zustand einer aktiven Zelle, als auch als Zyste synthetisieren. Zunächst wird über viele Zwischenschritte aus Glucose letztendlich Polymannuronsäure produziert (siehe Abbildung 3), welche im Verlauf zu Guluronsäure epimerisiert wird.

Die einzigartigen Stoffwechselwege von *Azotobacter vinelandii* in der Alginatproduktion verleihen diesem bakteriellen Alginat interessante Eigenschaften, was es zu einem spannenden Material für die moderne Wundbehandlung macht.



Abb. 3: Übersicht über die einzelnen Schritte der bakteriellen Alginatsynthese aus Glucose nach Sharma, J. [91].

# 1.7. Fragestellung

Chronische Wunden, die im Rahmen eines diabetischen Fußsyndroms, Ulcus cruris oder Decubitus entstehen, stellen nach wie vor eine soziale Belastung für die Betroffenen und eine finanzielle Belastung für das Gesundheitswesen dar. Die Belastungen werden aufgrund des demografischen Wandels in den kommenden Jahren weiter zunehmen, analog zur Prävalenz chronischer Wundpatienten. Aus diesem Grunde ist neben der stratifizierten Therapie der zugrunde liegenden Erkrankung auch eine Weiterentwicklung und Anpassung der feuchten Wundversorgung erforderlich.

Dabei sollte die ideale Wundauflage das Wundheilungsmilieu so modifizieren, dass die Mechanismen der körpereigenen Wundheilung ungestört ablaufen und Komplikationen vermieden werden, wie erhöhte proinflammatorische Zytokinausschüttung oder Wundinfektion. Trotz einer Vielzahl von modernen, z.T. aktiver Wundauflagen, gelingt exakt dies nicht immer zufriedenstellend. So finden sich im Wundexsudat vieler chronischer Wunden erhöhte Konzentrationen an Entzündungsmediatoren oder freien Radikalen, welche die proinflammatorische Phase der Wundheilung aufrechterhalten. Ebenso ist das Problem der infizierten chronischen Wunde ungelöst.

Inwiefern Alginate aus bakterieller Quelle gegenüber Alginaten aus marinen Algen neue Eigenschaften aufweisen und zur Wundheilung beitragen können, wurde bislang nicht untersucht. Dieser Vergleich wird nun erstmals durch ein vom BMBF gefördertes Projekt an den Hohenstein Instituten nahe Heilbronn möglich, das die Herstellung von bakteriellem Alginat mittels biotechnologischer Techniken aus dem Bakterium *Azotobacter vinelandii* zur Aufgabe hatte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher biotechnologisch gewonnenes Alginat aus *Azotobacter vinelandii* - das chemisch auf Acetylierung, Molmasse und M/G-Verhältnis charakterisiert wurde - zu Alginatfasern nassversponnen und zu Wundauflagenvliesen verarbeitet werden. Anschließend soll mit Hilfe von in vitro Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich derartige Wundauflagen aus bakteriellem Alginat hinsichtlich ihres Absorptionsvermögens, der Bindung von Entzündungsmediatoren (proinflammatorische Zytokine, Proteasen und reaktive Oxygenspezies ROS) sowie der Keiminaktivierung, gegenüber ausgewählten kommerziell erhältlichen Wundauflagen aus marinem Alginat unterscheiden. So könnte bakterielles Alginat gegenüber marinem Alginat aufgrund seiner Molekularstruktur u.U. besser gelieren und bei Kontakt mit Flüssigkeiten vermehrt Wundexsudat, Detritus oder Bakterien einschließen. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen damit zur Diskussion anregen, ob Wundauflagen aus bakteriellem Alginat in der modernen Wundbehandlung künftig klinische Vorteile bieten.

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Material

# 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquellen
>99 % Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe,
	Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Bio_Rad Laboratories, München,
	Deutschland
Alginatpulver, marin	CHT Beitlich GmbH, Tübingen,
	Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland
Deuterierte Salzsäure, DCl	Aldrich, Milwaukee, USA
Deuterietes Wasser, D <sub>2</sub> O	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Gold/Platinumpartikel (80/20)	Target von Quorum Technologies, Baltec
$H_2SO_4$	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland
HCl	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland
NaCl	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland
NaOH	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland
Triethylenetetramine-N,N,N',N",N"',N"'-	Sigma-Aldrich Chemie, München,
hexaessigsäure (TTHA)	Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
monolaurat)	München, Deutschland

# 2.1.2. Kits

ELISA Kits	Bezugsquellen
Human TNF-α ELISA development kit	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
(HRP) 3510-1A-6	
PNM Elastase ELISA Kit	Milenia Biotech GmbH, Gießen,
	Deutschland
Quantikine® IL-8 ELISA	R&D Systems <sup>™</sup> , Abingdon, UK
Quantikine® MMP-2 ELISA	R&D Systems <sup>™</sup> , Abingdon, UK
	1
Freie Radikale Kit	Bezugsquelle
Abel® Kit Pholasin	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg,
	Deutschland
	1

# 2.1.3. Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer 5050 EL, Brenda, Niederlanden
Filternutsche	Präparativer Feinfilter (250 mL Schott
	GmbH) mit Porosität 2 (40-100 µm).
Fluoreszenzmikroskop IX-70	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gefriertrockner	Christ, Alpha 1-4 LSC, Osterode,
	Deutschland
Genios Microplatten Reader	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Klimaschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Pumpe	ISMATEC (IDEX, Glattbrugg, Schweiz)
Rasterelektronenmikroskop JSM-5610LV	JOEL GmbH, Eching, Deutschland
Rotor	LMS Brand, Brigachtal, Deutschland
Schüttelinkubator IKA KS 4000i control	IKA, Staufen, Deutschland
Schüttelinkubator THERMOstar	BMG Labtech GmbH, Ortenberg,
	Deutschland
SF 1 shake flask	Stuart shake flask, Staffordshire, UK
Spektralphotometer	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Sputter Coater	Bal-tec, Balzers SCD 004, Liechtenstein
Stereomikroskop SZX 12	Olympus Corp., Tokio, Japan
Vakuumpumpe	Pfeiffer Vakuum, Duo 5M, Wetzlar,
	Deutschland
Vortex	Mixer Uzusio VTX-3000L, LMS Brand,
	Brigachtal, Deutschland
Zentrifuge 5904R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Materialien	Bezugsquelle
24-Well- Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
	Deutschland
Bluecaps 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
	Deutschland
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
	Deutschland
Petrischale 9 cm Durchmesser	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden,
	Deutschland
Pinzette Dumont no. 5	Sigma-Aldrich Chemie, München,
	Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 mL	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden,
	Deutschland
Röhrchen 50 mL	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden,
	Deutschland
Schale 6,5 cm Durchmesser	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden,
	Deutschland

# 2.1.4. Zellkulturmedien, Puffer und Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Ampicillin-Nährboden	Hergestellt nach SOP, Hohenstein
BSA (bovines Serum-Albumin)	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,
	München, Deutschland

CASO (Casein-Soja-Pepton) -Bouillon	Heipha, Eppelheim, Deutschland		
CASO (Casein-Soja-Pepton)-Agarplatten	Heipha, Eppelheim, Deutschland		
DEV-Agar	Heipha, Eppelheim, Deutschland		
E.coli DH10B	DSMZ, Braunschweig, Deutschland		
Humanes Wundexsudat, gepoolt	Klinikum Ludwigsburg, von Patienten mit		
	Ulcera cruris und Vakuumversiegelung die		
	über Redon-Flaschen angeschlossen waren.		
	Patienten unter Antibiose		
mCherry	Clontech, Mountain View, USA		
MRSA DSM 11729	DSMZ, Braunschweig, Deutschland		
P.aeruginosa DSM 939	DSMZ, Braunschweig, Deutschland		
PBS	1 L enthält: 0,8 g NaCl, 0,2g KCl, 1,42 g		
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> oder 1,78 g Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O und		
	0,27 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
Sörensen Phosphatpuffer	1. Stammlösung (0,25 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ):		
	$34 \pm 0.1$ g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 500 mL Aquadest		
	lösen, mit NaOH auf pH $7,2 \pm 0,1$		
	einstellen und auf 1 L auffüllen		
	2. Arbeitslösung (0,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4)</sub> :		
	0,5 mL der Stammlösung plus 40 $\mu$ L		
	Detergenz Q2-5211 werden zu 400 mL		
	Aqua dest. gegeben und autoklaviert.		
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich Chemie,		
	München, Deutschland		

# 2.1.5. Wundauflagen

Für die Untersuchungen wurden folgende Wundauflagen verwendet:

Bakterielle Alginatwundauflagen:

# **Bakterielles Alginat**

Die Wundauflagen aus undotiertem bakteriellen Alginat wurden an den Hohenstein Instituten hergestellt. Hierzu wurde bakterielles Alginat verwendet, das durch Kultivierung von *Azotobacter vinelandii* auf Burk`s nitrogen-free medium, alkoholischer Fällung mit > 99 % Ethanol, Zentrifugation und Lyophilisierung gewonnen wurde. Die Herstellung des Alginats erfolgte im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes ("Biotechnologische Herstellung von Alginat als Ausgangsstoff für faserbasierte Werkstoffe und Produkte" / AlBioTex, Förderkennzeichen 031A126C). Es wurde von den Hohenstein Instituten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mittels Nassspinnverfahren im CaCl<sub>2</sub>-Bad wurde das bakterielle Alginat zu Fasern verarbeitet, aus welchen letztendlich Vliese gefertigt wurden, welche als Wundauflagen-Prototypen verwendet wurden.

# <u>AgPURE</u>

AgPURE ist eine kommerzielle antimikrobielle Ausrüstung der Firma ras materials GmbH in Regensburg. Dabei handelt es sich um Nanosilberpartikel einer Partikelgröße von < 15 nm. Die Stammlösung enthält folgende Bestandteile:

Bezeichnung	Lot	Testmuster	Hersteller	Inhaltsstoff	Partikel- größe	Anwendung	Bemerkung
AgPURE W10	A10091015b	98/8/EG N- 29916	ras materials GmbH	10% Elemental nanosilver content, 75% Wasser (als Reaktionsnebenprodukt ensteht 3-15% Ammoniumnitrat)	D90 < 15 nm	Antimikrobielles Finishing auf Oberflächen	OECD gelistet

Für die Entwicklung antibakterieller Wundauflagen mit Nanosilber wurde der Spinnlösung aus bakteriellem Alginat AgPURE zu einer finalen Konzentration von 50 µg/ mL zugefügt. Anschließend wurden die Alginatfasern wie beschrieben im Calciumbad ausgefällt und zu Vliesen verarbeitet. Im Weiteren wird diese bakterielle Alginatauflage mit AgPURE-Zusatz als "AgPURE-Alginat" bezeichnet.

# Marine Alginatwundauflagen:

# Biatain®-Alginat

Die Biatain®-Alginatwundauflage der Firma Coloplast besteht zu 85 % aus Calciumalginat und zu 15 % aus hydrokolloider Carboxymethylcellulose (CMC). Laut Hersteller ist die Biatain®-Wundauflage in der Lage, das 18-fache ihres Eigengewichts an Flüssigkeit aufzunehmen und ist für mittelstark bis stark exsudierende, fibrinös belegte Wunden indiziert.

# Cutimed®-Alginate

Cutimed® Wundauflagen der Firme BSN Medical sind Wundauflagen aus marinem Alginat, die zu 80 % aus Calciumalginat und zu 20 % aus Natriumalginat bestehen. Die Wundauflage

zeichnet sich laut Hersteller durch ein schnelles Absorptionsvermögen aus und soll bei leicht blutenden Wunden hämostyptisch wirken.

# DracoAlgin

DracoAlgin-Wundauflagen der Firma Draco bestehen aus Calciumalginatfasern und Carboxymethylcellulose (CMC). Laut Herstellernachweis soll DracoAlgin stark absorbierend wirken und bei Kontakt mit der Wundfläche den Reinigungs- und Granulationseffekt der Wunde fördern. Die Wundauflage ist indiziert für stark bis mäßig exsudierende, oberflächliche oder tiefe Wunden und Wundhöhlen.

# <u>Kaltostat®</u>

Die Kaltostat®-Wundauflage der Firma ConvaTec besteht aus Calcium-Natriumalginat, welches aus der Braunalge *Laminaria hyperborea* gewonnen wird. Die Wundauflage ist indiziert für moderat bis stark exsudierende Wunden sowie für leicht blutende Wunden. Laut Hersteller eignet sich Kaltostat® insbesondere bei der Versorgung von Spalthautentnahmestellen, Wunden nach chirurgischem Debridement, Risswunden, Abschürfungen, Nasenbluten und Zahnextraktionen.

# M-reiches Alginat

Das marine Alginat der Firma CHT R. Beitlich GmbH wurde aus Braunlagen gewonnen. Es zeichnet sich aus durch einen hohen M (Mannuronsäure)-reichen Anteil. Aufgrund dessen, wurde es in dieser Arbeit als Referenzmaterial zum bakteriellen Alginat gewählt.

## <u>Silvercel®</u>

Die Silvercel®-Wundauflagen der Firma Systagenix sind indiziert zur Reinigung mittel bis stark exsudierender, entzündeter Wunden. Sie setzen sich zu 60 % aus Hydroalginat und zu 40 % aus silberbeschichteten Nylonfasern zusammen. Der Hydroalginat-Anteil wiederherum besteht zu 51 % aus Calciumalginat und zu 9 % aus Carboxymethylcellulose (CMC), welche auch als Hydrofaser bekannt ist. Durch den Anteil silberhaltiger Fasern wirkt die Silvercel®-Wundauflage laut Hersteller in vitro gegen mehr als 150 verschiedene Keime bakterizid. Dieses Spektrum soll auch die nosokomialen Problemkeime *MRSA* und *VRE* beinhalten. Zudem soll laut Johnson & Johnson keine zytotoxische Reaktion auf körpereigenes Gewebe auftreten.

#### <u>Tegaderm™</u>

Die Tegaderm<sup>™</sup> Wundauflage der Firma Fresenius-Kabi besteht aus Calciumalginatfasern. Sie ist indiziert zur Absorption und Unterstützung des autolytischen Debridements bei mäßig bis stark exsudierenden, tiefen Wunden, wie beispielsweise bei Ulcus cruris, diabetischem Fußsyndrom, Spalthautentnahmestellen, Schnitt- und Schürfwunden oder postoperativen Wunden.

# Trionic Algosteril®

Bei der Wundauflage Trionic Algosteril® der Firma Systagenix handelt es sich um Alginat, an welches Zink-, Mangan- und Calciumionen gebunden wurden. Da es sich um marines Alginat aus Braunalgen handelt, enthält es als weiteren Bestandteil Chlorophyll. In der klinischen Praxis ist eine Wundversorgung mit Trionic Algosteril® bei moderat bis stark exsudierenden, sekundär heilenden Wunden, wie beispielsweise Dekubiti, Abszesse oder Platzbäuche, indiziert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Wundauflage als "Algosteril®" gekennzeichnet.

# 2.2. Methoden

Teile der Methodik wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:

Fischer, M., Gebhard, F., Hammer, T., Zurek, C., Meurer, G., Marquardt, C., Hoefer, D. 2017. Microbial alginate dressings show improved binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of biomaterials applications* 9, 1267-1276

#### 2.2.1. Biotechnologische Herstellung von Alginatwundauflagen

Bevor in dieser Arbeit bakterielles Alginat zu Fasern versponnen und weiter zu Vliesen und Wundauflagen verarbeitet werden konnte - mit welchen Untersuchungen zum Einfluss mariner und bakterieller Alginatwundauflagen auf Zytokine und auf Keiminaktivierung durchführbar waren - musste zunächst die Gewinnung bakteriellen Alginats durch *Azotobacter vinelandii* optimiert werden. Diese vorangegangenen Versuche fanden im Rahmen des BMBF-geförderten AlBioTex-Projekts statt. Sie werden hier, dem besseren Verständnis und der späteren Diskussion halber, nur kursorisch im kurzen Überblick dargestellt. Es betrifft die Kultivierung von *Azotobacter vinelandii*, die bakterielle Alginatisolation sowie dessen Charakterisierung. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert [37].

### 2.2.1.1. Kultivierung von Azotobacter vinelandii

Im Rahmen des AlBioTex-Projekts wurde der Wildtyp Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ausgewählt, welcher von der American Type Culture Collection bezogen wurde. Die Kultivierung erfolgte auf sterilem Burk's Stickstoff-freien Medium, welches auf 1 L Folgendes enthält: 0,765 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,225 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,200 g MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,076 g CaSO<sub>4</sub>, 0,242 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>0 und 5,004 g FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>0. Der pH-Wert des Mediums wurde mittels 1 M HCl zu 7,0 optimiert. Anschließend wurde das Medium für 15 Min bei 121° C autoklaviert. Da die Salze Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>0 und FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>0 dazu neigen, während des Autoklavierens auszufallen, wurden sie zunächst gefiltert und sterilisiert, bevor sie dem bereits autoklavierten Medium über einen Filter mit 0,2 µm Porengröße zugefügt wurden. Dem Medium wurden anschließend sterile Saccharose oder Rohglycerin als Kohlenstoffquellen mit einer finalen Konzentration von 20 g/L zugegeben. Zuletzt erfolgte die Kultivierung von Azotobacter vinelandii für 48 h bei 30° C in 250 mL Erlenmeyerkolben. Die Erlenmeyerkolben enthielten 100 mL Burk-Medium und wurden bei 250 rpm in einem Schüttelinkubator (KS 4000 i control, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) unter Sauerstoffkontrolle inkubiert.

# 2.2.1.2. Bakterielle Alginatisolation

Im Anschluss an die Inkubation wurden die entstandenen Bakteriensuspensionen mit 10 mL 50 mM NaCl verdünnt. Daraufhin wurden die Suspensionen für weitere 30 Min bei 30° C und 250 rpm auf dem Shaker geschüttelt, um das Zell-gebundene Alginat zu lösen. Es erfolgte die Zentrifugation bei 15.500 x g und bei 4° C für 40 Min (Zentrifuge 5904R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) um die mikrobielle Biomasse abzutrennen. Durch alkoholische Fällung mit -80° C kaltem >99 % Ethanol, 1 % methyliert (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurde das bakterielle Alginat aus dem Überstand gefällt. Das gefällte Alginat wurde anschließend durch erneute Zentrifugation bei 15.500 x g und 4° C für 20 Min sedimentiert. Danach wurde es zweifach mit Ethanol gewaschen und

über Nacht mittels Lyophilisierung getrocknet. Die gewonnene Masse an Alginat wurde gravimetrisch bestimmt. Mittels ATR- Infrarot-Spektroskopie (attenuated total reflection) wurde die Reinheit des gewonnenen Alginats bestimmt. Die gemessenen Spektren wurden gegen die eines marinen Alginats mit hohem M-Gehalt (CHT R. Beitlich GmbH, Tübingen, Deutschland), welches bei allen Charakterisierungen als Referenz hinzugezogen wurde, verglichen.

# 2.2.1.3. Charakterisierung des bakteriellen Alginats

Mittels Gelpermeations-Chromatographie (GPC, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Deutschland) wurde die molare Masse des gewonnenen Alginats bestimmt. Durch Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) sollte zum einen der Acetylierungsgrad des bakteriellen Alginats bestimmt, zum anderen das Verhältnis von Mannuronsäure (M)- und Guluronsäure (G)- Blöcken von marinem und bakteriellem Alginat analysiert werden. Da jeder Mannuronsäure-Baustein des Alginats zwei Acetylgruppen trägt, liegt der maximale Acetylierungsgrad bei 200 %. Die Analyse der Peaks der <sup>1</sup>H-NMR und die Berechnung des Verhältnisses der M- und G-Blöcke im Alginat erfolgten anhand Davis [15] und der Norm ASTM F2259-10 (2012). Die Berechnung des Acetylierungsgrades wurde nach der Methode von Skjak-Braek [93] durchgeführt.

Zur Vorbereitung der <sup>1</sup>H-NMR wurden zunächst spezielle Alginatlösungen hergestellt. Dazu wurden zum einen 100 mg marines Alginatpulver in 100 mL H<sub>2</sub>O gelöst, zum anderen 30 mg bakterielles Alginatpulver in 30 mL H<sub>2</sub>O gelöst. Mit 1 M HCl wurde der pH-Wert der Alginatlösungen zunächst auf 5,6 eingestellt und die Lösungen anschließend für 1 h bei 99,8° C im Wasserbad gelagert. Danach wurde der pH-Wert abermals mit 1 M HCl auf 3,8 korrigiert und die Alginatlösungen für 30 Min im Wasserbad bei 99,8° C gelagert. Letztendlich wurde der pH-Wert der Alginatlösungen mit NaOH auf 7,5 eingestellt und die Lösungen wurden über Nacht gefriergetrocknet. Am folgenden Tag wurde die lyophilisierte marine Alginatlösung in 5 mL D<sub>2</sub>O gelöst und erneut gefriergetrocknet, die bakterielle Alginatlösung wurde in 1,5 mL D<sub>2</sub>O gelöst und lyophilisiert. Von den zweifach gefriergetrockneten Lösungen wurden je 12 mL in 1 mL 99,9 % D<sub>2</sub>O gelöst und davon im Anschluss je 700 μL in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde 0,3 M TTHA hergestellt, indem 371 mg an 494,45 g/mol TTHA in 2,5 mL 99,9% D<sub>2</sub>O auf dem Rührgerät unter Wärmezufuhr gelöst wurden. Mit DCl wurde der pH-Wert der TTHA-Lösung auf 5,5 eingestellt. Zuletzt wurde 20 μL 0,3 M TTHA zu den Alginatlösungen
pipettiert. Die Durchführung der <sup>1</sup>H-NMR erfolgte anschließend an dem Department of Biotechnology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norwegen.

## 2.2.1.4. Faserherstellung

Mit Hilfe der vorangegangenen Versuche des AlBioTex-Projektes stand den Experimenten dieser Arbeit nun bakterielles Alginat zur Verfügung, welches im Nassspinnverfahren zu Fasern verarbeitet werden konnte. Dazu wurden zunächst die Spinnlösungen des bakteriellen und marinen Alginats vorbereitet. Es wurden 15 g Alginat (1,5 % w/v) in 1 L Reinstwasser gelöst und mittels eines Magnetrührers kontinuierlich durchmischt. Das CaCl<sub>2</sub>-Fällbad wurde vorbereitet, indem 5,5 g CaCl<sub>2</sub> in 500 mL Dl-Wasser gelöst wurden, sodass eine Molarität von 0,1 M vorlag. Jeweils 50 mL dieser Spinnlösungen wurden anschließend in eine Einmalspritze gefüllt, welche an einem Stativ befestigt wurde. An diese Spritze wurde ein Schlauch mit einem Durchmesser von 3 mm befestigt und dieser mit einem zweiten Schlauch mit 1 mm Durchmesser verbunden. An diesem Schlauch war eine Spinndüse mit einer Porengröße von 0,76 mm befestigt, welche in das CaCl<sub>2</sub>-Fällbad mündete. Die Schläuche wurden in eine peristaltische Pumpe (IDEX Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) geklemmt. Die Flussrate der Alginat-Spinnlösung in das Fällbad betrug 1,2 cm<sup>3</sup>/Min. Der Ionenaustausch von Calciumionen in die G-Blöcke des Alginats führte zur Gelierung des Alginats im Fällbad, sodass die Alginat-Spinnlösung in Fasern ausfiel. Die Fasern wurden mithilfe eines Rotors, welcher mit einer Drehgeschwindigkeit von 50 rpm lief, aufgenommen und anschließend über Nacht bei 40° C getrocknet.

### 2.2.1.5. Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Alginatfasern

Die auf Deckgläsern aufgetragenen getrockneten bakteriellen und marinen Alginatfasern wurden anschließend mit Hilfe eines Sputter Coaters (Bal-tec, Balzers SCD 004, Liechtenstein) nach einem Standard-Präparationsverfahren mit Gold/Platinum (Au/Pt)-Partikeln bestaubt. Die Besputterung mit Gold/Platinum (Au/Pt) wurde an der Sputteranlage mit der Beschichtungseinheit MTM-20 durchgeführt. Die Proben für die Untersuchung der Ultrastruktur von Alginatfasern wurde bei einem Vakuum von 3 x 10<sup>2</sup> mbar und einer Spannung von 60 mA mit einem ca. 2 nm dicken Schicht aus Gold/Platinum beschichtet. Anschließend wurden die Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM, JSM- 5610LV, JOEL GmbH, Eching, Deutschland) bei 450-facher Vergrößerung betrachtet. Die Faserdicke wurde an der Longitudinalansicht der Fasern mit Hilfe des ImageJ Programms ermittelt. Für jede Probe wurde der Durchmesser von 5 Fasern gemittelt (n=5, 30 Messpunkte pro Faser). Zusätzlich wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von bakteriellen Alginatfasern, bei welchen die Spinnlösung mit AgPURE Nanosilberpartikeln versetzt wurde (AgPURE-Alginat), erstellt. Die REM-Aufnahme der AgPURE-Alginatfaser erfolgte unter 1500-facher Vergrößerung.

### 2.2.1.6. Herstellung von Alginatvliesen

Vor dem Vergleich der bakteriellen Alginatwundauflagen mit kommerziellen marinen Alginatwundauflagen mussten die Alginatfasern zunächst zu Vliesen verarbeitet werden. Dazu wurden die Alginatfasern in etwa 1 cm lange Stücke unterteilt und anschließend in die 1,25-fache Menge an destilliertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben gegeben. Durch Schwenken des Erlenmeyerkolbens erfolgte eine erste mechanische Vernetzung der kurzen Alginatfasern. Anschließend wurden die vorvernetzten Fasern in eine Filternutsche (250 mL Schott GmbH, Porosität 2 (40-100  $\mu$ m)) überführt und mittels einer Vakuumpumpe das destillierte Wasser entfernt. Um eine einheitliche Größe der Vliese zu erzielen wurden diese in Schalen mit 6,5 cm Durchmesser gegeben und auf eine Höhe von 1,0 cm abgemessen. Die Schalen wurden bei -80° C für 30 Min tiefgefroren und anschließend 18 h lyophilisiert. So lagen standardisierte Vliese aus bakteriellem Alginat vor, welche als Vergleichsproben gegen Wundauflagen aus marinen Alginaten in den folgenden Versuchen eingesetzt werden konnten.

### 2.2.1.7. Quellversuche mit Absorptionsvergleich

Wundauflagen aus Alginat zeichnen sich generell durch ein gutes Quellverhalten aus, welches in der klinischen Praxis dazu führt, dass sie bei exsudierenden Wunden die anfallende Wundflüssigkeit aufnehmen können. Um das Absorptionsvermögen der bakteriellen Alginatvliese mit der Absorption von Wundauflagen aus marinem Alginat zu vergleichen, wurden Quellversuche durchgeführt. Hierzu wurde eine Methode in Anlehnung an die Britische Pharmacopoeia verwendet [8].

Getestet wurde das Absorptionsvermögen des bakteriellen Alginatvlieses sowie marines Alginat mit hohem Mannuronsäuregehalt ("M-Alginat"). Als weitere Proben marinen Alginats kommerzieller Anbieter dienten Algosteril®, DracoAlgin, Kaltostat®, Biatain®, Tegaderm<sup>™</sup> sowie Cutimed®. Zunächst wurden alle Proben in 6,25 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und deren Trockengewicht ermittelt (A: Areal; W1: Trockengewicht von A). Diese wurden in flachen Petrischalen mit 9 cm Durchmesser platziert und mit Lösung A überdeckt. Lösung A ist eine wässrige Lösung mit 142 mM NaCl und 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> und wurde vor Inkubation auf 37° C erwärmt, sodass die Lösung den Eigenschaften humanen Bluts nahekommt. Es wurde Lösung A in der 40-fachen Menge des Eigengewichts der Vliesstücke eingesetzt. Die Vliese wurden für 30 Min bei 37° C inkubiert und anschließend vom Rand der Petrischale aufgenommen, damit nicht durch Quellung aufgenommene Lösung A abstreifen konnte. Bevor das Nassgewicht (W2) ermittelt wurde, wurden die Vliese für 30 Sekunden gehalten, um weitere überschüssige Lösung A abtropfen zu können. Die Absorption, welche als das durchschnittliche Gewicht der aufgenommenen Menge an Lösung A auf 100 cm<sup>2</sup> definiert ist, wurde anhand folgender Formel berechnet:

Absorption = 
$$\left\{\frac{W2 - W1}{A}\right\} x100$$

Mittels eines Stereomikroskops (SZX 12, Olympus Corp., Tokio, Japan) wurde das Quellverhalten der Vliese determiniert.

Zusätzlich wurde in einem zweiten Versuch getestet, inwiefern die Proben unter der Benetzung ihre ursprüngliche Form und Stärke beibehalten. Es wurde bakterielles Alginatvlies, marines Alginat mit hohem M-Anteil (Referenz), Algosteril®, DracoAlgin, Kaltostat®, Biatain®, Tegaderm<sup>TM</sup> und Cutimed® eingesetzt. Dazu wurden die Proben in 2,25 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten, in Petrischalen platziert und zentral mit je 200  $\mu$ L humanem Wundexsudat versehen, welches aus Patienten mit diabetischen Ulzera unter Vakuumversiegelung, angeschlossen an Redon-Flaschen, gewonnen wurde. Nach 24 h Inkubation der geschlossenen Petrischalen bei Raumtemperatur wurden die Proben mit je zwei Pinzetten an gegenüberliegenden Kanten gegriffen und auseinander gezogen. Sie wurden in 5 Kategorien / Divisionen beurteilt, die Terrill definierte [97]. Unter den 5 Divisionen versteht man 1: Verlust von Form und Integrität, 2: Schwerer Verlust von Form und Integrität, 3: Moderater Verlust von Form und Integrität, 4: Milder Verlust von Form und Integrität und 5: Kein Verlust von Form und Integrität.

## 2.2.2. Untersuchungen des Einflusses bakterieller Alginatwundauflagen auf Entzündungsmediatoren und Keiminaktivierung

Für die Untersuchungen des Einflusses bakterieller Alginatwundauflagen auf Entzündungsmediatoren und Keiminaktivierung wurden als Vergleichswundauflagen aus marinem Alginat Algosteril® und Silvercel® aus folgenden Gründen gewählt: Dadurch stehen einerseits dem Vergleich des bakteriellen Alginatvlieses und des AgPURE-Alginats, eine marine Wundauflage (Algosteril®) und eine marine Wundauflage mit Silberzusatz (Silvercel®) zur Verfügung. Da beide kommerziellen Wundauflagen andererseits derselben Firma (Systagenix) entstammen, sind sie (nach Rücksprache mit dem Hersteller) aus identischer mariner Alginatquelle gefertigt und sind daher für den Vergleich mit den beiden bakteriellen Alginatwundauflagen optimal geeignet, welchen dasselbe bakterielle Alginat als Rohstoffquelle zu Grunde liegt.

## 2.2.2.1. Zytokinbestimmung mittels Immunassay ELISA

Immunassays sind eine etablierte Methode der Proteinanalytik. So genannte ELISAs (enzyme linked immunosorbent assays) basieren auf einer durch ein Enzym katalysierten Chromogenumwandlung. Dabei wird ein lösliches, farbloses Chromogen in einen löslichen, farbigen und quantifizierbaren Farbstoff katalysiert [61]. Für die Bestimmung von Entzündungsmediatoren - welche von Alginatwundauflagen gebunden werden könnten wurden in dieser Arbeit sogenannte Sandwich-ELISAs verwendet. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich vorteilhaft sezernierte Zytokine wie TNF-α, MMP-2 oder IL-8 nachweisen, ein Prinzip, was im Folgenden kurz dargelegt wird: Bei den Sandwich-ELISAs werden zunächst antigenspezifische Antikörper an den Träger - i.d.R. Mikrotiterplatten - gebunden [41]. Diese sogenannten Fang-Antikörper sind in der Lage, das gewünschte Antigen - die o.g. Zytokine - mit hoher Affinität aus einer Lösung zu binden und somit an die Kavitäten des Trägers zu konzentrieren, selbst wenn das Antigen in nur geringer Konzentration in der Probenlösung vorhanden ist [41], [61]. Nach Zugabe der Probenlösung und Inkubation werden die Kavitäten der Träger mit einer Waschpufferlösung gewaschen, um die nichtgebundenen Antigene zu entfernen. Anschließend wird ein zweiter, sogenannter Detektions-Antikörper in den Träger gegeben, der ein anderes Epitop des bereits vom Fang-Antikörper gebundenen Antigens erkennt. Hierdurch kommt es zu einem Schichtaufbau aus Fänger-Antikörper / Antigen / und Detektions-Antikörper, was den Namen Sandwich-ELISA erklärt (Siehe Abbildung 4). An den Detektions-Antikörper ist i.d.R. ein Nachweismolekül molekular gekoppelt (z.B. Radionuklide oder ein Enzym). Über das Enzym in der Antikörper Antigen-Kaskade lässt sich nun z.B. eine konzentrationsabhängige

Farbreaktion starten. Die Menge an gebundenem Antigen ist hierbei quantitativ über die Intensität des Farbausschlags messbar [41]. Ausgewertet werden ELISAs über Spektrophotometrie in Mikroplatten-ELISA Readern.



Abb. 4: Schematische Darstellung eines Enzym-gekoppelten Immunassays ELISA. Abbildung nach Lottspeich [61].

Für jeden ELISA wurden die Wundauflagen zur Probengewinnung zunächst vorbereitet. Dazu wurden Stanzlinge aus den jeweiligen Wundauflagen mit einem Durchmesser von 8 mm hergestellt (siehe Abb. 5).



Abb 5: Probenvorbereitung: 8 mm Stanzlinge aus bakteriellen und kommerziellen marinen Alginatwundauflagen

## 2.2.2.2. Wundauflagen-/ Zytokin-Inkubation und Elution der Stanzlinge

Vor dem Immunassay wurden alle vorbereiteten Stanzlinge in die Kavitäten einer 24-Well-Platte platziert und dort mit jeweils 1 mL des Zytokins überdeckt. Die 24-Well-Platte wurde daraufhin für 24 h bei 37° C unter Schütteln auf einem Schüttelinkubator (THERMOstar, BMG Labtech GmbH) mit dem jeweiligen Zytokin inkubiert, (im Folgenden "Zytokin im Überstand" benannt), wie in Abbildung 6 dargestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Überstand von den Stanzlingen abgenommen und bis zum weiteren Einsatz im ELISA bei -20° C tiefgefroren.

Um das während der Inkubationszeit an die Wundauflagen gebundene Zytokin von den Stanzlingen zu lösen, wurde diese im Anschluss mit 1 mL PBS und 0,05% Tween 20 bedeckt und erneut für 1 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Diese Lösung wurde stets als "Elutionsprobe" bezeichnet.



Abb. 6: Zytokininkubation mit Wundauflagen in 24 Well-Platte vor der Zugabe von je 1 mL Zytokin-Proteinlösung

## Zytokinbestimmung von humanem TNF-α

Mit Hilfe des TNF- $\alpha$  ELISA Kits der Firma Mabtech AB wurde die Bindungsfähigkeit der kommerziellen und bakteriellen Alginatwundauflagen für TNF- $\alpha$  untersucht. Die Sensitivität des Assays liegt bei 13 pg/mL. Verglichen werden sollten die Wundauflagen Algosteril® (Systagenix), Silvercel® (Systagenix), Wundauflagen (Vliese) aus bakteriellem Alginat aus *Azotobacter vinelandii*, und Wundauflagen (Vliese) aus bakteriellem Alginat aus *Azotobacter vinelandii*, und Wundauflagen (Vliese) aus bakteriellem Alginat aus *Azotobacter vinelandii dotiert* mit AgPURE<sup>TM</sup> (ras materials)-Wundauflagen sowie eine Negativkontrolle, die aus einer leeren Kavität ohne Stanzling bestand. Die Stanzlinge wurden für 24 h mit 100 pg/TNF- $\alpha$  Proteinlösung in PBS inkubiert, der Überstand wurde anschließend abgenommen ("Zytokin im Überstand") und die Stanzlinge erneut eluiert ("Elutionsprobe").

Zur Vorbereitung der Zytokinmessung wurden hochproteinbindende Mikrotiterplatten mit dem monoklonalen Fang-Antikörper mAb TNF- $\alpha$  3/4 beschichtet (TNF- $\alpha$ -MTP). Dazu wurden je 100 µL des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb TNF- $\alpha$  3/4 (2µg/mL) in PBS pro Kavität pipettiert und bei 4-8° C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Mikrotiterplatten zweifach mit PBS (200 µL/Vertiefung) gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 200 µL/Kavität eines Blockierungspuffers aus 0,1% BSA und 0,05% Tween 20 in Phosphat-gepufferter Lösung (PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen. Ein Liter PBS besteht aus 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na2HPO4 oder 1,78 g Na2HPO4 2 H20 sowie 0,27 KH2PO4. Dies ergibt 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Gesamtphosphat. Durch diese Zusammensetzung entspricht PBS einer isotonen Lösung. Vor der Zytokinbindung wurden die Kavitäten der ELISA Platten 5-fach mit einem Waschpuffer aus PBS und 0,05% Tween 20 gewaschen.

Zur Vorbereitung der Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe mit dem im Kit enthaltenen, rekombinanten TNF- $\alpha$  angesetzt. Da jede Wundauflage im Dreifachansatz getestet werden sollte, wurden für eine Platte insgesamt 15 mL TNF- $\alpha$ -Proteinlösung hergestellt. Dazu wurde eine Stammlösung des lyophilisierten TNF- $\alpha$  des Mabtech-ELISA Kits in 1 mL PBS gelöst, was einer Konzentration von 1 ng/mL entspricht. Dieser Probenansatz wurde 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Vortexers gründlich durchmischt. Für jede Kavität wurden 100 µL benötigt. Nun wurde eine Verdünnungsreihe mit 1000 pg/mL, 100 pg/mL, 75 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL und 0 pg/mL Konzentration TNF- $\alpha$  hergestellt.

Zur Messung der Zytokinkonzentration von humanen TNF- $\alpha$  wurden nun je 100 µL der TNF- $\alpha$  Standardreihe, der Negativkontrolle (PES) und die 24 h- sowie Elutionsproben in die Kavitäten der vorbereiteten TNF- $\alpha$ -Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden diese Kavitäten 5-fach mit Waschpuffer gewaschen.

Daraufhin wurde in jede Vertiefung der TNF- $\alpha$ -Mikrotiterplatte 100 µL des monoklonalen Detektions-Antikörpers mAb TNF- $\alpha$  5-biotin in einer Konzentration von 1 µg/mL pipettiert und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut 5-fach mit Waschpuffer gespült und die Vertiefungen mit jeweils 100 µL/Kavität einer Streptavidin-Meerettich-Peroxidase (HRP) Lösung befüllt, die 1:1000 in Inkubationspuffer verdünnt wurde. Das Bindungsprinzip basiert hierbei auf der hohen Affinität von Streptavidin (aus Streptomyces avidinii) oder Avidin (aus Hühnereiweiß) für das am mAb gekoppelte Biotin. Nun wurde der Ansatz wiederum für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit Waschpuffer gespült. Daraufhin wurde pro Vertiefung 100 µL des Enzymsubstrates 3,3<sup>4</sup>, 5,5'-Tetramethylbenzidin (in gepufferter Peroxid-Lösung) hinzugefügt. Die enzymatische Aktivität der Peroxidase wird hierbei über eine Farbreaktion nachgewiesen. Das farblose Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird dabei von der Peroxidase in ein blaues Zwischenprodukt (TMB Ladungstransfer-Komplex) überführt. Nach Zugabe einer 2M säurehaltigen (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder HCl) "Stopplösung" wird die enzymatische Reaktion beendet und der Ladungstransfer-Komplex geht in einen gelben Farbstoff 3,3',5,5'- Tetramethyl 1,1-4,4 Diamin über, der im Photometer bei 450 nm detektiert werden kann. Innerhalb einer Stunde, nachdem die Stopplösung zugegeben worden war, wurde in einem Spektralphotometer (Tecan, Crailsheim, Germany) bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte (OD) sowohl des Standards als auch der Kontrollen und Proben gegen TMB und die Stopplösung (je 100 µL/Mikroküvette) gemessen (Korrekturwellenlänge 540 bzw. 570 nm).

Der Vergleich der über 24 Stunden angebotenen TNF- $\alpha$  Konzentration mit der Konzentration im Überstand nach Inkubation mit der Wundauflage lässt Schlüsse auf die Bindungskapazität der jeweiligen Alginatwundauflagen für TNF- $\alpha$  zu. Wie bereits dargelegt, wurden die Stanzlinge nun erneut gründlich mit Waschpuffer unter Schütteln gewaschen, um nicht gebundene Anteile zu entfernen. Die so erhaltenen Eluate wurden ebenfalls im ELISA auf ihre TNF- $\alpha$ -Konzentration untersucht. Durch den Vergleich der Eluate mit den Überständen konnte so überprüft werden, ob das zuvor an die Wundauflagen gebundene TNF- $\alpha$  durch Spülen wieder freigibt.

## Zytokinbestimmung von MMP-2

Der MMP-2 ELISA dient der Untersuchung, inwiefern die Alginatwundauflagen in der Lage sind, das Zytokin Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) zu binden. Auch hier wurden 8 mm Stanzlinge aus Wundauflagen hergestellt. Erneu wurden in diesen Versuchen Algosteril®,

Silvercel®, Wundauflagen aus bakteriellem Alginat sowie bakterielles Alginat mit AgPURE (ras materials) miteinander verglichen. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des R&D Systems Quantikine® ELISA Kits. Der 96-Well Kit detektiert rekombinantes MMP-2 sowie humanes und das an TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) komplexierte MMP-2. Die Sensitivität liegt bei 0.082 ng/mL.

Für diesen Assay wurde der lyophilisierte MMP-2 Standard in 1 mL destilliertem Wasser gelöst und zu einer Stammlösung von 100 ng/mL gemischt. Aus dieser wurde laut Herstellerangabe mit dem beigefügten Puffer Calibrator Diluent eine Inkubationslösung von rekombinantem Mäuse/Ratten MMP-2 mit einer finalen Konzentration von 5000 pg/mL hergestellt. 1 mL dieser MMP-Proteinlösung wurde auf die Stanzlinge in den Kavitäten einer 24-Well Platte platziert und anschließend bei 37° C für 24 h unter Schütteln inkubiert. Darauf folgend wurde der Überstand als 24 h-Probe abgenommen und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren ("Zytokin im Überstand"). Das auf den Alginatstanzlingen gebundene MMP-2 wurde nun mit 1 mL des Calibrator Diluent und 0,05% Tween 20 unter Schütteln für 1 h bei 37° C gelöst. Diese Elutionsproben wurden anschließend ebenfalls bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Anschließend wurden die Lösungen für die Kalibriergerade hergestellt. Dazu wurden je 120  $\mu$ L pro Verdünnungsreihe angesetzt. Es wurden Konzentration von 0 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL und 100 ng/mL angesetzt.

Zur Durchführung des MMP-2 ELISA wurde 100  $\mu$ L Assay Diluent RD1-74 in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und 50  $\mu$ L des MMP-2-Standard (Verdünnungsreihe), bzw. der Negativkontrolle oder der Proben (24 h Probe sowie Elutionsprobe) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator mit 500 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und vierfach mit 400  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde die Mikrotiterplatte invertiert und auf sauberen Papiertüchern ausgeklopft. Danach wurden 200  $\mu$ L des Detektions-Antikörpers (MMP-2-Konjugat) in jede Vertiefung gegeben, die Mikrotiterplatte in Aluminiumfolie gehüllt und für erneut 2 h bei Raumtemperatur im Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Nun wurden die Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und vierfach mit 400  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Mikrotiterplatte erneut invertiert und auf Papiertüchern ausgeklopft. Anschließend wurde je Kavität 200  $\mu$ L der Substrat enthaltenden Lösung auspipettiert und die Mikrotiterplatte für 30 Minuten lichtgeschützt, ungeschüttelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratlösung wurde unmittelbar vor Durchführung des ELISA hergestellt. Dazu wurden 4 mL Color Reagent A und 4 mL Color Reagent B gemischt. Nun wurden 50 µL der Stopplösung dazu pipettiert und zuletzt wurde innerhalb von 30 Minuten die OD (Optische Dichte) bei 450 nm im Reader gemessen (Korrekturwellenlänge 540 bzw. 570 nm).

#### Zytokinbestimmung von Interleukin 8 / IL-8

Der Immunassay ELISA für die Bestimmung von Interleukin 8 folgte demselben Sandwich-ELISA Prinzip. Wiederum wurden Stanzlinge hergestellt aus Algosteril®, Silvercel®, Wundauflagen aus bakteriellem Alginat sowie AgPURE-Wundauflagen und auf ihre Bindungsfähigkeit für Interleukin 8 (IL-8) hin untersucht. Dazu wurde das IL-8 Quantikine Kit der Firma R&D Systems verwendet, das natürliches und rekombinantes humanes Interleukin erkennt. Die Sensitivität des Assays liegt bei 7.5 pg/mL.

Der Interleukin-8 Standard des Kits (No.5 - Calibrator 5) wurde in 1 mL destilliertem Wasser gelöst. Davon wurden eine Gebrauchslösung mit einer IL-8 Konzentration von 1 ng/mL hergestellt. Diese Stammlösung wurde nochmals 1:10 verdünnt und 1 mL mit einer finalen Konzentration von 100 pg/mL auf die Stanzlinge pipettiert, welche anschließend für 24 h unter Schütteln mit der IL-8 Proteinlösung inkubiert wurden. Als Negativkontrolle des Versuchs wurde eine Vertiefung ohne Stanzling herangezogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände ("Zytokin im Überstand") von den Wundauflagen abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C tiefgefroren. Ebenso wurden die Stanzlinge mit 1 mL Aqua dest. überschichtet und für 1 weitere Stunde bei 37° C unter Schütteln inkubiert, um die Elutionsproben zu erhalten, die bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden. Die Verdünnungsreihe für IL-8 enthielt die Konzentrationen 635 pg/mL, 200 pg/mL, 69 pg/mL, 44 pg/mL und 0 pg/mL.

Die Inkubation der Proben erfolgte analog zu den Schritten des MMP-2 ELISAs, wobei als Detektions-Antikörper ein IL-8-Antikörper verwendet wurde, an den das HRP direkt gekoppelt vorlag. Nach Zufügen der TMB-Substratlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Horizontalschüttler bei 700 rpm und in Dunkelheit, wurde die Farbreaktion über 50 µL Stopplösung beendet. Die Farbreaktion konnte so in den darauf folgenden 30 Minuten bei 450 nm im Tecan-Reader gemessen werden. Die Referenzwellenlänge lag hier bei 540, bzw. 570 nm.

### ELISA zur Bestimmung von PMN-Elastase

Der Immunassay ELISA auf PMN-Elastase dient, analog zu den bisher aufgeführten ELISA Versuchen, dem Nachweis der Bindungsfähigkeit der eingesetzten Wundauflagen für das im Wundexsudat auftretende Enzym PMN-Elastase. In diesem Versuch standen ebenfalls Wundauflagen aus bakteriellem Alginat, AgPURE, Silvercel® und Algosteril® zum Vergleich. Der PMN Elastase Kit von Milenia Biotech erkennt spezifisch ausschließlich humane PMN Elastase sowie den PMN Elastase alpha1-PI Komplex. Die Sensitivität liegt bei 3 ng/mL. Die Mikrotiter®-Platte ist bereits ab Werk mit polyklonalem Hühnereigelb-Antikörper gegen humane PMN-Elastase als Fang-Antikörper beschichtet. Für die Verdünnungsreihe wurde hier rekombinante PMN Elastase in 2 mL Standard-/Proben-Puffer für 30 min vor Gebrauch aufgelöst, sodass eine Endkonzentration von 500 ng/mL PMN Elastase resultierte. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, um Konzentrationen mit 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,3 ng/mL, 15,6 ng/mL und 0 ng/mL zu erhalten.

Wie auch bei den vorherigen Versuchen wurden zunächst Stanzlinge aus den Wundauflagen angefertigt, welche in einem zweiten Schritt auf die 24-Well-Platten aufgeteilt und mit PMN Elastase-Proteinlösung mit einer Konzentration von 300 ng/mL PMN-Elastase, gelöst in Inkubationspuffer des Herstellers, bedeckt wurden. Zur Kontrolle des Versuchs wurde eine Kavität ohne Stanzling herangezogen. Es folgte die Inkubation der Wells für 24 h auf der Schüttelplatte, währenddessen die Wundauflagen die Elastase binden konnten. Anschließend wurden die Überstände auf ihre verbliebene PMN-Elastase Konzentration hin untersucht. Im Vergleich mit der anfangs eingesetzten PMN-Elastase Konzentration im Puffer lässt sich die Bindungsrate der einzelnen Wundauflagen für Elastase bestimmen.

Die Inkubation der Proben erfolgte analog zu den Schritten des MMP-2 ELISAs, wobei als Detektions-Antikörper ein Enzym-markierter anti-alpha PI-Antikörper (polyklonal, markiert mit Meerettichperoxidase) verwendet wurde. Nach Zufügen der TMB-Substratlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Horizontalschüttler bei 700 rpm und in Dunkelheit, wurde die Farbreaktion über 50 µL Stopplösung (2 M Salzsäure) beendet. Die Farbreaktion konnte so in den darauf folgenden 3 Stunden bei 450 nm im Reader gemessen werden. Die Referenzwellenlänge lag hier bei 630 nm, beziehungsweise 650 nm.

## Untersuchungen zur Inhibition freier Radikale

Pholasin ist ein Photoprotein des marinen Mollusken *Pholas dactylus*, das erst bei Anwesenheit von freien Radikalen zur Lumineszenz angeregt wird. Es erlaubt hochpräzise Analysen von kleinen Proben. Zur Überprüfung, inwiefern Alginatwundauflagen die Bildung freier Radikale in einer Wunde unterdrücken, wurde daher das Abel® Kit verwendet (Antioxidant Test Kit using Superoxide and other free radicals with Pholasin®, BMG LABTECH GmbH, Germany).

In die Vertiefungen einer 24-Well-Platte wurden dazu 8 mm Stanzlinge von bakteriellem Alginat-Vlies, bakteriellem Alginat-Vlies mit Silberzusatz AgPURE sowie einer Alginatwundauflage aus marinem Alginat mit und ohne Silberzusatz (Algosteril® und Silvercel®) gegeben. Anschließend wurden die Stanzlinge mit 50 µL Assaypuffer, 100 µL Pholasin und 200 µL Assaylösung A bedeckt und für 10 Minuten lichtgeschützt unter Aluminiumfolie inkubiert. Es wurden weitere 400 µL Assaypuffer A hinzu pipettiert. Nun wurde 50 µL Lösung B über den im Kit beigefügten Injektor zugeführt. Das Superoxidradikal bildet sich, sobald Lösung B zu Lösung A hinzugefügt wird. Von den Überständen wurden je 400 µL pipettiert und in ein Luminometer überführt. Die Messung der Lumineszenz wurde mit dem Genios Reader der Firma Tecan durchgeführt. Als Referenz diente eine Kavität ohne Stanzling. Bei Anwesenheit von Antioxidantien in der Probe, die Superoxid abfangen können, konkurrieren diese mit Pholasin um Superoxid und es wird weniger Licht emittiert. Die antioxidative Aktivität verzögert also das Erscheinen des Lumineszenz-Peaks und reduziert die Lichtintensität (Peroxynitrit und Superoxid assay). Die antioxidative Kapazität der Wundauflagen-Proben wurde ausgedrückt als prozentuale Reduktion des Lumineszenzpeaks anhand der Formel:

([peak, control]-[peak, sample]) x IOO/ (peak, control).

## 2.2.3. Mikrobielle Untersuchungen

2.2.3.1.Shake Flask Test

Der Shake Flask Test ist ein im Prüflabor der Hohenstein Institute etablierter und akkreditierter Test nach Norm ASTM 2149E. Er dient der Bestimmung antimikrobieller Aktivität von Textilien, Polymeren oder von hydrophoben Materialien. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass im Gegensatz zu einem direkten Hemmversuch, hier die in vivo Bedingungen einer Wundauflage im Kontakt mit keimhaltigen Wundexsudat nachempfunden werden. So wird beim Shake Flask Versuch die zu prüfende Wundauflage in ein Keim-tragendes flüssiges Medium eingebracht, welches, ähnlich der Wundflüssigkeit, die Wundauflage umspült. Dabei kann die antimikrobielle Wirksamkeit der Wundauflage nicht nur anhand des Einschlusses von Keimen in die aufquellenden Fasern beurteilt werden, sondern auch durch Reduktion der Keimzahl, sofern sie die Keime nicht aufnimmt, sondern auch abtötet.

Zur Anzucht der Keime werden zunächst Übernachtkulturen mit je einer Kolonie von E.coli ATCC 25922 erstellt. Der Test auf E.coli stellt das Standardtestverfahren dar. Es ist allerdings möglich, den Test auch mit anderen Keimen abzuwandeln Die Kolonien der zu testenden Keime werden in 20 mL CASO-Bouillon eingerührt. Diese werden über Nacht bei 36° C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Anschließend wird eine log-Kultur mit 400 µL Übernachtungskultur in 20 mL CASO-Bouillon angesetzt. Die OD<sub>600</sub> (optische Dichte) sollte im Falle von *E.coli* ca. 1,0 erreichen. Zur Herstellung des Inokulums muss zunächst eine Vorverdünnung erfolgen. Dazu werden 1 mL der log-Kultur mit 5 mL CASO-Bouillon gemischt. Bei der Testung auf E.coli werden nun 2 mL der Vorverdünnung mit 400 mL Sörensenpuffer vermengt. Die Keimzahl im Inokulum sollte 1,5-3 x 10<sup>5</sup> KBE/ mL betragen. An diesen Vorgang schließt sich die Probenvorbereitung an. Dabei werden nicht antibakterielles Polyester (PES neg) und das Probenmaterial in Portionen von je  $1 \pm 0.1$  g unter UV-Bestrahlung über Nacht sterilisiert. Je Keim werden in 2 Erlenmeyerkolben je 1 g PES neg vorgelegt und in 3 Erlenmeyerkolben je 1 g des Probenmaterials. Die Proben werden mit jeweils 50 ± 0,5 mL Inokulum versetzt. Anschließend werden die Erlenmeyerkolben in einen Schüttler (SF1, Stuart, Staffordshire, UK) eingespannt und mit 700 osc/Min geschüttelt. Die Inkubationszeit beträgt 1 h $\pm$  5 Min. Für die Ermittlung des 24 h-Werts erfolgt die Oszillation bei 300 osc/Min.

Nach Inkubation am Schüttler erfolgt die Bestimmung der KBE (Kolonie-bildende Einheit). Dabei wird der 0 h-Wert sofort nach Inokulumzugabe und kurzem, kräftigen Schütteln bestimmt. Dazu werden aus den beiden PES neg Erlenmeyerkolben je 5 mL entnommen und 50  $\mu$ L (d-Verdünnung) mittels eines Spiralplaters auf CASO-Agar plattiert. Es werden weitere Zehnerverdünnungen (-1 = 1:10, -2 = 1:100 und -3 = 1: 1000 der d-Verdünnung in NaCl- Röhrchen hergestellt. Jeweils 50 µL der d, -1, -2 Verdünnungen werden am Spiralplater auf CASO-Agar plattiert, von d wird zusätzlich 1 mL im Plattenguss mit 9 mL DEV-Agar angesetzt. Damit erhält man eine Nachweisgrenze von 1 KBE/ mL.

Die Berechnung der Keimreduktion durch die Proben erfolgt nach folgender Gleichung:

Reduktion 
$$[\%] = \left(\frac{B-A}{B}\right) x \ 100 \ \%$$

Wobei A= Probe [KBE/mL] nach 1 h sowie 24 h

B= PES neg [KBE/mL] nach 1 h sowie 24 h

Shake Flask Test mit P.aeruginosa

In Abwandlung von der Norm ASTM 2149 wurde der Shake Flask Test auch mit dem Keim *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Für die Testung der antimikrobiellen Aktivität der ausgewählten Wundauflagen auf *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine Übernachtkultur mit einer Kolonie *P.aeruginosa* DSM 939 in 20 mL CASO-Bouillon angesetzt und bei 36° C über Nacht im Schüttelbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Log-Kultur mit 400 µL der Übernachtkultur in 20 mL CASO-Bouillon angesetzt. Die OD<sub>600</sub> sollte beim Versuch mit *P.aeruginosa* DSM 939 0,7 erreichen. Die weitere Durchführung des Shake Flask Versuches auf *P.aeruginosa* erfolgte nach dem allgemeinen o.g. Protokoll des Shake Flask Test für *E.coli*.

## Shake Flask Test mit MRSA

Analog zum Shake Flask Test der Wundauflagen mit *P.aeruginosa* wurde der Test auch mit *Methicillin resistenten Staphylococcus aureus* (*MRSA*)-Keimen durchgeführt. Für die entsprechende Übernachkultur wurde hierzu eine Kolonie von *MRSA* DSM 11729 in 20 mL CASO-Bouillon eingerührt und bei 36° C inkubiert. Die Log-Kultur wurde mit 400 µL der Übernachtkultur und 20 mL CASO-Bouillon angesetzt. Die OD<sub>600</sub> sollte beim Shake Flask mit *MRSA* DSM 11729 bei 1,5 liegen. Der weitere Versuchsaufbau erfolgte anhand des oben aufgeführten Protokolls.

### 2.2.3.2. Bindungsversuche mit mCherry-exprimierenden E.coli

Bei mCherry handelt es sich um ein Reportergen, das nach Expression über Vektoren in kompetenten Zellen unter spezifischen Promotoren rot, grün oder gelb fluoresziert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop liegt das Exzitationsmaximum bei 587 nm, das Emissionsmaximum bei 610 nm. Das Reportergen ist gut geeignet, gram negative Bakterien wie beispielsweise *E.coli* für die Fluoreszenz zu markieren. Für die Untersuchungen mit mCherry *E.coli* konnte auf entsprechende Stämme des Labors zurückgriffen werden. Im Kurzen wurde hierbei der Vektor mCherry der Firma Clontech (Moutain View, USA) in - über Elektroporation kompetente Zellen von *E.coli* (E.coli DH10B) - eingebracht. Der Promotor war PCMV/IE (human cytomegalievirus immediate early promotor).

Aus der Stammsammlung wurden Zellen von mCherry *E.coli* auf Ampicillin Nährböden ausgestrichen und für 24 h bei 36° C inkubiert. Der Vektor enthält eine Ampicillin Resistenz, sodass mCherry exprimierende Zellen selektiert werden können. Nach dem Ausstrich wurde eine rote Kolonie auf der Agarplatte ausgewählt, da diese eine *E.coli* Kolonie darstellt, die mCherry exprimiert (siehe Abb. 7). Anschließend wurden 9 mL CASO-Bouillon mit 100 µg/ mL Ampicillin mit einer roten Kolonie beimpft und bis zu einer hohen Bakteriendichte bei 36° C kultiviert, bis zur vollständigen Trübung (qualitative Bestimmung).



Abb. 7: Ausstrich von E.coli mCherry. Man erkennt den roten Phänotyp einzelner Kolonien

Für den Bindungsversuch wurden bakterielle Alginatwundauflagen in 15 g große Stücke zerschnitten und beidseitig über UV-Strahlung sterilisiert. Anschließend wurden die etwa 0,4 g schweren Vliese in 50 mL Röhrchen überführt und mit 200 μL Bakteriensuspension besiedelt. Die Wundauflagen wurden erneut für 18 h bei 36° C inkubiert und anschließend die Bakterien mit 10 mL 0,2% Tween 0,85% NaCl von den Vliesen durch Schütteln im Vortex eluiert. Um in den Fasern eingeschlossene, nach Elution verbliebene Bakterien zu detektieren, wurden Vliesrückstande bzw. Einzelfasern entnommen, auf einen Glas-Objektträger aufgebracht und zuletzt unter einem Fluoreszenzmikroskop IX-70 (Olympus, Deutschland) betrachtet. Die Aufnahmen der fluoreszierenden Vliese erfolgten mit 200-facher Vergrößerung.

### 2.2.3.3. Statistik

In der vorliegenden Dissertation fokussierte ich mich zunächst auf Experimente zur Umsetzung und Charakterisierung des Rohstoffs bakterielles Alginat in anwendungsnahe Produkte, die mit kommerziellen Wundauflagen im Aufbau vergleichbar waren. Erst gegen Ende der Promotion wurden in vitro Experimente etabliert, um die Bindungsfähigkeit gegenüber Entzündungsmediatoren aller Muster zu vergleichen. Diese Tests wurden im Triplikat durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt. Beim Erstellen der Grafiken zeigte sich - trotz deutlichen Unterschieden zwischen den Mustern-, dass bei einzelnen Ansätzen (wie z.B. die IL-8 Bestimmung Abb. 16 - und hier lediglich bei Muster Algosteril) die Standardabweichung auffallend hoch ausfiel. Um verlässliche Aussagen über die Signifikanz der Werte treffen zu können, müssten daher die Versuche in höherer Fallzahl wiederholt werden, so dass in der vorliegenden Arbeit auf eine Statistik verzichtet wurde und der Schwerpunkt auf die Entwicklung erster vergleichbarer Wundauflagen aus bakteriellem Alginat und die Umsetzung der ersten in vitro Versuche der Bindungsfähigkeit der genannten Inflammationsmediatoren gelegt wurde.

Die Werte wurden nach der Einreichung der vorliegenden Arbeit nochmals per unabhängiger Doppelanalyse mit 2 weiteren Untersuchern wiederholt, was die Reliabilität insgesamt deutlich erhöhte, jedoch keinen Eingang mehr in die Dissertation fand. Bei diesen Ergebnissen zeigte sich nach den statistischen Tests ein signifikanter Unterschied, so dass diese in der finalen Publikation veröffentlicht wurden.

## 3. Ergebnisse

Teile dieser Ergebnisse wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht: Hoefer, D., Schnepf, J.K., Hammer, T.R., Fischer, M., Marquardt, C. 2015. Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of materials science. Materials in medicine* 26, 162

### 3.1. Ergebnisse der biotechnologischen Herstellung von Alginatwundauflagen

## 3.1.1. Voruntersuchungen: Kultivierung von *Azotobacter vinelandii* und bakterielle Alginatisolation

Vorausgegangene Versuche des AlBioTex-Projekts an den Hohenstein Instituten hatten zur Aufgabe, Alginat über biotechnologische Methoden aus *Azotobacter vinelandii* zu gewinnen und die Kultivierung und Ausbeute von Alginat zu optimieren. Bevor das auf diese Weise gewonnene bakterielle Alginat im Rahmen dieser Promotion anschließend zu Fasern und zu Vliesen verarbeitet werden konnte, musste es zunächst genauer chemisch charakterisiert werden. Anschließend wurden die Fasern für Quellungs- sowie Bindungsversuche mit Entzündungsmediatoren und Keimen zu Wundauflagen-Vliesen verarbeitet.

### 3.1.2. Chemische Charakterisierung bakteriellen Alginats

Das isolierte bakterielle Alginat wurde vor der weiteren Verarbeitung zu Fasern hinsichtlich des Acetylierungsgrads und des Verhältnis von Mannuron- und Guluronsäure näher untersucht. Als Vergleich diente das Alginat aus mariner Quelle mit hohem Mannuronsäure-Anteil. Dazu wurde von beiden Proben eine Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) vom Department of Biotechnology der Norwegian University of Science and Technology (Trondheim, Norwegen) durchgeführt. Wie Tabelle 1 zeigt, weist das Alginat aus mariner Quelle keine Acetylierung auf, wohingegen das bakterielle Alginat aus *Azotobacter vinelandii* - abhängig von der Art der Kultivierung - einen Acetylierungsgrad von 29 % bzw. von 59 % aufweist. So ließ sich bei dem bakteriellem Alginat, welches aus *Azotobacter vinelandii* gewonnen wurde, der in Burks Flüssigmedium inkubiert wurde, ein Acetylierungsgrad von 29 % bestimmen. Wurde jedoch Alginat aus *Azotobacter vinelandii* 

gewonnen, der auf Agarplatten angezüchtet wurde, stieg der Acetylierungsgrad auf 59 % an. Mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie konnten weiterhin die Anteile an Mannuron (M)- und Guluronsäure (G) der beiden Alginate bestimmt werden. Hier wies bakterielles Alginat ein M:G Verhältnis von 60:40 auf, wohingegen bei marinem Alginat der Wert bei 65:35 lag. Offenbar wies auch das bakterielle Alginat aus *Azotobacter vinelandii* einen vergleichsweise hohen Anteil an Mannuronsäure auf. Des Weiteren wurde mittels Gelpermeationschromatographie die molare Masse beider Alginate bestimmt. Diese Untersuchung wurde vom PSS Polymer Standards Service GmbH durchgeführt (Mainz, Deutschland). Bakterielles Alginat weist darin mit 3,420,000 Da die dreifache molare Masse von marinem Alginat mit 1,100,000 Da auf.

Tab. 1: Vergleich des Aceylierungsgrades, der molaren Masse und des M:G Verhältnisses von bakteriellem und marinen Alginat. Man erkennt, dass lediglich das bakterielle Alginat acetyliert ist. Zudem weist bakterielles Alginat eine deutlich höhere molare Masse und einen höheren Guluronsäure-Anteil auf als die marine Alginat-Probe.

	Acetylierung	<b>Molare Masse</b>	M:G Verhältnis
Bakterielles Alginat	29% / 59%	3,420,000 Da	60:40
<b>Marines</b> Alginat	0%	1,100,000 Da	65:35

## 3.1.3. Faserherstellung

Nach den oben beschriebenen Versuchen stand ausreichend bakterielles Alginat zur Verfügung, welches nun im Nassspinnverfahren zu Fasern verarbeitet werden konnte (siehe Abb. 8). Dazu wurde Alginat-Spinnlösung mittels einer peristaltischen Pumpe über ein Schlauchsystem in ein 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Fällbad geleitet. Durch einen Ionenaustausch zwischen den Calciumionen des Fällbads in die Guluronblöcke des Alginats kam es zum Ausfällen des Alginats. Aufgrund des Versuchsaufbaus einer Spinnstrecke mit sofortiger Faserverstreckung, fällte das Alginat in Faserform aus. Die Faserverstreckung der Alginatfasern aus dem Fällbad erfolgte über Rotorverfahren mit Hilfe eines Rotors. Die auf der Rotorspindel aufgenommenen Fasern wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.



Abb. 8: A: Versuchsaufbau des Nassspinnverfahrens; 1: Stativ mit Einmalspritze 2: Pumpe 3: CaCl<sub>2</sub>-Fällbad 4: Rotor. B: Man erkennt die im Fällbad entstehenden Fasern, welche vom Rotor aufgenommen werden

## 3.1.4. Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Alginatfasern

Die gewonnenen und getrockneten Alginatfasern wurden anschließend mit Platinpartikeln im Sputter Coater bestaubt und unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) mit 450facher Vergrößerung betrachtet. Abb. 9 zeigt den ultrastrukturellen Vergleich einer marinen und einer bakteriellen Alginatfaser, welche jeweils im Nassspinnverfahren hergestellt wurden. Trotz identischem Versuchsaufbau bei der Faserherstellung erwiesen sich die Fasern aus marinem Alginat stets als erheblich dicker als die korrespondierenden bakteriellen Varianten: Die marinen Fasern wiesen im Mittel einen Faserdurchschnitt von etwa 50 µm auf, wohingegen die bakteriellen Alginatfasern im Mittel einen Durchschnitt von 25 µm zeigten. Zudem ließ sich anhand der REM-Aufnahmen ein Unterschied der Fasern hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit feststellen. So zeigte sich die Oberfläche der marinen Alginatfaser einheitlich granuliert, die bakterielle Faser jedoch erschien deutlich grober granuliert. Zudem wies die bakterielle Faser intermittierende Abschnitte mit glatter, nicht granulierter Oberfläche auf.



Abb. 9: REM-Aufnahmen einer marinen Alginatfaser (rechts) und einer bakteriellen Alginatfaser (links), gewonnen per Nassspinnverfahren bei 50 rpm Rollgeschwindigkeit. Der Unterschied der Faserdicke und der Oberflächenbeschaffenheit der Fasern (Granulierung) wird hier deutlich. [37]

Neben unbehandelten marinen und bakteriellen Alginatfasern wurde auch eine mit AgPURE ausgerüstete Faser aus bakteriellem Alginat ultrastrukturell im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Abb. 10 zeigt die Aufnahme einer solchen AgPURE-Alginatfaser bei 1500-facher Vergrößerung. Man erkennt Aggregate von AgPURE-Nanosilberpartikeln, welche der bakteriellen Alginatspinnlösung beigesetzt wurden.



Abb. 10: REM-Aufnahme einer AgPURE-Alginat Faser. Aggregate von AgPURE Partikeln auf der bakteriellen Alginatfaser sind deutlich sichtbar.

### 3.1.5. Herstellung von Alginatvliesen

Um kommerzielle Wundauflagen aus marinem Alginat mit Prototypen von Wundauflagen aus bakteriellem Alginat vergleichen zu können, wurden bakterielle Alginatfasern zu Vliesen (sogenannten Nonwovens) verarbeitet. Versuche, die getrockneten Alginatfasern über ein konventionelles Nadelvliesverfahren im getrockneten Zustand zu Vliesen zu verarbeiten, scheiterten; die Vernetzung der Alginatfasern kam nicht zu Stande. Daher wurde ein eigenes Verfahren mit Hilfe einer Filternutsche entwickelt. Hierbei wurden die getrockneten Alginatfasern in etwa 1 cm lange Stücke geschnitten und in destilliertem Wasser geschwenkt. Dadurch durchmischten sich die kurzen Alginatfaserstücke. Anschließend wurde die Suspension in eine Filternutsche dekantiert, das Wasser mit Hilfe einer Vakuumpumpe entfernt und die nassen Alginatvliese in 6,5 cm große Schalen zum Trocknen gegeben. Abbildung 11 zeigt ein solches Alginatvlies im trocknen Zustand. Mit Hilfe dieses Verfahrens wiesen die Alginatvliese eine ähnliche Feinstruktur auf wie die kommerziellen marinen Alginatwundauflagen, was die Vergleichsversuche hinsichtlich Absorptionsvermögens, Zytokineinfluss und antimikrobieller Wirksamkeit ermöglichte.



Abb.11: Getrocknetes Faservlies aus bakteriellen Alginatfasern

## 3.1.6. Quellversuche mit Absorptionsvergleich

Wundauflagen aus Alginat zeichnen sich generell durch ein gutes Quellverhalten aus, welches in der klinischen Praxis dazu führt, dass sie bei exsudierenden Wunden die übermäßig anfallende Wundflüssigkeit aufnehmen können. Um das Absorptionsvermögen der bakteriellen Alginatvliese mit dem kommerzieller Wundauflagen aus marinem Alginat zu vergleichen, wurden Quellversuche analog zu der Methode durchgeführt, welche in der British Pharmacopoeia beschrieben wurde.

Getestet wurde das Absorptionsvermögen von Vliesproben aus bakteriellem Alginat und der Referenzprobe aus M-reichen Alginat mariner Quelle. Als kommerzielle marine Proben dienten Algosteril®, DracoAlgin, Kaltostat®, Biatain®, Tegaderm<sup>™</sup> sowie Cutimed®. Zunächst wurden die Proben in 6,25 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und deren Trockengewicht ermittelt (A: Areal; W1: Trockengewicht von A). Diese wurden in flachen Petrischalen platziert und mit der 40-fachen Menge an Lösung A überdeckt. Die Vliese wurden für 30 Min bei 37° C inkubiert und anschließend vom Rand der Petrischale aufgenommen, damit nicht durch Quellung aufgenommene Lösung A abstreifen konnte. Bevor das Nassgewicht (W2) ermittelt wurde, wurden die Vliese für 30 Sekunden gehalten, um abtropfen zu können. Die Absorption, welche als das durchschnittliche Gewicht der aufgenommenen Menge an Lösung A auf 100 cm<sup>2</sup> definiert ist, wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$Absorption = \left\{\frac{W2 - W1}{A}\right\} x100$$

Abbildung 12 zeigt eine Übersicht über die Absorptionskapazitäten der eingesetzten Wundauflagen gegenüber Lösung A. In diesen Untersuchungen nahmen Vliese aus bakteriellem Alginat überraschenderweise etwa die doppelte Menge an Lösung A auf, im Vergleich zu den kommerziellen Wundauflagen. Bakterielles Alginat nahm hierbei 50,627 g/100 cm<sup>2</sup> Lösung A auf, marines Alginat mit hohem M-Gehalt hingegen nur 27,766 g/100 cm<sup>2</sup>. Die geringste Menge an Lösung A mit 15,959 g/100 cm<sup>2</sup> fand sich in der Algosteril® Wundauflage. Die DracoAlgin Wundauflage absorbierte 21,410 g/100 cm<sup>2</sup> Lösung A und ist damit die kommerzielle Wundauflage mit der höchsten Absorptionskapazität. Kaltostat® nahm 19,139 g/100 cm<sup>2</sup> Lösung A auf, bei der Biatain® Wundauflage waren es 20,437 g/100 cm<sup>2</sup>. Tegaderm<sup>™</sup> und Cutimed® nahmen in etwa gleich viel Lösung A auf mit 19,388 g/100 cm<sup>2</sup> beziehungsweise 19,425 g/100 cm<sup>2</sup>.



Abb. 12: Vergleich bakterieller und mariner Alginatwundauflagen hinsichtlich ihres Absorptionsvermögens von Lösung A. Man erkennt, dass die bakterielle Alginatwundauflage mehr als die doppelte Menge Lösung A absorbiert als die marinen Alginatwundauflagen.

Neben dem quantitativen Absorptionsvermögen wurde das Quellverhalten der Wundauflagen in diesem Versuchsaufbau auch qualitativ mit Hilfe eines Stereomikroskops (SZX 12, Olympus Corp., Tokio, Japan) bestimmt. Abb. 13 zeigt die Übersichtsaufnahmen der Wundauflagen vor und nach der Immersion in Lösung A. Dabei konnte beobachtet werden, dass die bakterielle Wundauflage sowie die Wundauflage aus M-reichem marinen Alginat (A und B) bei Kontakt mit Lösung A gelierten, was mit einem Verlust der ursprünglichen Form der Vliese und der Faserstruktur einherging. Die Wundauflagen aus marinem Alginat jedoch (C und D) behielten ihre ursprüngliche Form weitestgehend bei. Zudem waren nach Kontakt mit Lösung A noch einzelne Fasern der Wundauflagen erkennbar.



Abb. 13: Stereoskopische Aufnahmen von Vliesproben aus Wundauflagen vor (links) und nach (rechts) Platzierung in Lösung A. A: Bakterielles Alginat, B: M-Alginat, C: DracoAlgin, D: Biatain® Alginat [37]

In einem weiterführenden Versuch wurde der Versuchsstand der Britischen Pharmakopoe [8] abgewandelt und untersucht, inwiefern die Wundauflagen bei der Flüssigkeitsaufnahme von humanem Wundexsudat im Stande sind, ihre ursprüngliche Form und Stärke beizubehalten. Damit sollte eine potenzielle klinische Verwendung der bakteriellen Wundauflagen beurteilt werden, z.B. ein Ablösen beim Verbandswechsel. Getestet wurden wiederum im Vergleich das bakterielle Alginatvlies sowie Wundauflagen aus marinem Alginat. Dazu wurden die Proben in 2,25 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten, in Petrischalen platziert und nun zentral mit je 200 µL von gesammeltem humanem Wundexsudat versehen. Nach 24 h wurden die Proben mit je zwei Zangen an gegenüberliegenden Kanten gegriffen und vorsichtig auseinander gezogen. Auf diese Weise wurde ihr Zusammenhalt in 5 Kategorien nach den Vorgaben von Terrill [97] beurteilt.

Hierbei zeigte ich, dass das bakterielle Vlies mit den Pinzetten auseinandergerissen werden konnte. Daher wurde es nach Terrill in die Kategorie 3 eingestuft, was einem moderaten Verlust von Form und Integrität entspricht. Tegaderm<sup>™</sup>-, Algosteril®- und Biatain®-Wundauflagen wiesen ebenfalls einen moderaten Verlust auf (Terrill: Kategorie 3). Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Kaltostat®-, DracoAlgin- und Cutimed®-Wundauflagen als stabiler; sie konnten nicht mit Pinzetten auseinander gerissen werden und wurden deshalb nach Terrill klassifiziert in Kategorie 4 (Milder Verlust von Form und Integrität).

## 3.2. Untersuchungen zur Zytokinbindung von Alginatwundauflagen

Für den Vergleich der Zytokinbindung durch Wundauflagen wurde ein Versuchsaufbau gewählt, den bereits Wiegand verwendete [107]. Daher wurden Stanzlinge der Wundauflagenvliese aus bakteriellem und marinen Alginaten mit definierten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren inkubiert und der Zytokingehalt im Überstand als nicht gebundener Anteil per indirektem Sandwich-Immunassay ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse des ELISA auf Zytokinbindung sollten aufzeigen, in welchem Umfang bakterielle und marine Alginatwundauflagen Entzündungsmediatoren aus einem Puffer aufnehmen. Ebenso wurde untersucht, ob die Stanzlinge die Zytokine nach der Inkubation abbinden, oder durch Elution wieder freisetzen. Der Versuchsaufbau wurde so gewählt um folgendes klinisches Szenario zu simulieren: Zum einen sollte die 24 h Probe Rückschlüsse auf das spezifische Bindungsvermögen der verwendeten Alginatwundauflagen von Zytokinen aus Wundsekret ermöglichen; andererseits simuliert die Elutionsprobe die erneut freigesetzte Menge des Zytokins, wenn die Wundauflage beim Wundverbandswechsel z.B. durch Spülen von der Wundfläche abgelöst wird.

### **3.2.1.** Bindung von TNF-α

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des Immunassays für TNF-α. Im Kontrollansatz (ohne Stanzling) fand sich die ursprünglich eingesetzte Konzentration an TNF- $\alpha$ . Die Elutionsprobe zeigte keine Freisetzung des Entzündungsmediators. Offenbar kam es zu keiner Adhäsion an die Polystyrolplatte der Inkubationsplatte. Im Gegensatz dazu nahmen sowohl die in der Klinik eingesetzten Wundauflagen Silvercel® und Algosteril®, als auch die Prototypen der bakteriellen Wundauflagen (mit und ohne AgPURE) nach 24 h Inkubation nahezu die gesamte Menge an TNF- $\alpha$  des Versuchsansatzes auf oder absorbierten Interessanterweise gaben bakterielle Alginatvlies das und die marinen es. Alginatwundauflagen TNF- $\alpha$  nach 24 h Inkubation nach Elution in Elutionspuffer nicht wieder ab.

Es zeigte sich, dass die Wundauflage aus bakteriellem Alginat im Stande war, TNF- $\alpha$  fast vollständig aus dem Puffer aufzunehmen. Lediglich 0,300 pg/mL von ursprünglich 1 ng/ml

TNF- $\alpha$  verblieben nach der 24 h Inkubation im Überstand. Nach Elution und erneuter Inkubation für 1 h gab diese Probe nur 0,300 pg/mL frei. Auch die mit AgPURE dotierte bakterielle Alginatwundauflage nahm innerhalb von 24 h TNF- $\alpha$  fast vollständig aus dem TNF- $\alpha$ -Proteinansatz auf. Hier verblieben lediglich 0,281 pg/mL TNF- $\alpha$  im Überstand. Überraschenderweise gab die AgPURE Alginatwundauflage im Vergleich zur nichtdotierten bakteriellen Alginatwundauflage jedoch deutlich mehr TNF- $\alpha$  durch Elution frei (insgesamt 20,354 pg/mL), was für ein schlechteres Bindungsverhalten spricht.

Die Wundauflagen Silvercel® und Algosteril® aus marinem Alginat nahmen über 24 h nur unwesentlich weniger TNF- $\alpha$  auf als die Alginatwundauflagen aus bakterieller Quelle. Nach 24 h Inkubation der Silvercel®-Wundauflage ließen sich noch 2,146 pg/mL TNF- $\alpha$  im Überstand nachweisen, bei der Algosteril®-Wundauflage verblieben 1,854 pg/mL. In den Elutionsproben fanden sich bei beiden Wundauflagen aus marinen Alginat je 0,300 pg/mL TNF- $\alpha$ .



Abb. 14: Vergleich der TNF- $\alpha$  Bindung durch Wundauflagen aus Alginat nach 24 h Inkubation in TNF- $\alpha$  haltigem Puffer und nach Elution der Stanzlinge. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte von 3 Versuchsansätzen. Man erkennt dass die bakteriellen Alginate (bakt. Alginat und AgPURE) kaum TNF- $\alpha$  im Überstand hinterlassen, Silvercel® und Algosteril® binden etwas weniger TNF- $\alpha$ . AgPURE gibt als einzige Wundauflage nach Elution TNF- $\alpha$  frei.

## 3.2.2. Bindung von MMP-2

Ziel des ELISA auf die Matrix-Metalloproteinase 2 war der Nachweis, in welchem Umfang Alginatwundauflagen in der Lage sind, MMP-2 auf einem Puffer und damit analog zur klinischen Praxis, aus Wundsekret aufzunehmen. Weiterhin sollte untersucht werden, in 5000

4000

3000

2000

1000

0

Kontrolle

bakterielles

Alginat



welchem Maße die Wundauflagen durch Elution die zuvor gebundene Menge an MMP-2 wieder freisetzen.



AgPURE

Alginat

Silvercel®

Algosteril®

Abbildung 15 fasst die Ergebnisse des Immunassays für MMP-2 zusammen. Die Grafik zeigt, dass im Kontrollansatz (Inkubation des MMP-2-Proteinansatz ohne Stanzling in der Vertiefung einer 24-Well Polystyrolplatte) im Überstand 5000 pg/ml MMP-2 messbar war. Nach Spülen der Kavität setzte diese kein weiteres MMP-2 durch Elution frei: Es kam offenbar zu keiner Adhäsion des Zytokins an die Polystyrolvertiefung. Beim Vergleich der Wundauflagen aus bakteriellem und marinem Alginat zeigte sich, dass die bakteriellen Alginate (bakterielles Alginat und AgPURE Alginat) deutlich stärker das Zytokin aus dem Puffer aufzunehmen vermögen als die marinen Alginatwundauflagen Algosteril® und Silvercel®. Auch in diesem Assay nahm nach 24-stündiger Inkubation die Wundauflage aus bakteriellem Alginat mit der Nanosilberdotierung (AgPURE Alginat) von allen getesteten Stanzlingen den höchsten Gehalt an MMP-2 auf und weist folglich mit 0,300 pg/mL die geringste Konzentration an MMP-2 im Überstand auf. Interessanterweise gab sie - wie auch beim Immunassay mit TNF- $\alpha$  – das Zytokin am stärksten nach Elution ab. So fand sich in der Elutionsprobe mit 947,619 pg/mL von allen Wundauflagen die größte Menge an MMP-2, ein Indiz für eine nicht affine Bindung. Im Vergleich dazu nimmt die Wundauflage aus

□Zytokin im

Überstand Elutionsprobe bakteriellem Alginat bei der 24 h Inkubation mit 177,143 pg/mL weniger MMP-2 auf. Dagegen gibt sie die gebundene Menge MMP-2 auch durch Elution kaum wieder frei, da in der Elutionsprobe noch 0,300 pg/mL MMP-2 nachweisbar war. Die Silvercel®-Wundauflage band im Vergleich zu den bakteriellen Alginatvliesen mit 3060,00 pg/mL Konzentration im Überstand über 24 h deutlich weniger MMP-2. Offenbar bindet sie dieses recht fest, denn nach Elution setzt sie nur 0,300 pg/mL, des zuvor gebundenen MMP-2 wieder frei. Im Gegensatz dazu band die Algosteril®-Wundauflage mit durchschnittlich 5057,619 pg/mL MMP-2 im Überstand am wenigsten MMP-2 von allen getesteten Wundauflagen. Auch nach Elution gab sie mit 652,381 pg/mL eine deutliche Menge an MMP-2 ab.

### 3.2.3. Bindung von Interleukin 8 / IL-8

Analog zu den bisherigen Assays diente der IL-8 ELISA dem Nachweis der Bindungsfähigkeit der Wundauflagen aus marinen und bakteriellen Alginaten für den Entzündungsmediator IL-8. Versuchsaufbau, Zytokininkubation und Elution aus den Stanzlingen waren analog zu den Messungen für MMP-2 und TNF-α.



Abb. 16: Vergleich der IL-8 Bindung durch Wundauflagen aus Alginat. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte der IL-8 Konzentration im Überstand nach 24 h Zytokininkubation sowie nach Elution der Stanzlinge. Man erkennt, dass bei allen Wundauflagen nur wenig IL-8 im Überstand verbleibt. Algosteril® bindet von allen Wundauflagen am wenigsten IL-8 und gibt durch Elution die größte Menge an IL-8 frei. Die bakteriellen Alginatwundauflagen setzen nach Elution kein IL-8 frei.

Es wurden in der Kontrolle nach 24 h Inkubation 100 pg/ml Interleukin-8 im Überstand gemessen. Von der in der Zytokin-Inkubation eingesetzten Interleukinkonzentration adhärierte an die Wandung der Polystyrolvertiefung keine signifikante Menge des Zytokins

(Kontrolle-Elutionsprobe). Ein Vergleich der Bindung durch Wundauflagen aus bakterieller und mariner Quelle zeigt, dass die bakteriell gewonnenen Alginate (bakterielles Alginat und AgPURE Alginat) unter 24-stündiger Inkubation nur marginal mehr IL-8 aus dem Zytokinmix banden oder aufnahmen und offenbar auch weniger des Mediators nach Elution freisetzten, als die marinen Wundauflagen Silvercel® und Algosteril® (siehe Abb. 16). Statistisch ist dies allerdings nicht signifikant, denn die gemessenen Werte liegen in diesem Ansatz innerhalb der Fehlerabweichungen. Im Einzelnen band das bakterielle Alginatvlies mit einer verbliebenen IL-8 Konzentration von 3,350 pg/mL im Überstand weniger IL-8 aus dem Puffer als AgPURE Alginat, bei welchem die IL-8 Konzentration im Puffer nach Inkubation bei 1,100 pg/mL lag. Beide bakteriell gewonnenen Alginatwundauflagen setzten nach Elution mit je 0,300 pg/mL IL-8 nur unwesentlich IL-8 wieder frei. Die Silvercel®-Wundauflage band mit einer Restkonzentration von 0,625 pg/mL IL-8 im Überstand mehr IL-8 unter 24-stündiger Inkubation als die Wundauflagen aus bakteriellem Alginat. Allerdings gab die Silvercel®-Probe nach Elution im Vergleich zu den Wundauflagen mit bakteriellem Alginat mit 4,513 pg/mL mehr IL-8 frei. Die Algosteril®-Wundauflage band von allen eingesetzten Wundauflagen am wenigsten IL-8 während der Zytokininkubation, denn der Überstand wies nach 24 h noch 9,850 pg/mL an IL-8 auf. Nach Elution der Algosteril®-Wundauflage gab sie mit 31,850 pg/mL an IL-8 von allen Wundauflagen am meisten des Zytokins wieder frei. Sie nahm offenbar am wenigsten des Zytokins auf und konnte es auch im Vergleich zu den anderen Stanzlingen weniger adhärieren.

### 3.2.4. Bindung von PMN Elastase

Analog zu den bisherigen Assays diente der Immunassay für Polymorphonuklear-Elastase PMN dem Nachweis der Bindungsfähigkeit der Wundauflagen aus marinen und bakteriellen Alginaten für das Wundenzym PMN Elastase. Auch der Versuchsaufbau, Zytokininkubation und Elution aus den Stanzlingen waren analog zu den Tests für MMP-2 und TNF-α, bzw. IL-8.



Abb. 17: Vergleich der Bindung von PMN Elastase durch Wundauflagen aus Alginat. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte der Konzentration des Enzyms im Überstand nach 24 h Zytokininkubation sowie nach Elution der Stanzlinge. Man erkennt, dass bei den bakteriellen Wundauflagen deutlich weniger PNM Elastase im Überstand verbleibt als bei den marinen Varianten. Alle Wundauflagen geben in etwa dieselbe Menge an PNM Elastase durch Elution wieder frei.

Der Kontrollansatz des Immunassays zeigte, dass offenbar eine geringe Menge an PMN Elastase an der Polystyrolvertiefung adhärierte: Hier zeigte die Elutionsprobe eine Restmenge von 18 ng/ml PMN, die durch Elution aus den leeren Vertiefungen in Kontrollansätzen eluiert werden konnte.

Der Vergleich der Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit den in der Klinik eingesetzten Wundauflagen aus marinem Biopolymer zeigte, dass die beiden bakteriellen Alginatvliese deutlich mehr PNM Elastase nach 24-stündiger Inkubation banden oder aufnahmen, als die marinen Alginatwundauflagen (vgl. Abb. 17). Interessanterweise waren diese offenbar nicht in der Lage, diesen Wundmodulator an sich zu binden oder aufzunehmen. Alle eingesetzten Stanzlinge gaben nach der Elution PNM Elastase ab, allerdings in vergleichbarer Konzentration (etwa 10-20 pg/ml). Es ist aber durchaus möglich, dass es sich dabei auch um Elution von an der Kavität adhäriertem PMN handelte. Die Wundauflage aus bakteriellem Alginat band mit einem Restgehalt von PNM Elastase im Überstand von 21,23 pg/mL von allen Wundauflagen am die größte Menge an PNM Elastase. Zwar gab sie nach Elution mit einer Konzentration von 29,10 pg/mL wieder etwas der zuvor gebundenen PNM Elastase ab, doch es kann vermutet werden, dass die eingesetzte Menge an PMN Elastase noch in den Stanzlingen gebunden blieb. Die Wundauflage mit AgPURE und bakteriellem Alginat, nahm mit 47,98 pg/mL PNM Elastase im Überstand PNM Elastase über 24 h etwas weniger auf, als die Referenz-Wundauflage aus bakteriellem Alginat. Dennoch übertraf sie an Bindung die Wundauflagen aus marinem Alginat. Die AgPURE Alginatwundauflage setzte nach Elution 34,74 pg/mL PNM Elastase frei. Im Gegensatz zu den bakteriellen Alginatvliesen nahmen die Wundauflagen Silvercel® und Algosteril® deutlich weniger PNM Elastase aus dem Zytokinansatz auf. Dabei band die Silvercel®-Wundauflage mit einer verbliebenen Konzentration von 221,18 pg/mL im Überstand noch etwas mehr PNM Elastase während der 24 h-Inkubation als die Algosteril®-Wundauflage, welche eine Konzentration von 281,89 pg/mL PNM Elastase im Überstand aufwies. Dagegen gab die Silvercel®-Wundauflage durch Elution etwas mehr an PNM Elastase ab als die Algosteril®-Wundauflage. Hier fand sich in der Elutionsprobe eine PNM Elastase-Konzentration von 39,58 pg/mL, während sich bei der Algosteril®-Wundauflage 28,11 pg/mL in der Elutionsprobe nachweisen ließen.

## 3.3. Untersuchungen zur Inhibition freier Radikale durch Wundauflagen

Freie Radikale (ROS), welche in Wunden gebildet werden, tragen zu einer verzögerten Wundheilung bei [90]. Mittels des Abel® Antioxidant Test Kit (using Superoxide and other free radicals with Pholasin®- Kit) wurde die Hemmung der Bildung freier Radikale in Anwesenheit der Wundauflagenproben aus marinem und bakteriellem Alginat gemessen.



Abb. 18: Inhibitionsversuche der kommerziellen Wundauflagen Algosteril® und Silvercel® im Vergleich zu Wundauflagen aus bakterieller Quelle. Die Grafik zeigt die Hemmung der Bildung freier Radikale bei Anwesenheit von Stanzlingen der Proben. Es wird deutlich, dass die bakteriellen Wundauflagen und Silvercel® zwischen 80-100 % die Bildung von ROS hemmen, Algosteril® jedoch hemmt die ROS-Bildung deutlich weniger. AgPURE hemmt, unabhängig der eingesetzten Größe der Stanzlinge, die ROS-Bildung zu 100 %.

Abb. 18 zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe. In diesem Ansatz wurden unterschiedliche Größen der Stanzlinge miteinander verglichen und zwar 0,1 cm<sup>2</sup>, 0,2 cm<sup>2</sup> und 0,4 cm<sup>2</sup>.

Erwartungsgemäß unterdrückte die Negativkontrolle (keine Stanzlinge im Ansatz) die Bildung freier Radikale nicht. Im Gegensatz dazu inhibierten Wundauflagen aus bakteriellem Alginat bei einer Größe von 0,1 cm<sup>2</sup> bereits 84,63 % der Bildung freier Radikale (ROS). Bei 0,2 cm<sup>2</sup> Größe betrug die Hemmung bereits 85,71 % und bei 0,4 cm<sup>2</sup> 93,29 %. Mit zunehmender Größe steigt folglich die Hemmung der ROS-Bildung durch die Wundauflage aus bakteriellem Alginat. Die maximale Hemmung erreichte überraschenderweise die mit Nanosilber versetzte Wundauflage aus bakteriellem Alginat und AgPURE, bei welcher, unabhängig von der Größe, die Inhibition der ROS-Bildung stets bei 100 % lag. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden nun die in der Klinik eingesetzten Wundauflagen verglichen. Ausgewählt wurden Algosteril® und Silvercel®. Im Gegensatz zu Wundauflagen aus bakteriellem Alginat (ohne Silberzusatz) hemmten die Wundauflagen aus marinem Alginat die freie Radikalbildung deutlich weniger. Bei 0,1 cm<sup>2</sup> Größe des Zuschnitts hemmte sie lediglich 4,03 %. Bei einer Größe von 0,2 cm<sup>2</sup> wurden 12,36 % der freien Radikale inhibiert und mit 0,4 cm<sup>2</sup> Wundauflage wurde die ROS-Bildung um lediglich 31.40 % gehemmt. Die korrespondierende Probe aus marinem Alginat mit dem Silberzusatz verbesserte die Hemmwirkung der ROS-Bildung deutlich. So lag die Inhibition bei 0,1 cm<sup>2</sup> Zuschnitt bei 87,60 %, und bei einer Größe von 0,2 cm<sup>2</sup> bei 90,53 %. Mit 0,4 cm<sup>2</sup> Größe der Stanzlinge wurde die Bildung freier Radikale um 91,62 % gehemmt.

# 3.4. Untersuchung der Keiminaktivierung mittels Shake Flask Test mit *P.aeruginosa*

Der Shake Flask Test ist ein Test nach Norm ASTM E2149 (Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions). Diese Norm kann genutzt werden um die antimikrobiellen Eigenschaften von Wundauflagen zu testen. Für diesen Versuchsansatz wurden die Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit und ohne AgPURE zuvor UV-sterilisiert und in einem *P.aeruginosa*-tragenden Flüssigmedium unter Schütteln inkubiert. Proben aus diesen Ansätzen wurden dann nach 0h, 1h und 24h auf Agarplatten übertragen und die KBE ausgewertet. Die Berechnung der bakteriellen Reduktion erfolgte anhand der Werte der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter der jeweiligen Probe und der Negativkontrolle (PES neg.) mittels der Gleichung:

Reduktion  $[\%] = ((B-A) / B) \times 100 \%$ 



Abb. 19: Ergebnis des Shake Flask Tests nach ASTM E2149 mit dem Vergleich der antibakteriellen Aktivität der Wundauflagen aus bakteriellem Alginat sowie dotiert mit AgPURE. Die Grafik zeigt das bakterielle Wachstum auf den Proben nach 0 h, 1 h und 18 h. Man erkennt, dass beide bakteriellen Alginate das Keimwachstum hemmen, der Effekt erscheint jedoch bei der AgPURE Wundauflage ausgeprägter als beim undotierten bakteriellen Alginat.

Abbildung 19 zeigt, dass auf der Negativkontrolle aus nicht antibakteriellem Polyester (PES neg.) über den Versuchszeitraum von 0 h, 1 h und 24 h ein stetiger Zuwachs an *P.aeruginosa*, und damit ein leichtes bakterielles Wachstum stattfand. Der Ausgangswert bei 0 h stieg von 4,87 log Kolonie-bildenden Einheiten (KBE), nach 1 h auf einen Wert von 5,19 log KBE, und endete nach 18-stündiger Inkubation schließlich bei 5,78 log KBE. Bei der Positivkontrolle, einem Material aus Polyester mit Silberzusatz (PES pos), ging das bakterielle Wachstum zunächst nach 1 h Inkubation erwartungsgemäß zurück auf 4,06 log KBE. Allerdings stieg die bakterielle Wachstumsrate nach 18-stündiger Inkubation mit 4.84 log KBE wieder fast auf den Ausgangswert des Inokulums. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Proben mit bakteriellem Alginaten eine stärkere Abnahme des Bakterienwachstums im Verlauf der Inkubationszeit. Bei dem bakteriellen Alginatvlies nahm das Wachstum von P.aeruginosa innerhalb einer Stunde um 1,43 log KBE auf 3,44 log KBE ab. Selbst ohne antibakteriellen Zusatz war bei dieser Probe nach 18 h mit 0,00 log KBE kein Bakterienwachstum mehr nachweisbar. Auch bei der Wundauflage mit AgPURE und bakteriellem Alginat ging das Bakterienwachstum in der ersten Stunde zurück, und zwar stärker als beim bakteriellen Alginatylies ohne Nanosilber. Hier verringerte sich die KBE von 4,87 log KBE (0 h) auf 2,55 log KBE (1 h) um 2,32 log-Stufen. Nach 18 h Inkubation war auch in diesem Ansatz kein Bakterienwachstum mehr vorhanden.



Abb. 20: Bakterielle Reduktion der Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit und ohne AgPURE gegenüber *P.aeruginosa*. Man erkennt, dass die bakterielle Alginatwundauflage annähernd, die AgPURE Wundauflage zu 100 % das bakterielle Wachstum hemmt.

Errechnet man aus diesen Daten den prozentualen Grad [%] der bakteriellen Reduktion durch die Prüflinge, so zeigt sich, dass durch die Positivkontrolle aus PES nach 1 h Inkubation das bakterielle Wachstum um 92,51 % reduziert wurde (siehe Abb. 20). Nach 18-stündiger Inkubation jedoch liegt die Reduktion gegenüber der Ausgangkonzentration von 5 KBE/ml nur noch bei 88,51 %. Dies zeigt den bereits oben beschriebenen Effekt, dass bei der PES-pos.-Kontrolle das bakterielle Wachstum erst abnimmt und in der langfristigen Inkubation jedoch wieder zunimmt. Bei den Wundauflagen aus bakteriellem Alginat zeigte sich nach 1 h Inkubation das bakterielle Wachstum bereits um 98,21 % verringert. Nach 18 h Shake Flask Inkubation wurde in dieser Probe eine 100 prozentige Wachstumsreduktion erreicht.

### 3.5. Untersuchung der Keiminaktivierung mittels Shake Flask Test mit MRSA

Der Shake Flask Test wurde in Abwandlung der Norm ASTM E2149 zusätzlich mit dem Hospitalismuserreger *MRSA* durchgeführt, um die antimikrobiellen Eigenschaften der Wundauflagen aus bakteriellem Alginat gegenüber diesem Erreger untereinander zu vergleichen. Dazu wurden zuvor UV-sterilisierte Wundauflagen in einem *MRSA*-tragenden Flüssigmedium unter Schütteln inkubiert und nach 0 h, 1 h und 24 h auf eine Agarplatte übertragen. Die Berechnung der bakteriellen Reduktion erfolgte erneut anhand der Werte

der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter der jeweiligen Probe und der Negativkontrolle (PES neg.) mittels der o.g. Gleichung:



Abb. 21: Bakterielle Reduktion von Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit und ohne AgPURE gegenüber dem Hospitalismuserreger *MRSA*. Man erkennt, dass beide bakteriellen Wundauflagen über die Inkubationszeit von 1 und 18 h das Wachstum von *MRSA* reduzieren. AgPURE hemmt hierbei etwas stärker als die bakterielle Wundauflage.

Anhand der Abbildung 21 wird deutlich, dass bei der Negativkontrolle (PES neg.) das bakterielle Wachstum über den Versuchszeitraum nahezu unverändert blieb (nach 0 h bei 6,52 log KBE, nach einer Stunde bei 6,62 log KBE und im weiteren Verlauf bis 18 h wurden 6,40 log KBE erreicht). Beim Shake Flask Test mit Wundauflagen aus bakteriellem Alginat ging das bakterielle Wachstum im Verlauf stetig zurück. Nach 0 h wurden 6,52 log KBE, nach 1 h 6,14 log KBE gemessen. Nach 18 h Inkubation wurde ein bakterielles Wachstum von 0,77 log KBE verzeichnet. Der 0 h Wert lag bei der Wundauflage aus AgPURE Alginat zum Startzeitpunkt bei 6,52 KBE. Nach 1 h Inkubation nahm das bakterielle Wachstum dann deutlich ab, es lag bei 0,61 log KBE und blieb auf niedrigem Niveau bis zum Ablauf der Versuchszeit (18-h Wert: 0,77 log KBE). Die antibakterielle Wirksamkeit der nicht antibakteriellen Wundauflage aus Alginat war somit gegenüber *MRSA* nahezu identisch zur Wundauflage mit Nanosilber. Dies zeigte sich auch in der Darstellung der bakteriellen Reduktionswerte (Abb. 22).



Abb. 22: Bakterielle Reduktion der Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit und ohne AgPURE gegenüber *MRSA*. Man erkennt, dass AgPURE das Wachstum von *MRSA* stärker reduziert als die Wundauflage aus bakteriellen Alginat ohne Nanosilberzusatz. Nach 18 h erreichen beide bakteriellen Wundauflagen eine 70-80 % Reduktion an *MRSA*.

## 3.6. Bindeversuche mit mCherry-exprimierenden E.coli

Bei den Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität mittels Shake Flask Test mit den Nanosiber-freien Wundauflagen aus bakteriellem Alginat blieb ungeklärt, ob die Reduktionswerte auf einer echten antibakteriellen Aktivität beruhen oder ob es sich hierbei lediglich um eine starke, aber unspezifische Bindung der Alginat-Stanzlinge gegenüber Bakterien handelt; quasi um einen pseudo-antibakteriellem Effekt, sodass in der Auswertung des Shake Flask Test keine Bakterien mehr eluiert werden konnten. Wiegand et al. [107] stellte bereits die Vermutung auf, dass der antimikrobielle Effekt der Alginatwundauflagen auf einem Einschluss der sich im Wundexsudat befindlichen Keime zwischen den quellenden Alginatfasern beruht.

Um diese These zu überprüfen, wurden Bindeversuche mit mCherry-exprimierenden *E.coli* durchgeführt. Hierfür wurde eine Suspension mCherry-exprimierender *E.coli* auf zuvor UV-sterilisierte Stanzlinge aus bakteriellem Alginat gegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Vliese eluiert, um überschüssige Bakterien zu entfernen und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Bakterieneinschlüsse in den Alginatfasern hin untersucht.


Abb. 23: Bindeversuche mit mCherry-exprimierenden *E.coli* auf Wundauflagen. Man erkennt in dieser Fluoreszenzaufnahme die dichte Ansammlungen rot fluoreszierender Bakterien in und auf den Alginatfasern.

In diesen Versuchen zeigten sich unter dem Fluoreszenzmikroskop zahlreiche Ansammlungen rot fluoreszierender Bakterien auf und innerhalb der Alginatfasern, z.T. umgeben von aufquellenden Alginat-Fasern (siehe Abb. 23). Der Einschluss von Keimen zeigte sich besonders beim Durchfokussieren durch die Alginatfasern. Zwar konnte mit dieser Methode nicht zweifelsfrei quantitativ bestimmt werden, ob die Bakterien sich innerhalb des quellenden Vlies befinden, oder auf den Alginatfasern gebunden sind, doch die Aufnahmen lassen vermuten, dass die in Flüssigkeit aufquellenden Alginatfasern erhebliche Mengen an Bakterien einschließen.

### 4. Diskussion

Mit der steigenden Anzahl an Wundheilungsprodukten auf dem Markt ist für praktizierende Ärzte das Verständnis der Vor- und Nachteile jeden Wundauflagentyps essenziell. Studien belegen, dass gerade Wundauflagen aus dem Biopolymer Alginat den Heilungsprozess positiv beeinflussen können [103], wobei dieser Wundauflagentyp hauptsächlich zur Behandlung exsudierender Wunden genutzt wird. Aufgrund der künftig zunehmenden Zahl an chronischen Wunden ist es erforderlich, die Materialeigenschaften von Wundauflagen weiter zu optimieren [38]. Dabei wird speziell nach solchen Materialien gesucht, die im Stande sind, zerstörerische Komponenten im Wundexsudat abzufangen [4].

#### 4.1. Quellversuche mit Absorptionsvergleich

Da sich Wundauflagen aus Alginat in der klinischen Praxis durch ein gutes Absorptionsvermögen bewährt haben [38], wurden in dieser Arbeit Quellversuche analog zur Methode der Britischen Pharmacopoe [8] durchgeführt, um die Absorptionskapazität kommerziell erhältlicher Wundauflagen aus marinem Alginat mit Wundauflagen aus bakteriellen Alginat (biotechnologisch gewonnen aus dem Keim Azotobacter vinelandii) miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden aus den Alginatfasern Vliese hergestellt. Interessanterweise zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass die Prüflinge aus bakteriellem Alginat durch Quellung etwa die doppelte Menge an Flüssigkeit aufnehmen konnten als Stanzlinge herkömmlicher mariner Alginatwundauflagen (Tegaderm<sup>™</sup>, Biatain<sup>®</sup>, DracoAlgin, Algosteril®, Kaltostat® und Cutimed®). Bereits Draget et al. sowie Augst et al. postulierten, dass das Verhältnis von Mannuronsäure (M)- und Guluronsäureanteilen (G) des Alginats eine wichtige Rolle bei der Gelbildung spielt [3, 22], sodass zunächst vermutet wurde, dass die Verteilung der Uronsäuren für diese Quellungsunterschiede verantwortlich sind. Die Ergebnisse einer <sup>1</sup>H-NMR Analyse (Berechnung nach Davis et al. [15]) zeigten allerdings, dass das bakterielle Alginat aus Azotobacter vinelandii ein M zu G Verhältnis von 60:40 aufwies, wohingegen im Referenzmaterial aus marinem Alginat ein M zu G Verhältnis von 65:35 vorlag. Insofern lagen damit bei beiden Alginatsorten recht ähnliche M/G Verhältnisse vor. Thomas beobachtete, dass ein hoher Mannuronsäureanteil des Alginats die Gel-bildenden Eigenschaften eher verstärkt, wohingegen höhere Anteile an Guluronsäure zu einem steiferen Alginat führen. Diese Resultate konnten in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden: Hier gelierte das bakterielle Alginat - mit etwas niedrigerem M-Anteil - deutlich besser als das marine Alginat [98].

Es mussten daher, neben dem etwas veränderten M/G-Verhältnis des bakteriellen Alginats, noch andere Mechanismen das Quellverhalten beeinflussen. Eine Erklärung des erhöhten Quellverhaltens bakteriellen Alginats findet sich daher möglicherweise in den unterschiedlichen chemischen Modifikationen beider Biopolymere, insbesondere den <sup>1</sup>H-NMR Analyse, dass marines Alginat Acetylierungsgraden. So ergab die erwartungsgemäß nicht acetyliert ist, wohingegen bakterielles Alginat, je nach Kultivierungsbedingung von Azotobacter vinelandii, eine O-Acetylierung von 29 % bzw. bis zu 59 % aufwies. In unseren Kultivierungen führte die Keimanzucht von Azotobacter vinelandii auf Agarplatten zu einem mit 59 % höhergradig acetylierten Alginat, die Anzucht im Flüssigmedium lieferte hingegen ein zu 29 % acetyliertes Alginat. Vermutlich bedingt die Acetylierung bakteriellen Alginats auch die erhöhte molare Masse, wohingegen das marine nicht-acetylierte Alginat in unseren Versuchen eine niedrigere molare Masse aufwies. Clarke et al. erklärten die unterschiedlichen Acetylierungsgrade folgendermaßen: So soll eine aerobe Kultivierbedingung, wie es bei der Anzucht von Azotobacter vinelandii auf Agarplatten der Fall ist, die O-Acetylierung fördern, da vermehrt Acetyl-Coenzym A nutzbar ist, welches als Acetylgruppenspender fungiert [13]. Sabra et al. postulierten ihrerseits, dass durch die O-Acetylierung eine gesteigerte Rheologie und Viskosität des Alginats resultiert [85]. Dass die O-Acetylierung von Alginat dessen Absorptionskapazität deutlich steigert, zeigte die Arbeitsgruppe um Nivens et al. [70]. Die hier durchgeführten Quellversuche und chemischen Charakterisierungen mit bakteriellem Alginat bestätigen diese Beobachtung.

Ein weiterer Erklärungsansatz für das unterschiedliche Quellungsverhalten der marinen und bakteriellen Alginatwundauflagen liegt unter Umständen in deren Faseroberfläche begründet. Trotz identischem Versuchsaufbau wiesen im Nasspinnverfahren (Mikroextrusion) Fasern aus bakteriellem Alginat stets einen deutlich geringeren Durchmesser auf, als Fasern aus marinem Alginat (diese Beobachtung wurde in der Arbeit nicht weiter ergründet). In der weiteren Verarbeitung der Fasern zu Vliesen konnten wir dadurch letztlich Wundauflagenvliese aus bakteriellen Alginatfasern mit größerer Oberfläche pro cm<sup>2</sup> herstellen, was die erhöhte Aufnahmegeschwindigkeit für Flüssigkeiten erklären könnte. Zusammengefasst beruht die erhöhte Absorption der Wundauflagen aus bakteriellen Alginat u.U. auf zwei Mechanismen: a) Der chemischen Zusammensetzung

(hoher Mannuronsäureanteil und O-Acetylierung) sowie b) einem physikalischen Effekt aufgrund der größeren Faseroberfläche.

Ein häufiger Kritikpunkt bei der Wundbehandlung mit Alginat ist, dass das Material zwar in der Lage ist, viel Flüssigkeit zu binden, diese jedoch auch unter Druck – wie beispielsweise im Rahmen eines Lagerungswechsels des Patienten oder unter einem Kompressionsverband - wieder freisetzt [68]. Der Versuchsaufbau der Britischen Pharmacopoe für die Quellversuche lässt leider keine Rückschlüsse auf eventuell wieder freigesetzte Flüssigkeit zu, denn die Prüflinge werden mit dieser Methode für lediglich 30 Minuten in Lösung A belassen. In der Praxis verbleiben Wundauflagen jedoch häufig mehrere Tage auf einer Wunde. Mit dem gewählten Versuchsaufbau konnte zumindest jedoch ein erster Eindruck über das Absorptionsvermögen bakterieller Wundauflagen gewonnen werden. Weiterführende in vivo Erhebungen über das Quellungsvermögen über mehrere Tage wären daher sicher interessant. Unter klinischen Gesichtspunkten lässt das erhöhte Absorptionsvermögen bakteriellen Alginats hoffen, dass daraus gefertigte Wundauflagen bei der Versorgung sehr stark exsudierender Wunden einen Vorteil bieten. Zum einen könnten sie in derselben Behandlungsdauer mehr Wundexsudat aufnehmen als marine Alginatwundauflagen. Zum anderen könnten sie unter Umständen die Rate der Verbandswechsel und daraus resultierend, den Aufwand und die Kosten von Pflegekräften sowie Materialkosten senken.

Im klinischen Alltag ist neben dem Quellverhalten auch die Integrität der jeweiligen Wundauflage von entscheidender Bedeutung, insbesondere beim Verbandwechsel. Für die Untersuchungen der Integrität der Wundauflagen nach Gelierung wurden daher Reißversuche nach Terrill et al. durchgeführt [97]; diese Methode erlaubt eine semiquantitative Einteilung der Integrität von Wundauflagen in 5 Kategorien, wobei die Reißkraft letztlich subjektiv beurteilt wird.

Hierzu wurden die mit humanem Wundexsudat inkubierten bakteriellen und marinen Wundauflagen mittels zweier Zangen auseinandergezogen. Es zeigte sich, dass die bakteriellen Alginatwundauflagen nach Quellung einen moderaten Verlust an Stärke und Integrität aufwiesen, wohingegen die marinen Wundauflagen einen moderaten bis milden Verlust aufzeigten, und somit in ihrem Quellungszustand stabiler blieben. Tegaderm<sup>™</sup>, Algosteril® und Biatain® erzielten eine moderate Integrität, während Kaltostat®, DracoAlgin sowie Cutimed® in die Kategorie milde Integrität eingeteilt wurden. Der Unterschied im Integritätsverlust liegt vermutlich in Variationen der homopolymeren Regionen von Mannuron- und Guluronsäuren begründet, welche vorwiegend die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Alginate bestimmen [22]: Je höher der Anteil an G-Blöcken im Alginat, desto größer die Interaktion mit Calciumionen und desto stabiler das resultierende Gel. In Alginaten mit hohem Anteil an Mannuronsäuren werden die Calciumionen weniger fest gebunden und daher leichter durch Natriumionen ersetzt. Dies bewirkt einen erhöhten Flüssigkeitseinstrom und eine schnellere Gelbildung. Daher sind M-reiche Alginate prinzipiell höher absorbierend - im Gramm zu Gramm Vergleich und bilden weichere Gele als Alginate mit hohem G Block [98]. Für den Einsatz der Alginate in der Praxis lässt sich hieraus ableiten, dass Alginate mit höherem Integritätsverlust und stärkerem Strukturuntergang sich vermutlich einer Wundform (z.B. Wundtaschen) besser anpassen, was für eine Versorgung oberflächlicher und unregelmäßiger Wunden spricht. Für die Behandlung tieferer Wunden (z.B. Grad IV Dekubiti) dagegen sind vermutlich Alginate mit geringerem Integritätsverlust (marine Alginate) besser geeignet, da sie sich im Ganzen leichter entfernen lassen. Aus diesen Überlegungen folgt, bakterielle das Alginatwundauflagen daher eher bei der Versorgung oberflächlicher, exsudierender Wunden einen Vorteil bieten könnten.

#### 4.2. Bindungsfähigkeit von Zytokinen und freien Radikalen

Im Wundexsudat chronischer Wunden wiesen Behm et al. erhöhte Konzentrationen proinflammatorisch wirksamer Zytokine nach, wie TNF- $\alpha$ , MMP-2 sowie der Serinprotease PMN Elastase [6]. Es ist bekannt, dass Wundauflagen im Stande sind, aktiv in den Zytokinhaushalt des Exsudats einzugreifen [96]. Silberhaltige Wundauflagen beispielsweise modulieren die Aktivität von MMP in vitro und in vivo [46]. Einen ersten Hinweis zur Interaktion von Alginat mit proinflammatorischen Zytokine lieferten Wiegand et al. [107], welche 2009 kommerzielle Wundauflagen aus marinem Alginat miteinander verglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit der biotechnologischen Produktion bakteriellen Alginats nun erstmals ein Vergleich zwischen bakteriellen und marinen Alginatwundauflagen zum Einfluss auf Zytokine durchgeführt werden. Hierzu wurden Bindungsversuche mittels Zytokin-spezifischer Immunassays (ELISA) durchgeführt, um quantitativ zu untersuchen, in welchem Ausmaß bakterielle Alginatwundauflagen (mit und ohne AgPURE Nanosilberzusatz) sowie kommerzielle marine Alginatwundauflagen im Stande sind, die Konzentration proinflammatorischer Zytokine sowie von Proteasen zu modulieren.

Zunächst wurde untersucht, ob bakterielle Alginatwundauflagen die Konzentration von TNF- $\alpha$  aus einem Inkubationspuffer reduzieren - um eine Aufnahme aus Wundexsudat zu simulieren - denn zahlreiche Arbeiten belegen die schädliche Wirkung erhöhter TNF-a Spiegel für die Wundheilung [24, 92, 115]. Olmarker beispielsweise wies bereits 2009 auf die Möglichkeit einer verbesserten Wundheilung durch Inhibition von Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) hin [73]. Ebenso zeigten TNF- $\alpha$  Rezeptor-defiziente Mäuse eine beschleunigte Wundheilung [67]. Aufgrund dieser Studien liegt die Vermutung nahe, dass eine Reduktion der TNF-a Konzentration in chronischen Wunden dazu beitragen könnte, die proinflammatorische Wundheilungsphase zu überwinden um die Wundheilung zu fördern. Der TNF-a Imunassay zeigte, dass beide Wundauflagen aus bakteriellem Alginat (bakterielles Alginat mit und ohne AgPURE) die eingesetzte TNF-α Menge fast vollständig aus dem Inkubationspuffer aufnehmen konnten. Im Vergleich dazu reduzierten interessanterweise die kommerziellen Wundauflagen aus marinem Alginat (Algosteril® und Silvercel<sup>®</sup>) zwar ebenfalls die TNF- $\alpha$  Konzentration deutlich, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie die bakteriellen Alginatwundauflagen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bindefähigkeit für TNF-a von Wundauflagen aus bakteriellem Alginat offenbar noch ausgeprägter ist als die kommerzieller Alginatwundauflagen. Um die Bindungsstärke auf TNF- $\alpha$  einzuschätzen wurden sämtliche Prüflinge unter Schütteln inkubiert, um das absorbierte Zytokin zu eluieren und das Eluat auf den TNF-α-Gehalt zu messen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Vliese aus bakteriellem als auch marinem Alginat kaum TNF- $\alpha$  durch Elution freisetzten; offenbar ist ihre Bindung gegenüber TNF-a recht fest ausgeprägt. Lediglich die mit Nanosilber (AgPURE) dotierte Alginatwundauflage gab durch Elution zuvor gebundenes TNF- $\alpha$  frei; ihre Bindungsfähigkeit für TNF- $\alpha$  ist offenbar weniger ausgeprägt. Die hier beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Alginatwundauflagen durch eine Reduktion der Konzentration an TNF- $\alpha$  im Wundexsudat antiinflammatorisch wirken können. Erst 2014 konnte ein anderes Biopolymer, das Polysacchardid Chitosan, zeigen, dass es als Wundabdeckung im Stande ist, antiinflammatorisch zu wirken, in dem es TNF- $\alpha$  reduziert [33].

Es ist weiterhin interessant, inwiefern Wundauflagen aus bakteriellen Alginaten die Konzentration an Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) modulieren, da im Wundexsudat chronischer Wunden oft neben TNF- $\alpha$  auch die Konzentration an MMP-2 signifikant erhöht ist [104, 113]. Kirsner et al. wiesen bereits auf die Eigenschaft silberhaltiger Wundauflagen hin, die MMP Aktivität zu beeinflussen, sowohl in vitro als auch in vivo [46]. Als

Versuchsaufbau wählten wir daher wiederum einen quantitativen Immunassay ELISA für MMP. Dabei erzielte die Wundauflage aus bakteriellem Alginat erneut die deutlichste Reduktion der Proteasekonzentration. Auch die mit Nanosilberpartikel versetzte AgPURE-Alginatwundauflage senkte den Gehalt an MMP-2. Analog zu den TNF-α Versuchen wurde anschließend über Elution zusätzlich die Stärke der Bindung bzw. Aufnahme von MMP-2 durch Alginatwundauflagen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das bakterielle Alginatvlies offenbar eine ausgeprägtere Bindung des MMP-2 aufweist als die AgPURE-Alginatwundauflage; sie setzte deutlich mehr MMP-2 frei. Neben bakteriellen Alginatwundauflagen wurden auch die kommerziellen marinen Alginatwundauflagen auf ihr Bindungsvermögen gegenüber MMP-2 geprüft. Wiegand et al. stellten 2009 in ihren Untersuchungen über das Zytokin-Bindungsverhalten mariner Alginatwundauflagen fest, dass lediglich silberversetzte Wundauflagen die MMP-2 Konzentration modulieren [107]. Ihre Beobachtungen konnten wir mit unseren Ergebnissen bestätigen. Hier konnte ebenfalls lediglich Silvercel® (als marine Alginatwundauflage mit Silberzusatz) MMP-2 aus dem Inkubationspuffer aufnehmen; Algosteril® jedoch schien die MMP-2 Konzentration nicht beeinflussen zu können. Unsere Ergebnisse deuten an, dass Wundauflagen aus bakteriellem Alginat die Konzentration an MMP-2 aus einer Exsudat-ähnlichen Flüssigkeit deutlich stärker reduzieren können als marine Alginatwundauflagen. Auch zahlreiche andere Fasermaterialien sind im Stande MMP zu binden, was für einen weiterführenden klinischen Vergleich spricht. So konnten Wiegand et al. im Jahr 2011 zeigen, dass hydrokinetische Fasern aus Zellulose und Natrium-Polyacrylat (Sorbion Sachet extra) MMP-2 wie auch MMP-9 in vitro zu etwa 84 % aufnehmen [106]. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte 2013 ähnliche Effekte für mit Superabsorber dotierte Wundauflagen [109], wobei sie zusätzlich eine Inhibition von Kollagenase beobachteten.

Neben TNF-α und MMP-2 wurde auch der Einfluss von Alginatwundauflagen auf IL-8 untersucht, das als proinflammatorisches Zytokin ebenfalls in erhöhter Konzentration im Wundexsudat chronischer Wunden nachweisbar ist und die Wundheilung negativ beeinflusst [55]. Der IL-8-Immunassay zeigte, dass sowohl die bakteriellen als auch die marinen Alginatwundauflagen die Konzentration an IL-8 im Inkubationspuffer deutlich reduzieren. Dabei konnten wiederum die bakteriellen Alginatwundauflagen den IL-8-Gehalt stärker reduzieren als die kommerziellen marinen Alginatwundauflagen. Auffällig war hingegen, dass jeweils die Wundauflagen mit Silberzusatz (AgPURE und Silvercel®) mehr IL-8 aufnahmen als die korrespondierenden Alginatwundauflagen ohne Zusatz. Da lediglich

die marinen Alginatwundauflagen durch Elution zuvor gebundenes IL-8 freisetzten, lässt sich daraus schlussfolgern, dass sie offenbar weniger IL-8 binden können. Unter klinischen Gesichtspunkten deuten die Ergebnisse an, dass bakterielle Alginatwundauflagen möglicherweise auch in vivo die IL-8 Konzentration in Wundexsudaten stärker senken als bisher zugelassene, marine Alginatwundauflagen; denn bereits Wiegand et al. wiesen 2009 auf die Adhäsion von IL-8 durch Alginatwundauflagen hin [107]. Dass auch Wundauflagen aus hydrozellulären Schäumen mit Bestandteilen des Exsudats interagieren und Einfluss auf eine gesteigerte Genexpression von Interleukinen nehmen, wurde kürzlich von Yamane et al. gezeigt [116].

Ein weiteres, bekanntes Problem im Wundexsudat chronischer Wunden stellt die Serinprotease PMN Elastase dar, die einerseits an der Degradation von Pathogenen und Zelltrümmern im Wundheilungsprozess beteiligt ist; andererseits führen überschießende Elastase-Konzentrationen auch zur Beschädigung von gesundem Gewebe. Solange daher die Elastase-Konzentration im Exsudat überschießend ist, wird der Heilungsprozess verzögert [12, 19].

ELISA-Untersuchungen modulierenden Einfluss Unsere Immunassay zum von Alginatwundauflagen auf die PMN Elastase zeigen, dass bakterielles Alginat über effiziente Elastase-bindende Eigenschaften verfügt. Damit konnten zunächst die Ergebnisse von Edwards et al. bestätigt werden, welche bereits 2003 zeigten, dass eine mit Zitronensäure vernetzte Alginatwundauflage mit Oleinsäure die Elastaseaktivität im Exsudat inhibiert [23]. Im Vergleich mit den kommerziellen marinen Alginatwundauflagen konnten beide bakteriellen Alginatwundauflagen (mit und ohne AgPURE) die Konzentration an PMN Elastase im Inkubationspuffer deutlich reduzieren. Erneut zeigte das bakterielle Alginat ohne Zusatz das beste Resultat, sprich höhere Bindung. Die marinen Alginatwundauflagen hingegen vermochten deutlich weniger PMN Elastase zu binden. Hier erzielte lediglich die silberversetzte Wundauflage (Silvercel®) eine gewisse Reduktion des Enzymgehalts, während die undotierte, marine Alginatwundauflage (Algosteril®) keinen Einfluss auf die PMN Elastase-Konzentration zeigte. Interessanterweise gaben nach der Elastaseaufnahme alle marinen und bakteriellen Alginatwundauflagen durch Elution in etwa dieselbe Menge an PMN Elastase frei. Es wäre daher denkbar, dass Alginatwundauflagen, unabhängig von einem Silberzusatz, Elastase über nichtkovalente Bindungen adhärieren.

Zahlreiche andere Wundauflagentypen vermögen ebenfalls Elastase zu binden, z.B. eine Matrix aus oxidierter regenerierte Zellulose / Kollagen [100], mit Superabsorber dotierte

Dressings [106], oder Wundauflagen mit hydrokinetischen Fasern [108]. Inwiefern die Elastasebindung bakterieller Alginatwundauflagen im Vergleich zu diesen abschneidet, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Interessant wäre es dabei, die Elastaseaktivität nicht in vitro per Immunassay, sondern messtechnisch direkt online im Wundexsudat zu bestimmen. Hierzu wurde unlängst ein in Wundauflagen integrierbares Sensormaterial entwickelt, das die Aktivität der Elastase in Wundflüssigkeit detektiert [34].

Die gegenüber marinem Alginat erhöhte Bindefähigkeit von bakteriellem Alginat für diverse Zytokine und Proteasen wie TNF-α, IL-8, MMP-2 und PMN Elastase ist unter klinischen Gesichtspunkten spannend. Aufgrund dieser Eigenschaften könnten sich bakterielle Alginatwundauflagen künftig bei der Versorgung chronischer Wunden als vorteilhaft erweisen, denn die hier erhobenen in vitro Ergebnisse deuten an, dass bakterielle Alginatwundauflagen die Konzentration der o.g. Mediatoren noch wirkungsvoller senken könnten als derzeitig verwendete kommerzielle Alginatwundauflagen [67, 73, 105]. Vorteile böten sich auch beim Verbandwechsel: Um einen noch atraumatischeren, schmerzfreieren Verbandswechsel zu ermöglichen, werden Wundauflagen häufig vor dem Verbandswechsel mit bspw. 0,9 % NaCl-Lösung angespült [68], was zuvor gebundene Zytokine in das Wundgebiet zurückspülen könnte. Eine starke Retention wundschädlicher Zytokine / Proteasen, wie es vornehmlich die bakteriellen Alginatwundauflagen zeigten, fördert daher unter Umständen den Heilungsprozess.

Neben Mediatoren ist die Wundheilung in chronischen Wunden bekanntermaßen auch durch überschießende Bildung und Reaktion freier Radikale (ROS) verzögert [90]. Solche ROS können ebenso durch Wundauflagen beeinflusst werden. So zeigten unlängst neuartige Gelatine und Alginat-basierende Hydrogele als funktionell bioresponsive Polymere eine antioxidative Wirkung im Wundmanagement [71]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Alginatwundauflagen den Gehalt freier Radikale im Wundexsudat modifizieren, wozu ein Pholasinassay eingesetzt wurde. In diesen Versuchen zeigten Wundauflagen aus bakteriellem Alginat, im Vergleich zu den marinen Prüflingen, eine stärkere Inhibition der Radikalbildung. So erreichten die bakteriellen Alginatvliese stets eine Hemmung zwischen 80-100 %. Die mit AgPURE versetzte Wundauflage erreichte in jeder Prüflinggröße eine Hemmung von 100 %. Mit Silberzusatz (Silvercel®) erzielte auch eine Wundauflage aus marinem Alginat eine deutliche Hemmung. Einzig Algosteril® konnte keine deutliche Reduktion der Radikalbildung zeigen. Ob Silberzusätze in Wundauflagen die Inhibition freier Radikale verstärken, kann dennoch aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden, denn bei dem gewählten Versuchsaufbau wird das Protein Pholasin gemeinsam mit den freien Radikalen und den Prüflingen inkubiert; es wird daher möglicherweise selbst gebunden wodurch unter Umständen ein pseudoinhibitorischer Effekt zustande kommt. In der Literatur gibt es zudem Untersuchungen, welche nachweisen, dass Silber die Bildung freier Radikale induziert, wodurch sich ein Großteil der antimikrobiellen Aktivität des Silbers ergibt [2, 110]. Da eine Überproduktion freier Radikalen in Wunden zu Zellschädigungen führt, könnte die Inhibition der Radikalbildung der Wundheilung sicher zuträglich sein. Die hier vorliegenden präklinischen Ergebnisse weisen immerhin auf eine deutliche Hemmung der Radikalbildung durch bakterielles Alginat hin. Wie sich die in vitro ROS-Bindung der bakteriellen Alginate im Vergleich mit anderen Fasermaterialien zeigt (Kollagen, oxidierte regenerierte Zellulose und Mixturen; untersucht von [88]) müssen künftige Studien zeigen.

Sämtliche Untersuchungen zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine und der Bindung freier Radikale durch Alginatwundauflagen basieren auf dem Nachweis erhöhter Konzentrationen dieser Mediatoren in chronischen Wunden [6, 19] sowie der Theorie, dass durch deren Reduktion der Einfluss von Wachstumsfaktoren zunimmt, wodurch die Wundheilung gefördert wird [74]. Allerdings spielen diese Zytokine und freien Radikale im normalen Wundheilungssetting auch eine wichtige Rolle bei der regelrechten Wundheilung, indem sie Detritus und Erreger abbauen und damit die Abheilung unterstützen [6]. Eine drastische Reduktion dieser Mediatoren aus der Wunde könnte sich folglich ebenso negativ auf die Wundheilung auswirken, da ein Teil der lokalen Infektabwehr damit entfernt werden würde [95]. Anhand der vorliegenden präklinischen in vitro Ergebnissen ist daher nur schwer abschätzbar, welche Auswirkungen die Zytokinreduktion in vivo hätte und in welchem Ausmaß die Wundheilung dabei beeinflusst würde. Zudem zeigten Gohel et al., dass die Höhe der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen in chronischen Wunden interindividuell schwankt [29]; eine Aussage, welches Ausmaß der Reduktion freier Radikale und proinflammatorischer Zytokine letztendlich der Wundheilung zuträglich wird, ist folglich nur schwer möglich. Daher wäre es nun von Interesse, am Tiermodell oder am Patienten die Dauer der Wundheilung unter einer Wundversorgung mit Wundauflagen (u.a. bakterielles und marines Alginat) im Vergleich zu untersuchen.

#### 4.3. Keiminaktivierung

Die ausgeprägte Absorptionskapazität von Alginatwundauflagen bietet - neben der Aufnahme von Wundexsudat und Mediatoren - auch Vorteile bei der Bindung und Inaktivierung von Detritus und Bakterien, welche bei einem Verbandswechsel gleich mit entfernt werden. Speziell bakterielle Wundinfektionen sind eine gefürchtete Komplikation chronischer Wunden [21], wobei die Therapie bei Wundeninfektionen mit nosokomialen Keimen wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* oder *MRSA* besonders schwierig ist. Diese Erreger sind z.T. nur schwer antibiotisch angreifbar. Aktuelle Zahlen bestätigen dies: So kam es im Jahr 2011 in Deutschland zu 305 *MRSA*-Wundinfektionen, was 17 % aller gemeldeter *MRSA* Infektionen in diesem Jahr entspricht [51]; in Verbrennungswunden hingegen ist *Pseudomonas aeruginosa* mit 57 % der häufigste Erreger von Wundinfektionen [25]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern Alginatwundauflagen neben Entzündungsmediatoren auch Wundkeime beeinflussen.

Wiegand et al. untersuchten 2009 bereits das "antimikrobielle Potential" mariner Alginatwundauflagen hinsichtlich diverser Keime. Allerdings besitzen die M- und G-Uronsäuren kein bioziden Eigenschaften; sondern lediglich die mit Silber dotierten Wundauflagen. Zur Inokulation der Wundauflagenprüflinge nutzte die Arbeitsgruppe mit der japanischen Norm JIS L 1902 ein statisches Verfahren, das für Textilien entwickelt wurde [107], während in den vorliegenden Untersuchungen mittels Shake Flask eine dynamische Inokulation der bakteriellen Wundauflagen in einem Flüssigmedium erzielt wurde, was den in vivo Bedingungen einer exsudierenden Wunde näher kommt. Es zeigte sich, dass Wundauflagen aus bakteriellem Alginat eine vollständige "Hemmung" des Wachstums von Pseudomonas aeruginosa erzielten. Wie erwähnt, muss diese Hemmung nicht als antimikrobielle Eigenschaft verstanden werden, sondern kann ebenso auch die Bindung der Bakterien im Alginatgel bedeuten. Das mit AgPURE versetzte bakterielle Alginat konnte diese 100 % Hemmung schneller erreichen als undotiertes bakterielles Alginat. Beide Wundauflagen erzielten über 18 h Inkubation keine vollständige "Hemmung" des Wachstums an MRSA. Allerdings sind die Wundauflagen in der Lage, eine 70-80 % Reduktion zu bewirken. Auch hier zeigte die Wundauflage mit Silberzusatz eine stärkere Hemmung als die reine bakterielle Alginatwundauflage. Diese Ergebnisse bekräftigen den antimikrobiellen Zusatzeffekt von Silberzusätzen in Wundauflagen [53, 64, 103]. In der Praxis wird bei herkömmlichen Auflagen gerne auch mit nanokristallinem Silber gearbeitet. Es wird beispielsweise in Form  $Ag^{+}/Ag^{0}$  in der Wundauflage Acticoat (Smith und Nephew) verwendet, wodurch eine hohe und dauerhafte Silberfreisetzung gewährleistet ist [52]. Allerdings findet sich neben dem antibakteriellen Effekt gegen Mikroorganismen immer häufiger auch Berichte über toxische Effekte des Silbers auf Keratinozyten und Fibroblasten in heilenden Wunden [40]. So wiesen 2006 Paddle-Ledinek et al. bereits auf die mögliche zytotoxische Wirkung silberversetzter Wundauflagen hin. Silberionen der Wundauflagen unterscheiden natürlich nicht zwischen grundsätzlich gesunden Zellen des Heilungsprozesses und pathogenen Bakterien [76]. Daher sollten einigen Forschern zufolge Silberprodukte in Wundphasen mit rascher Zellteilung (z.B. oberflächliche Brandwunden) eher zurückhaltend verwendet werden. Nach Dissemond sollten silberhaltige Wundauflagen aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften nicht verwendet werden, es sei denn eine Wundinfektion liegt als Indikation vor [76]. Mit der Entwicklung bakterieller Wundauflagen mit und ohne Nanosilberzusatz (AgPURE), können daher breitere Wundindikationen therapiert werden.

Der Mechanismus der antibakteriellen Wirkung silberversetzter Wundauflagen ist hinlänglich bekannt [44, 53]. Es ist jedoch bisher ungeklärt, auf welche Weise undotierte bakterielle oder marine Alginatwundauflagen keiminaktivierend sind. Einer Hypothese von Qin et al. [80] nach, nehmen marine Alginatwundauflagen Bakterien während des Quellvorgangs mit aus dem Wundexsudat auf und schließen sie zwischen ihren Fasern ein [38, 68]. Um zu untersuchen, ob dieser Wirkmechanismus auch bei bakteriellen Alginatwundauflagen zu tragen kommt, wurde eine bakterielle Alginatwundauflage mit mCherry E.coli inokuliert und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Dabei zeigte sich, dass sich die markierten Bakterien auf sowie in dem entstandenen Gel befanden. Eine genauere Unterscheidung der Lokalisation (Bindung oder Einschluss) war mit dieser Methode nicht möglich. Außerdem blieb ungeklärt, inwiefern die eingeschlossenen / gebundenen Bakterien tot oder vital sind, und in diesem Falle womöglich weiterhin über Toxine den Patienten schädigen können, wie es Ovington als mögliche Komplikation chronischer Wunden aufführt [75]. Dennoch unterstreicht das Ergebnis, dass (undotierte) Alginatwundauflage an sich nicht antimikrobiell wirksam sind, sondern lediglich durch Einschluss der Bakterien die Keimlast reduzieren und dadurch inaktivieren.

#### 4.4. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Laboruntersuchungen gezeigt, dass Wundauflagen aus bakteriellem Alginat im Stande sind, Entzündungsmediatoren in Wundflüssigkeit zu beeinflussen. So zeigten bakterielle Alginatwundauflagen ein deutlich gesteigertes Aufnahmevermögen von Zytokinen und Proteasen als Vergleichsproben aus marinem Alginat, wobei sie eine moderate Integrität aufwiesen. Ebenso zeigten sie im Vergleich ein generelles höheres Flüssigkeitsaufnahmevermögen. Vor allem konnten sie die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-8, der Proteasen MMP-2 und PMN Elastase sowie freier Radikale ROS stärker reduzieren als marine Alginatwundauflagen. Dabei konnte in der Mehrzahl der Fälle die bakterielle Alginatwundauflage ohne Zusätze noch deutlichere Ergebnisse erzielen als die bakterielle Wundauflage mit Nanosilberzusatz (AgPURE). In vitro erzielten sie damit im direkten Vergleich in Bezug auf Absorptionsvermögen und Zytokinbindung bessere Resultate als kommerzielle Produkte. Die Wundauflagen aus bakteriellem Alginat zeigten weiterhin eine Keiminaktivierung gegenüber Wundkeimen wie *MRSA* und *Pseudomonas aeruginosa*, vermutlich durch Einbindung in das entstehende Gel. Das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* wurde vollständig gehemmt, das von *MRSA* deutlich reduziert.

Das biotechnologisch hergestellte bakterielle Alginat eignet sich aufgrund seiner Materialeigenschaften (hohe Absorption, Gelierfähigkeit, blutstillende Wirkung, Bioverträglichkeit) als Rohstoff für die Produktion faserbasierter Medizinprodukte zur Wundversorgung. Bisher wird Alginat kommerziell aus Braunalgen isoliert. Aufgrund von umweltbedingten Einflüssen variiert die Zusammensetzung dieses marinen Alginats stark und die erforderliche Reinheit ist nur schwer zu erreichen. Durch die biotechnologische Produktion von bakteriellem Alginat, kann ein hochreines Polymer mit homogener, chemisch definierter Zusammensetzung und gleichbleibender Qualität produziert werden. Seit November 2014 stellt die Gütegemeinschaft Algenbiomasse e.V., Berlin, dazu ein RAL-Gütezeichen (RAL-GZ-169) aus, wodurch die Güte von Alginat für den Einsatz u.a. in der Pharmazie gesichert wird. Des Weiteren ist die Herstellung bakteriellen Alginats nachhaltig, unabhängig Umwelteinflüssen und die Materialeigenschaften von können anforderungsspezifisch beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden allesamt in vitro erhoben. Sie deuten an, dass bakterielles Alginat ein neues interessantes Material für die Wundbehandlung darstellt, denn es könnte – sofern das Material Eingang in die Produktion von Herstellern findet - in der Versorgung chronischer Wunde Vorteile bieten. Durch das etwa doppelt so große Absorptionsvermögen können bakterielle Alginatwundauflagen zum einen bei stark exsudierenden Wunden über den gleichen Behandlungszeitraum mehr Flüssigkeit binden, wodurch sich die Häufigkeit der Verbandswechsel reduzieren dürfte; dies bietet die Chance, dass zusätzliche Pflegekräfte entlastet und Kosten für den pflegerischen Aufwand und Materialkosten gesenkt werden. Ferner könnte durch die kürzere Heilungsdauer den Patienten Leidenszeit erspart werden, was zu mehr Lebensqualität führt [43]. Am vielversprechendsten erscheint die hier gezeigte Eigenschaft des hohen Absorptionsvermögens der bakteriellen Alginate. Speziell für die Versorgung sehr stark exsudierender, blutender Wunden könnten sich daher bakterielle Alginatwundauflagen künftig als vorteilhaft erweisen. Allerdings ist hierbei eine strenge Indikationsstellung nötig; eine Verwendung stark absorbierender Wundauflagen in mäßig exsudierenden Wunden kann nämlich leicht zu einer Austrocknung gefährdeter Strukturen wie Peritendineum oder Periost führen, was wiederum die Wundheilung behindert [38].

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit gezeigten in vitro Ergebnisse sich mit weiterführenden in vivo Versuchen bestätigen lassen. Sollten bakterielle Alginatwundauflagen auch in klinischen Erhebungen deutliche Vorteile zeigen, sodass sich eine industrielle Produktion betriebswirtschaftlich rechnet, könnten sich in Zukunft auch Wundauflagen aus bakteriellem Alginat an der Versorgung chronischer Wunden beteiligen.

## 5. Zusammenfassung

Die weltweite Zunahme der Fallzahlen chronischer Wunden erfordert eine Weiterentwicklung und Anpassung der feuchten Wundversorgung. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit Wundauflagen aus bakteriellem Alginat mit präklinischen Methoden auf ihren Einfluss auf Entzündungsmediatoren und Keiminaktivierung untersucht.

Bakterielles Alginat konnte in hoher Ausbeute aus dem Bakterium *Azotobacter vinelandii* biotechnologisch gewonnen, aufgereinigt und chemisch charakterisiert werden. Es wurde zu Fasern nassversponnen, zu Vliesen verarbeitet, und Stanzlinge daraus wurden auf Flüssigkeitsaufnahmevermögen, Zytokinbindung und Keiminaktivierung hin untersucht. Dabei wurde stets ein Vergleich zu kommerziellen Wundauflagen aus marinen Alginaten gezogen.

Wundauflagen bakteriellem ein höheres aus Alginat zeigten generell Flüssigkeitsaufnahmevermögen als Vergleichsproben aus marinem Alginat. Ebenso besaßen sie ein deutlich gesteigertes Absorptionsverhalten gegenüber Zytokinen und Proteasen. Speziell die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF-α (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und IL-8 (Interleukin 8), der Proteasen MMP-2 (Matrix-Metalloproteinase 2) und PMN Elastase (polymorphnukleäre Elastase) sowie freier Radikale (ROS) konnte bakterielles Alginat stärker reduzieren als marines. Dabei erzielten in der Mehrzahl der Absorptionsversuche bakterielle Alginatwundauflagen ohne Zusätze noch bessere Ergebnisse als solche mit Nanosilberzusatz. In vitro erreichten sie damit in Bezug auf Absorptionsvermögen und Zytokinbindung bessere Resultate als kommerzielle Produkte. bakteriellem Alginat zeigten weiterhin Die Wundauflagen aus eine erhöhte Keiminaktivierung gegenüber Wundkeimen wie MRSA (Methicillin-resistenter Staphylokokkus aureus) und Pseudomonas aeruginosa, vermutlich durch Einbindung in das entstehende Gel; das Wachstum von Pseudomonas aeruginosa wurde vollständig gehemmt, das von MRSA deutlich reduziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Wundauflagen aus bakteriellem Alginat in der modernen Wundbehandlung künftig klinische Vorteile bieten: Gegenüber marinem Alginat gelieren sie aufgrund ihrer Molekularstruktur besser und schließen bei Kontakt mit Flüssigkeiten vermehrt Wundexsudat, Detritus oder Bakterien ein. Die erhöhte Bindung von Entzündungsmediatoren wie proinflammatorische Zytokine, Proteasen und reaktiven Oxygenspezies sowie die Keiminaktivierung sind weitere Vorteile. Ihre Integrität bleibt nach Gelierung in ausreichendem Maß für klinische Anwendungen erhalten. Zusammengefasst ist bakterielles Alginat aufgrund der dargelegten Eigenschaften ein aussichtsreiches Material für die Weiterentwicklung der feuchten Wundbehandlung, das sich insbesondere für stark exsudierende chronische Wunden empfiehlt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 3, 745–756.
- [2] Ahlberg, S., Meinke, M. C., Werner, L., Epple, M., Diendorf, J., Blume-Peytavi, U., Lademann, J., Vogt, A., and Rancan, F. 2014. Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 88, 651–657.
- [3] Augst, A. D., Kong, H. J., and Mooney, D. J. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience* 6, 623–633.
- [4] Baskovich, B., Sampson, E. M., Schultz, G. S., and Parnell, Laura K S. 2008. Wound dressing components degrade proteins detrimental to wound healing. *International wound journal* 5, 543–551.
- [5] Beer, D. de, Stoodley, P., Roe, F., and Lewandowski, Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and bioengineering* 43, 1131–1138.
- [6] Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M., and Schreml, S. 2012. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26, 812–820.
- [7] Bian, J. and Sun, Y. 1997. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Molecular and cellular biology* 17, 6330–6338.
- [8] British pharmacopoeia. 1993. Monograph for Alginate Dressings and Packings. Her Majesty's Stationery Office, London, 1705-1707
- [9] Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T L, Friedlander, M., and Cheresh, D. A. 1998. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92, 391–400.
- [10] Bryan, N., Ahswin, H., Smart, N., Bayon, Y., Wohlert, S., and Hunt, J. A. 2012. Reactive oxygen species (ROS)-a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *European cells & materials* 24, 249– 265.
- [11] Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., and Huang, L. 2007. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound repair and regeneration* 15, 94–104.
- [12] Chen, S. M., Ward, S. I., Olutoye, O. O., Diegelmann, R. F., and Kelman Cohen, I. 1997. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound repair and regeneration* 5, 23–32.
- [13] Clarke, A. J., Strating, H., and Blackburn, N. T. 2002. Glycomicrobiology. Pathways for the O-Acetylation of Bacterial Cell Wall Polysaccharides. Springer.Berlin, Heidelberg, 187-223
- [14] Das H.K., Pande L.K. 1989. Genetics of some aspects of regulation of nitrogen fixing genes in Klebsiella Pneumoniae and Azotobacter Vinelandii. Medizinische Dissertation, Jawaharlal Nehru University.
- [15] Davis, T. A., Llanes, F., Volesky, B., Diaz-Pulido, G., McCook, L., and Mucci, A. 2003. 1H-NMR study of Na alginates extracted from Sargassum spp. in relation to metal biosorption. *Applied biochemistry and biotechnology* 110, 75–90.

- [16] Dayer, J. M., Beutler, B., and Cerami, A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *The Journal of experimental medicine* 162, 2163–2168.
- [17] Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.v. Kurzfassung S3-Leitlinie "Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz". http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/091-001.html. Accessed 20 January 2017.
- [18] Díaz-Barrera, A., Martínez, F., Pezoa, F. G., and Acevedo, F. 2014. Evaluation of gene expression and alginate production in response to oxygen transfer in continuous culture of Azotobacter vinelandii. *PloS one* 9, 1–9.
- [19] Diegelmann, R. F. 2003. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. Wound repair and regeneration 11, 490–495.
- [20] Diener, H., Herberger, K., Larena-Avellaneda, A., Kieback, A., Radtke, M., Augustin, M., Pohlenz, P., Schmelzle, R., and Debus, E. S. 2011. Organisationsstrukturen moderner Wundversorgung. Das Comprehensive Wound Center (CWC) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. *Phlebologie* 40, 322–333.
- [21] Dissemond, J., Schmid, E. N., Esser, S., and Witthoff, M., Goos, M. 2004. Bakterielle Kolonisation chronischer Wunden. *Der Hautarzt* 55, 280–288.
- [22] Draget K.I., Smidsrod O., Skjak-Braek G. 2005. Biopolymers Online. Alginates from Algae. Wiley-VCH, Weinheim., 6
- [23] Edwards, J. V., Bopp, A. F., Batiste, S. L., and Goynes, W. R. 2003. Human neutrophil elastase inhibition with a novel cotton-alginate wound dressing formulation. *Journal of biomedical materials research. Part A* 66, 433–440.
- [24] Elliott, C. G., Forbes, T. L., Leask, A., and Hamilton, D. W. 2015. Inflammatory microenvironment and tumor necrosis factor alpha as modulators of periostin and CCN2 expression in human non-healing skin wounds and dermal fibroblasts. *Matrix biology*, 43, 71–84.
- [25] Estahbanati, H. K., Kashani, P. P., and Ghanaatpisheh, F. 2002. Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 28, 340–348.
- [26] Garcia-Cruz C.H., da Silva A.N. 2010. Biopolymers by Azotobacter vinelandii. InTechOpen., 21, 413-438
- [27] Gerber V. 2008. Wundauflagen was für wen? Ars Medici, 10, 435–438.
- [28] Godefroy, E., Gallois, A., Idoyaga, J., Merad, M., Tung, N., Monu, N., Saenger, Y., Fu, Y., Ravindran, R., Pulendran, B., Jotereau, F., Trombetta, S., and Bhardwaj, N. 2014. Activation of toll-like receptor-2 by endogenous matrix metalloproteinase-2 modulates dendritic-cell-mediated inflammatory responses. *Cell reports* 9, 1856– 1870.
- [29] Gohel, M. S., Windhaber, Robin A J, Tarlton, J. F., Whyman, M. R., and Poskitt, K. R. 2008. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *Journal of vascular surgery* 48, 1272–1277.
- [30] Gorin, P. A. and Spencer, J. 1966. Exocellular alginic acid from Azotobacter vinelandii. *Canadian Journal of Chemistry*, 44, 993–998.
- [31] Grey, J. E. and Harding, K. G., Eds. 2008. Ärztliche Wundversorgung. ABC der Wundheilung. Elsevier Urban & Fischer, München, Jena., 8
- [32] Hänsel, R. 2003. Pharmakognosie phytopharmazie. Springer, Berlin, Heidelberg., 628-637
- [33] Harkins, A. L., Duri, S., Kloth, L. C., and Tran, C. D. 2014. Chitosan-cellulose composite for wound dressing material. Part 2. Antimicrobial activity, blood absorption ability, and biocompatibility. *Journal of biomedical materials research*. *Part B, Applied biomaterials* 102, 1199–1206.

- [34] Hasmann, A., Gewessler, U., Hulla, E., Schneider, K. P., Binder, B., Francesko, A., Tzanov, T., Schintler, M., Van der Palen, Job, Guebitz, G. M., and Wehrschuetz-Sigl, E. 2011. Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid. *Experimental dermatology* 20, 508–513.
- [35] Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Moradali, M. F., Wang, Y., and Rehm, Bernd H A. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial biotechnology* 6, 637–650.
- [36] He, C., Hughes, M. A., Cherry, G. W., and Arnold, F. 1999. Effects of chronic wound fluid on the bioactivity of platelet-derived growth factor in serum-free medium and its direct effect on fibroblast growth. *Wound repair and regeneration* 7, 97–105.
- [37] Hoefer, D., Schnepf, J. K., Hammer, T. R., Fischer, M., and Marquardt, C. 2015. Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of materials science. Materials in medicine* 26, 162.
- [38] Horn T. Lokale Wundauflagen: Übersicht und Klassifikation. *Unfallchirurg* 2012, 115, 774–782.
- [39] Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nature medicine* 7, 954–960.
- [40] Ip, M., Lui, S. L., Poon, Vincent K M, Lung, I., and Burd, A. 2006. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *Journal of medical microbiology* 55, Pt 1, 59–63.
- [41] Janeway, C. and Murphy, K. P. 2009. Janeway Immunologie. Spektrum, Heidelberg., 79, 931-934
- [42] Jansen, P. L., Hungol, M., Krott, E., Jansen, M., Lovett, D., Klinge, U., and Mertens, P. R. 2006. Response element 1 reguliert die Expression der MMP-2 in der Wundheilung Ergebnisse aus dem transgenen Mausmodell 35. Springer, Berlin, Heidelberg., 9-11
- [43] Janßen, H. and Becker, R. 2008. Qualität und Kosten in der chronischen Wundversorgung - Widerspruch oder vereinbar? *Orthopädie-Technik* 12, 920–924.
- [44] Jin, S. G., Yousaf, A. M., Jang, S. W., Son, M.-W., Kim, K. S., Kim, D.-W., Li, D. X., Kim, J. O., Yong, C. S., and Choi, H.-G. 2015. In vivo wound-healing effects of novel benzalkonium chloride-loaded hydrocolloid wound dressing. *Drug development research* 76, 157–165.
- [45] Kanta, J. 2011. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. Acta medica (Hradec Králové) 54, 97–101.
- [46] Kirsner, R. S., Orsted, H., and Wright, J. B. 2001. Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver. *Wounds*, 13, 4–12.
- [47] Koh, T. J. and DiPietro, L. A. 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* 13, 1–14.
- [48] Kumar, V. and Robbins, S. L. 2007. Robbins basic pathology. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA., 76
- [49] Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., and Rodriguez-Padilla, C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of nanobiotechnology* 8, 1.
- [50] Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtepan-Turrent, L., and Singh, D. K. 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of nanobiotechnology* 9, 30.

- [51] Layer, F., Cuny, C., Strommenger, B., Werner, G., and Witte, W. 2012. Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55, 11-12, 1377– 1386.
- [52] Leaper, D. J. 2006. Silver dressings: their role in wound management. *International wound journal* 3, 282–294.
- [53] Lee, S. J., Heo, D. N., Moon, J.-H., Park, H. N., Ko, W.-K., Bae, M. S., Lee, J. B., Park, S. W., Kim, E.-C., Lee, C. H., Jung, B.-Y., and Kwon, I. K. 2014. Chitosan/polyurethane blended fiber sheets containing silver sulfadiazine for use as an antimicrobial wound dressing. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14, 7488– 7494.
- [54] Lee, W.-R., Park, J.-H., Kim, K.-H., Kim, S.-J., Park, D.-H., Chae, M.-H., Suh, S.-H., Jeong, S.-W., and Park, K.-K. 2009. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. *Wound repair and regeneration* 17, 505–510.
- [55] Liechty, K. W., Crombleholme, T. M., Cass, D. L., Martin, B., and Adzick, N. S. 1998. Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response. *The Journal of surgical research* 77, 80–84.
- [56] Lima, Alliny Carolina Dionete, Francelin, C., Ferrucci, D. L., Stach-Machado, D. R., and Verinaud, L. 2012. Thymic alterations induced by Plasmodium berghei: expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Cellular immunology* 279, 53–59.
- [57] Lin, Y.-H., Lin, J.-H., Wang, S.-H., Ko, T.-H., and Tseng, G.-C. 2012. Evaluation of silver-containing activated carbon fiber for wound healing study: In vitro and in vivo. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 100, 2288– 2296.
- [58] Linker, A. and Jones, R. S. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a Pseudomonas micro-organism. *Nature* 204, 187–188.
- [59] Lippert H. 2006. Wundatlas. Kompendium der komplexen Wundbehandlung. Thieme, Stuttgart, New York, NY., 29
- [60] Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- [61] Lottspeich, F. 2012. Bioanalytik. Spektrum, Heidelberg., 108-110
- [62] Lu, C.-Y. and Lai, S.-C. 2013. Induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via Erk1/2-NF-κB pathway in human astroglia infected with Toxoplasma gondii. *Acta tropica* 127, 14–20.
- [63] Mariani, T. J., Sandefur, S., Roby, J. D., and Pierce, R. A. 1998. Collagenase-3 induction in rat lung fibroblasts requires the combined effects of tumor necrosis factor-alpha and 12-lipoxygenase metabolites: a model of macrophage-induced, fibroblast-driven extracellular matrix remodeling during inflammatory lung injury. *Molecular biology of the cell* 9, 1411–1424.
- [64] Marin, Ş., Vlăsceanu, G. M., Ţiplea, R. E., Bucur, I. R., Lemnaru, M., Marin, M. M., and Grumezescu, A. M. 2015. Applications and Toxicity of Silver Nanoparticles: a Recent Review. *Current topics in medicinal chemistry*, 15, 1596–1604.
- [65] Martin, P. and Leibovich, S. J. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology* 15, 599–607.
- [66] Mooney, D. P., O'Reilly, M., and Gamelli, R. L. 1990. Tumor necrosis factor and wound healing. *Annals of surgery* 211, 124–129.
- [67] Mori, R., Kondo, T., Ohshima, T., Ishida, Y., and Mukaida, N. 2002. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced

leukocyte infiltration. Federation of American Societies for Experimental Biology - Journal 16, 963–974.

- [68] Münter, K.-C., Clever H.-U., Karlsmak T. 2005. Fortschritte in der modernen Wundversorgung. Uni-Med Science. Uni-Med, Bremen., 13, 56-57
- [69] Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P., and Walmsley, H. L. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32, 518–523.
- [70] Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J., and Franklin, M. J. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms. *Journal of bacteriology* 183, 1047–1057.
- [71] Nyanhongo, G. S., Sygmund, C., Ludwig, R., Prasetyo, E. N., and Guebitz, G. M. 2013. Synthesis of multifunctional bioresponsive polymers for the management of chronic wounds. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 101, 882–891.
- [72] Oakley, M. S., Sahu, B. R., Lotspeich-Cole, L., Solanki, N. R., Majam, V., Pham, P. T., Banerjee, R., Kozakai, Y., Derrick, S. C., Kumar, S., and Morris, S. L. 2013. The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during Plasmodium berghei ANKA murine malaria. *Journal of immunology* 191, 4699–4708.
- [73] Olmarker, K. 2009. Inhibition Of Tumor Necrosis Factor May Improve Wound Healing And Reduce Scar Formation Following Laminectomy. A Pilot Study In Pigs. *The Internet Journal of Spine Surgery* 2, 1–6.
- [74] Olmarker, K. 2010. Reduction of adhesion formation and promotion of wound healing after laminectomy by pharmacological inhibition of pro-inflammatory cytokines: an experimental study in the rat. *European spine journal* 19, 2117–2121.
- [75] Ovington, L. 2003. Bacterial toxins and wound healing. *Ostomy/wound management* 49, 8–12.
- [76] Paddle-Ledinek, J. E., Nasa, Z., and Cleland, H. J. 2006. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 110–120.
- [77] Pajardi, G., Rapisarda, V., Somalvico, F., Scotti, A., Lo Russo, G., Ciancio, F., Sgrò, A., Nebuloni, M., Allevi, R., Torre, M. L., Trabucchi, E., and Marazzi, M. 2014. Skin substitutes based on allogenic fibroblasts or keratinocytes for chronic wounds not responding to conventional therapy: a retrospective observational study. *International wound journal*, 13 (1), 44–52.
- [78] Parikh D.V., Fink T., DeLucca A. J., Parikh A. D. 2010. Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. *Textile research Journal* 81, 494–503.
- [79] Percival, S. L., Bowler, P. G., and Russell, D. 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. *The Journal of hospital infection* 60, 1–7.
- [80] Qin, Y. 2005. Silver-containing alginate fibres and dressings. *International wound journal* 2, 172–176.
- [81] Rahman, M. M. and McFadden, G. 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS pathogens* 2, 66–77.
- [82] Rennekampff, H. O., Hansbrough, J. F., Kiessig, V., Doré, C., Sticherling, M., and Schröder, J. M. 2000. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *The Journal of surgical research* 93, 41–54.
- [83] Ricketts, C. H., Martin, L., Faria, D. T., Saed, G. M., and Fivenson, D. P. 1996. Cytokine mRNA changes during the treatment of hypertrophic scars with silicone and nonsilicone gel dressings. *Dermatologic surgery* 22, 955–959.
- [84] Rüttermann, M., Maier-Hasselmann, A., Nink-Grebe, B., and Burckhardt, M. 2013. Local treatment of chronic wounds: in patients with peripheral vascular disease,

chronic venous insufficiency, and diabetes. *Deutsches Ärzteblatt international* 110, 25–31.

- [85] Sabra, W., Zeng, A. P., and Deckwer, W. D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied microbiology and biotechnology* 56, 315–325.
- [86] Sasaki, M., Kashima, M., Ito, T., Watanabe, A., Izumiyama, N., Sano, M., Kagaya, M., Shioya, T., and Miura, M. 2000. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators of inflammation* 9, 155–160.
- [87] Sauer, A., Rochet, E., Lahmar, I., Brunet, J., Sabou, M., Bourcier, T., Candolfi, E., and Pfaff, A. W. 2013. The local immune response to intraocular Toxoplasma rechallenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *International journal for parasitology* 43, 721–728.
- [88] Schönfelder, U., Abel, M., Wiegand, C., Klemm, D., Elsner, P., and Hipler, U.-C. 2005. Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential in vitro. *Biomaterials* 26, 6664–6673.
- [89] Schütt, C. and Bröker, B. 2011. Grundwissen Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg., 80
- [90] Senel, O. M. D., Cetinkale, O. M. D., Özbay, G. M. D., Ahçioglu, F. P., and Bulan, R. M. D. 1997. Oxygen Free Radicals Impair Wound Healing in Ischemic Rat Skin. *Annals of Plastic Surgery* 39, 516–523.
- [91] Sharma, J. 2014. *Regulation of Alginate Biosynthesis in Azotobacter vinelandii*. Master Thesis, Norwegian University of Science and Technology.
- [92] Shi, J., Xi, W., Yi, C., Wang, Z., Guo, S., and Han, Y. 2014. [Vacuum sealing drainage promotes experimental pig explosive abdomen wound healing]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 30, 312–315.
- [93] Skjåk-Braek, G., Grasdalen, H., and Larsen, B. 1986. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydrate research* 154, 239–250.
- [94] Smidsrod, O., Haug, A., and Larsen, B. 1966. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. *Acta chemica Scandinavica* 20, 1026–1034.
- [95] Sommer, K., Sander, A. L., Albig, M., Weber, R., Henrich, D., Frank, J., Marzi, I., and Jakob, H. 2013. Delayed wound repair in sepsis is associated with reduced local pro-inflammatory cytokine expression. *PloS one* 8, 1–8.
- [96] Tarlton, J. F. and Munro, H. S. 2013. Use of modified superabsorbent polymer dressings for protease modulation in improved chronic wound care. *Wounds* 25, 51– 57.
- [97] Terrill P Sussman G Bailey M. 2003. Absorption of blood by moist wound healing dressings. *Primary Intention* 11, 7–17.
- [98] Thomas, S. 2000. Alginate dressings in surgery and wound management: Part 3. *Journal of wound care* 9, 163–166.
- [99] Turner, T. D. 1979. A look at wound dressings. *Health and social service journal* 89, 529–531.
- [100] Ulrich, D., Smeets, R., Unglaub, F., Wöltje, M., and Pallua, N. 2011. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with diabetic foot ulcers. *Journal of wound, ostomy, and continence nursing* 38, 522–528.
- [101] Vilcek, J., Palombella, V. J., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M., and Tsujimoto, M. 1986. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *The Journal of experimental medicine* 163, 632–643.

- [102] Voggenreiter, G. and Dold, C. 2009. Wundtherapie. Wunden professionell beurteilen und erfolgreich behandeln. Pflegepraxis. Thieme, Stuttgart, New York., 28
- [103] Warriner, R. and Burrell, R. 2005. Infection and the chronic wound: a focus on silver. *Advances in skin & wound care* 18, 2–12.
- [104] Weckroth, M., Vaheri, A., Lauharanta, J., Sorsa, T., and Konttinen, Y. T. 1996. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *The Journal of investigative dermatology* 106, 1119–1124.
- [105] Werner, S. and Grose, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83, 835–870.
- [106] Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., and Hipler, U. C. 2011. Superabsorbent polymercontaining wound dressings have a beneficial effect on wound healing by reducing PMN elastase concentration and inhibiting microbial growth. *Journal of materials science. Materials in medicine* 22, 2583–2590.
- [107] Wiegand, C., Heinze, T., and Hipler, U.-C. 2009. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound repair and regeneration* 17, 511–521.
- [108] Wiegand, C. and Hipler, U. C. 2013. In vitro studies on the beneficial effect of a hydrokinetic fiber dressing on wound healing by reduction of protease activity. *Journal of wound care* 22, 592, 594-598.
- [109] Wiegand, C. and Hipler, U.-C. 2013. A superabsorbent polymer-containing wound dressing efficiently sequesters MMPs and inhibits collagenase activity in vitro. *Journal of materials science. Materials in medicine* 24, 2473–2478.
- [110] Wilkinson, L. J., White, R. J., and Chipman, J. K. 2011. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. *Journal of wound care* 20, 543–549.
- [111] Winter, G. D. 1962. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 193, 293–294.
- [112] Wolcott, R. D., Rhoads, D. D., and Dowd, S. E. 2008. Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of wound care* 17, 333–341.
- [113] Wysocki, A. B., Staiano-Coico, L., and Grinnell, F. 1993. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *The Journal of investigative dermatology* 101, 64–68.
- [114] Xu, K. D., McFeters, G. A., and Stewart, P. S. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 146, 547–549.
- [115] Xu, W., Jia, S., Xie, P., Zhong, A., Galiano, R. D., Mustoe, T. A., and Hong, S. J. 2014. The expression of proinflammatory genes in epidermal keratinocytes is regulated by hydration status. *The Journal of investigative dermatology* 134, 1044– 1055.
- [116] Yamane, T., Nakagami, G., Yoshino, S., Shimura, M., Kitamura, A., Kobayashi-Hattori, K., Oishi, Y., Nishijima, Y., Minematsu, T., and Sanada, H. 2015. Hydrocellular foam dressings promote wound healing associated with decrease in inflammation in rat periwound skin and granulation tissue, compared with hydrocolloid dressings. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 79, 185–189.
- [117] Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., and Olerud, J. E. 2013. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Advances in wound care* 2, 389–399.
- [118] Ziraldo, C., Mi, Q., An, G., and Vodovotz, Y. 2013. Computational Modeling of Inflammation and Wound Healing. *Advances in wound care* 2, 527–537.

# 7. Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## 8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## 9. Publikationen

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Hoefer, D., Schnepf, J.K., Hammer, T.R., Fischer, M., Marquardt, C. 2015.
Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of materials science. Materials in medicine* 26, 162

Fischer, M., Gebhard, F., Hammer, T., Zurek, C., Meurer, G., Marquardt, C., Hoefer, D. 2017. Microbial alginate dressings show improved binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of biomaterials applications* 9, 1267-1276