

**Antimikrobielle Aktivität von Moxifloxacin gegen MRSA- und
Pseudomonas-aeruginosa-Wundinfektion im Großtier- und
Verbrennungsmodell**

Von der Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae (Dr. med.)

angenommene Dissertation von
Christian André Fisahn
05.07.1982
aus Dortmund
2014

Gutachterinnen/ Gutachter:

PD Dr. Jürgen Bauer (Vorsitzender)

PD Dr. Dirk Weyhe

Prof. Dr. Thomas Kretschmer

Tag der mündlichen Prüfung:

13.10.2014

ABSTRACT

Antimikrobielle Aktivität von Moxifloxacin gegen MRSA- und *Pseudomonas-aeruginosa*-Wundinfektion im Großtier- und Verbrennungsmodell

Einleitung: Die Prävalenz und Inzidenz von Wundinfektionen bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist ein wachsendes Problem in der Klinik und aufgrund der damit verbundenen enormen Kosten von hohem sozioökonomischen Interesse. Die Therapie der Wahl ist derzeit die systemische Behandlung, allerdings auf Kosten von Nebenwirkungen und dem Problem einer unzureichenden Verfügbarkeit im peripheren Gewebe, meist als Folge einer gestörten Durchblutung. Systemisch appliziertes Moxifloxacin dringt gut in entzündliche Blasenflüssigkeit, Muskel- und subkutanes Fettgewebe ein. Aus diesem Grund sollte Moxifloxacin eine mögliche Option für die topische Behandlung von infizierten Hautwunden darstellen. Ziel dieser vorklinischen Studie war die Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität von topisch appliziertem Moxifloxacin im Vergleich zu einem Trägerkontrollengel, Mupirocin, Linezolid und Gentamicin anhand eines porcinen Infektions- und Ratten-Verbrennungsmodell.

Material und Methoden: Beide in dieser Studie verwendeten Tiermodelle (Schwein, Ratte) wurden, nach Wundsetzung, entweder mit 1×10^8 Colony-Forming Units (CFU) von MRSA oder *Pseudomonas aeruginosa* inokuliert und im Anschluss über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Moxifloxacin und klinisch erprobten Antibiotika (Linezolid, Mupirocin, Gentamicin) sowie einer Trägerkontrolle topisch therapiert. Wundflüssigkeiten und Gewebeproben wurden asserviert und anschließend quantifiziert. Des Weiteren erfolgte eine Bestimmung der Moxifloxacin-Konzentration sowie eine Analyse der Blutproben. Die entnommenen Gewebeproben aus dem Ratten-Verbrennungsmodell wurden zu einem histologischen Vergleich herangezogen.

Ergebnisse: Alle Wunden wiesen vor Behandlungsbeginn eine stabile Bakterieninfektion ($> 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit und CFU/g Gewebe) auf. Beide Bakterienstämme zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegen Moxifloxacin und Gentamicin, während Mupirocin und Linezolid ihre Wirksamkeit nur gegen den MRSA-Stamm zeigen konnten. Die topische Therapie mit allen applizierten Antibiotika zeigte eine signifikante Bakterienreduktion und erreichte mit Ausnahme von den mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* infizierten Verbrennungswunden Werte von $< 10^5$ CFU/g Gewebe. Zusätzlich konnte in der histologischen Analyse ein erhöhtes Wundheilungspotential von Moxifloxacin beobachtet werden. Eine zunehmende Resistenzentwicklung während der gesamten Therapie zeigte sich hingegen nicht.

Diskussion: Zusammenfassend konnte in der Forschungsarbeit gezeigt werden, dass der Gebrauch von topisch applizierten Antibiotika in der Behandlung von infizierten Wunden viele Vorteile vereint. Zum einen ist die Aktivität von Moxifloxacin mit bereits klinisch erprobten Antibiotika (Linezolid, Mupirocin, Gentamicin) vergleichbar und zum anderen konnten keine Nebenwirkungen beobachtet werden. Moxifloxacin hat somit die potentielle Aussicht, als neue Therapiemöglichkeit in der Behandlung von MRSA-infizierten Wunden eingesetzt zu werden. Dies beruht nicht zuletzt auf dem breiten Wirkungsspektrum, der hohen Effizienz, sondern auch auf dem Potential, die Wundheilung positiv zu beeinflussen.

**Für
meine Mutter**

Bärbel Fisahn (* 26.07.1948 † 05.08.2013)

1. EINLEITUNG	9
1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT	9
1.1.1 Epidermis (Oberhaut)	9
1.1.2 Dermis (Lederhaut).....	10
1.1.3 Subkutis (Unterhaut).....	10
1.2 PHYSIOLOGIE DER WUNDHEILUNG	11
1.3 PROBLEMATIK DER INFIZIERTEN WUNDE	14
1.4 PROBLEMEKEME DER WUNDHEILUNG	16
1.4.1 <i>Staphylococcus-aureus</i> -Infektionen	17
1.4.2 <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -Infektionen.....	19
1.5 THERAPIEMÖGLICHKEITEN, LIMITATIONEN UND NEUE OPTIONEN	20
1.6 TOPISCHE APPLIKATION VON MOXIFLOXACIN ALS NEUES THERAPIEREGIME?	23
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 AGARPLATTENFERTIGUNG	26
2.2 BAKTERIENKULTUREN	26
2.3 KONTROLLAUSSTRICH	27
2.4 STERILISATION	27
2.5 BESTIMMUNG VON MHK UND MBK MITTELS MICROBROTH-DILUTION ASSAY	28
2.6 THERAPEUTIKA	28
2.7 TIERHALTUNG UND VORBEREITUNG	29
2.7.1 Göttinger Miniaturschweine	29
2.7.2 Sprague-Dawley-Ratten	30
2.8 PORCINES WUNDINFEKTIONSMODELL	31
2.8.1 Zeitlicher Versuchsablauf	31
2.8.2 Vorbereitung der Versuchstiere	31
2.8.3 Implantation der BO-Wundkammern	32
2.8.4 Bakterielle Inokulation der Wunden	34
2.8.5 Randomisierung und Gruppenverteilung	35
2.8.6 Probengewinnung und Applikation	36
2.8.7 Euthanasie und Gewebeprobenentnahme	36
2.9 RATTEN-VERBRENNUNGSINFEKTIONSMODELL	37

2.9.1	Zeitlicher Versuchsablauf	37
2.9.2	Vorbereitung der Versuchstiere	37
2.9.3	Analgesie	38
2.9.4	Verbrennungstrauma und Infektion	38
2.9.5	Randomisierung und Gruppenverteilung	39
2.9.6	Applikation	40
2.9.7	Gewebeentnahme	41
2.10	QUANTITATIVE UND QUALITATIVE MIKROBIOLOGISCHE ANALYSE	41
2.10.1	Probenhomogenisation	42
2.10.2	Verdünnungsreihe	42
2.10.3	Ausplattierung	42
2.10.4	Auszählung	43
2.11	PERIPHERE BLUTANALYSE	43
2.12	QUANTIFIZIERUNG VON MOXIFLOXACIN MITTELS LC-MS/MS	43
2.13	HISTOLOGISCHE ANALYSE	44
2.14	RESISTENZTESTUNG DURCH AGARDIFFUSIONSMETHODE	45
2.15	STATISTISCHE AUSWERTUNG	46
3.	ERGEBNISSE	47
3.1.	ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT	47
3.1.1	Microbroth-Dilution Assay	47
3.1.2	Agardiffusionsmethode	48
3.2	PORCINES WUNDINFEKTIONSMODELL	48
3.2.1	Wirksamkeit gegen <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -inokulierte Wunden	49
3.2.1.1	Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit	49
3.2.2	Wirksamkeit gegen MRSA-inokulierte Wunden	50
3.2.2.1	Makroskopisches Erscheinungsbild der Wunden	50
3.2.2.2	Bakterielle Konzentration in der Wundflüssigkeit	51
3.2.2.3	Bakterielle Konzentration im Wundgewebe	53
3.2.2.4	Quantifikation von Moxifloxacin	53
3.3	RATTEN-VERBRENNUNGS-INFESTIONSMODELL	54
3.3.1	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -inokulierte Verbrennungswunden	55
3.3.1.1	Bakterielle Konzentration im Wundgewebe	55
3.3.2	MRSA-inokulierte Verbrennungswunden	56
3.3.2.1	Bakterielle Konzentration im Wundgewebe	56
3.3.2.2	Quantifikation von Moxifloxacin	57
3.3.2.3	Histologische Auswertung	58
4.	DISKUSSION	61

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6. SUMMARY	71
7. LITERATURVERZEICHNIS	72
DANKSAGUNGEN	82
LEBENS LAUF	83
PUBLIKATIONEN.....	84

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
CFU	Kolonien-bildende Einheiten (Colony-Forming Units)
cm	Zentimeter
cm²	Quadratcentimeter
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
H₂O	Wasser
HPF	Hauptgesichtsfeld (High power field)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
i.m.	intramuskulär
IU	Infektiöse Einheiten (Infectious units)
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
l	Liter
MBK	Minimale bakterizide Konzentration (MBC, Minimal bactericidal concentration)
MDA	Microbroth-Dilution Assay
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration (MIC, Minimal inhibitory concentration)
min	Minute(n)
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N₂O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte (Optical density)

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PIA	Pseudomonas Isolations Agar
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
s.c.	subkutan
WF	Wundflüssigkeit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildungen

- Abbildung 1: Histologischer und schematischer Aufbau der menschlichen Haut (S. 11)
- Abbildung 2: Die drei Phasen der Wundheilung [Quelle: Unfallchirurg, W. Mutschler, 2012 · 115:767–773 DOI 10.1007/s00113-012-2208-x](S. 12)
- Abbildung 3: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 500 nm [Quelle: Muhsin Özel, Gudrun Holland, Rolf Reissbrodt/RKI] (S. 17)
- Abbildung 4: *Pseudomonas aeruginosa*. Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 500 nm [Quelle: Todars Online Textbook of Bacteriology © Kenneth Todar, Ph.D] (S. 19)
- Abbildung 5: Kommerziell erhältliches Moxifloxacin (Avelox[®]), Strukturformel Moxifloxacin [Quelle: Datenblatt Moxifloxacin hydrochloride bei Sigma-Aldrich, abgerufen am 5. Mai 2011] (S. 24)
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Implantation einer BO-Chamber[®] [Quelle: Steinstraesser et al., Comp Med. 2006 Aug;56(4):279-85] (S. 32)
- Abbildung 7: Implantation der BO-Chamber[®] unter sterilen Kautelen am Schweinemodell (S. 33)
- Abbildung 8 : Applikation der jeweiligen Gel-Rezeptur auf PVP-Schwämme und anschließende Einlage in die BO-Chamber[®] (S. 36)

- Abbildung 9: Verbrennungstrauma (25 s/60 °C) im Wasserbad (S. 38)
- Abbildung 10: Applikation der mit 250 µl der jeweiligen Bakteriensuspension benetzten Wundgaze und Abdeckung mit Tegaderm (S. 39)
- Abbildung 11: Probenentnahme (S. 41)
- Abbildung 12: Blutwerte der drei porcinen Versuchstiere (S. 48)
- Abbildung 13: Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit von *Pseudomonas-aeruginosa*-infizierten porcinen Wunden und die Auswirkung von topisch appliziertem Moxifloxacin und Gentamicin (S. 49)
- Abbildung 14: Makroskopische Fotodokumentation der Infektionszeichen 17 Tage nach Inokulation (S. 50)
- Abbildung 15: Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit von MRSA-infizierten porcinen Wunden und die Auswirkung von topisch appliziertem Moxifloxacin, Linezolid und Mupirocin (S. 51)
- Abbildung 16: Bakterielle Konzentration in Gewebeproben (Tag 14) von MRSA-infizierten porcinen Wunden (S. 52)
- Abbildung 17: Verhältnis zwischen der Keimzahl in der Wundflüssigkeit und dem entsprechenden Gehalt von Moxifloxacin (S. 53)
- Abbildung 18: Blutwerte der mit MRSA infizierten Ratten (S. 54)
- Abbildung 19: Bakterielle Konzentration von *P.-aeruginosa*-infizierten Verbrennungswunden 7 Tage nach Therapiebeginn (S. 55)

Abbildung 20: Bakterielle Konzentration in Gewebeproben (Tag 0, 1, 7, 14) von MRSA-infizierten Verbrennungswunden (S. 56)

Abbildung 21: Verhältnis zwischen der Keimzahl in den gewonnenen Gewebeproben und der entsprechenden Moxifloxacin-Konzentration (S. 57)

Abbildung 22: Histologische Analyse der mit MRSA infizierten Verbrennungswunden an Tag 1, 7 und 14 in Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung und 50-facher Vergrößerung (S. 59)

Tabellen

Tabelle 1: Aufstellung der MHK- und MBK-Ergebnisse für alle Antibiotika, welche gegen beide Bakterienstämme in dieser Studie verwendet wurden (S. 46)

1. EINLEITUNG

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT

Die Haut stellt mit einer Oberfläche von knapp 2 m² und einem Gewicht von ca. 10–12 kg das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers dar. Ihre Dicke beträgt, abhängig von der anatomischen Lokalisation und ohne subkutanes Fett 1,5–4 mm [23, 61]. Zusammen mit Haaren und Hautanhangsgebilden bildet sie eine funktionelle Einheit und stellt die Abgrenzung des Organismus zur Umwelt dar [93]. Die Haut schützt den Körper als Barriere vor biologischen (z.B. Infektionen), physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen [94]. Darüber hinaus ist sie maßgeblich an der Regulation des Wärmehaushaltes als auch an der Konstanterhaltung des Serum- und Elektrolythaushaltes und somit an der Blutdruckregulation beteiligt. Sie wirkt als Reservoir für Fette und Wasser, ist an den Vorgängen des Gasaustausches beteiligt und verhindert die Austrocknung des Organismus. Als Absonderungs- und Sinnesorgan vermittelt die Haut durch ihre zahlreichen Rezeptoren Druck-, Kälte-/Wärme- und Schmerzreize zwischen Umwelt und Organismus und bietet immunologischen Schutz, da sie Antigen präsentierende Langerhans-Zellen und Lymphozyten enthält [61, 116, 120].

Die Haut gliedert sich prinzipiell, von außen nach innen, in drei wesentliche Schichten:

1.1.1 Epidermis (Oberhaut)

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel, das üblicherweise zwischen 0,03–0,05 mm dick und zu 85 % aus Keratinozyten aufgebaut ist [23]. Die restlichen 15 % stellen Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-Zellen (dendritische Zellen) und Merkel-Zellen (Tastzellen) dar. Abhängig von den verschiedenen Schichten (*Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum*, *Stratum basale*) der Epidermis variiert die Erscheinungsform der Keratinozyten [61]. Durch Bündel von Intermediärfilamenten (Keratinfilamente und Tonofibrillen), die in Desmosomen

inserieren, werden einzelne Keratinozyten zusammengehalten. Iso- bis hochprismatische Basalzellen bilden die tiefste Zellage der Epidermis und sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden [64]. Dort finden sich pigmenthaltige Melanozyten und Stammzellen, welche kontinuierlich neue Zellen produzieren [23]. Diese durchwandern die oben aufgeführten Schichten nach apikal und erfahren hierbei eine zunehmende Differenzierung. Terminal ausgebildet ergeben sich die abgestorbenen, verhornten und kernlosen Korneozyten in der Hornschicht. Somit erneuert sich die Epidermis als eine dynamische Hautschicht innerhalb von ca. 28–30 Tagen selbständig. Dieser als Desquamation bezeichnete Vorgang bietet ebenfalls Schutz gegen Pathogene [100].

1.1.2 Dermis (Lederhaut)

Der avaskulären Epidermis folgt die Dermis (Korium), bestehend aus *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*, welche durch ein vernetztes Gewebe für Elastizität und Flexibilität der Haut sorgen. Hauptsächlich besteht die Dermis aus Kollagenfasern, elastischen Fasern und Fibrillen, welche in ein Mucopolysaccharid-Gel eingebettet sind. Die Dermis ist durchzogen von Nervenbahnen, Blut- und Lymphgefäßen [23]. Weiterhin ist sie Ausgangspunkt für die Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen. Die mechanische Festigkeit der Haut beruht folglich zum primären Teil auf der Dermis [97].

1.1.3 Subkutis (Unterhaut)

Die Subkutis (Hypodermis) stellt ein lockeres Bindegewebe dar, das die Haut mit den darunterliegenden Organen verbindet und bis zur oberflächlichen Körperfaszie reicht.

Die Subkutis erlaubt die unterschiedlich gute Beweglichkeit der Haut und enthält läppchenartig aufgebautes Fettgewebe, dessen Menge je nach Körperregion und Ernährungszustand variiert [61]. Somit dient die Unterhaut als Kälteschutz, Energie- und Wasserspeicher und weiteren Funktionen, insbesondere auf sekretorischer Ebene. Die Nährstoffversorgung der Subkutis und Dermis erfolgt über Blutgefäße, wohingegen die Versorgung der Epidermis allein durch Diffusion geschieht [23, 100].

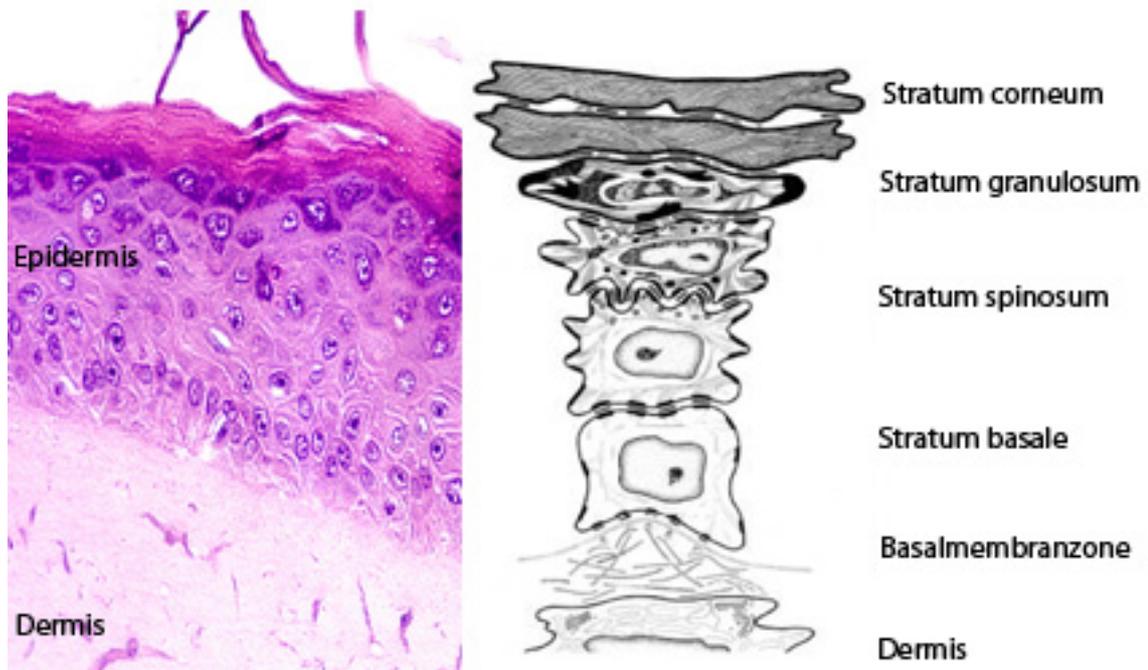


Abbildung 1: Histologischer und schematischer Aufbau der menschlichen Haut

1.2 PHYSIOLOGIE DER WUNDHEILUNG

Problematisch ist eine Verletzung der Hautstrukturen. Definitionsgemäß ist eine Wunde folglich die Unterbrechung der normalen Struktur und Funktion der Haut, Schleimhäute oder Organe und des darunter befindlichen Gewebes [10, 86]. Klinisch unterscheidet man je nach Ausmaß und Beschaffenheit des Wunddefekts zwischen zwei Formen der Wundheilung: zum einen der Heilung *per primam intentionem* (p.p.) und zum anderen *per secundam intentionem* (s.c.) [86].

Bei primär heilenden Wunden finden sich zumeist ein sauberes, nicht infiziertes Wundmilieu und glatte, gut adaptierte Wundränder. Da hier nur eine geringe Gewebsreparation nötig ist und die Wundheilungsphasen relativ schnell ablaufen können, heilen diese Wunden ohne größere Vernarbungen und zumeist komplikationslos. Von sekundär heilenden Wunden spricht man hingegen, wenn Wundheilungsstörungen, wie z.B. Infektionen, auftreten oder die primäre Wundrandadaption aufgrund der Defektgröße nicht gegeben ist, so dass die Wunde zunächst mit Granulationsgewebe überbrückt, anschließend durch Narbengewebe aufgefüllt und als ein paralleler Prozess mit

Epithelgewebe bedeckt werden muss. Während die primäre Wundheilung meistens innerhalb von Tagen erfolgt, dauert die sekundäre Wundheilung teils Wochen bis Monate [13, 75, 86].

Den oben geschilderten Heilungsformen liegt ein physiologischer Regenerationsprozess zugrunde, welcher sich in drei zeitlich überlappende und nicht scharf voneinander abgrenzbaren Phasen einteilen lässt [69, 86].

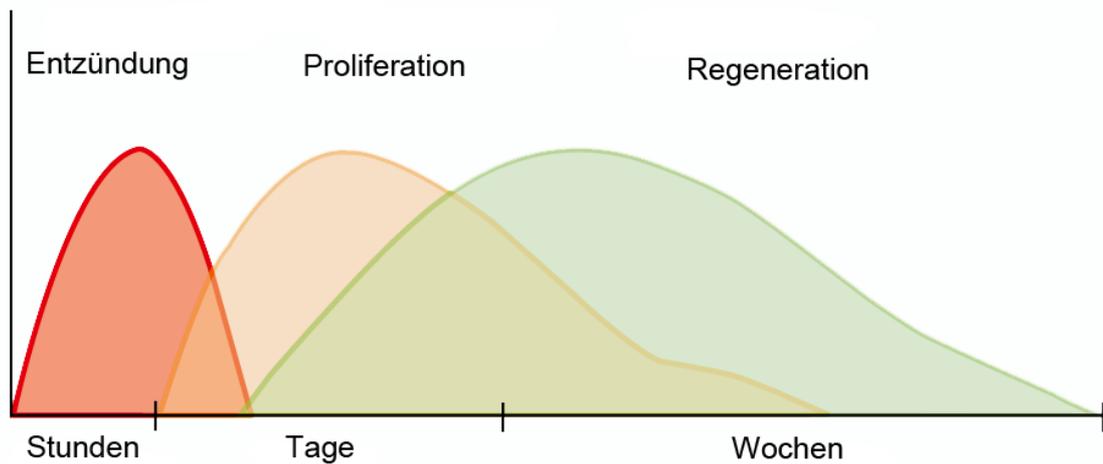


Abbildung 2: Die drei Phasen der Wundheilung (adaptiert aus Mutschler 2012)

Zuerst erfolgt eine physiologische Entzündung (*Entzündungs-, Exsudationsphase*), anschließend eine Granulationsgewebebildung (*Proliferationsphase*) und abschließend die Kollagensynthese mit Wundmodulation (*Regenerations-, Reparationsphase*). Unmittelbar nach einer Hautgewebsverletzung beginnt die exsudative Phase, welche bei einem komplikationslosen Verlauf nach 3–4 Tagen endet [9, 86]. Die erste zu beobachtende Reaktion ist hierbei eine lokale Aggregation von Blutplättchen und die Bildung von Fibrin, welche innerhalb von Minuten zur Hämostase führt. Der entstehende Blutpfropf besteht zum größten Teil aus Thrombozyten, welche Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren [101]. Diese Zytokine beeinflussen die Proliferation und Migration von Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und wirken chemotaktisch auf Granulozyten und Monozyten. Im weiteren Verlauf differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und sorgen mittels Phagozytose von Bakterien und nekrotischem

Gewebe für die Säuberung der Wunde und somit auch für eine immunologische Abwehr [4, 13].

Die eigentliche Entzündung ist ein wesentliches Merkmal der exsudativen Phase. Sie wird durch die Kennzeichnung von Rötung (*rubor*), Überwärmung (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Schmerz (*dolor*) sichtbar und hervorgerufen durch Vasodilatation sowie erhöhte Gefäßpermeabilität [51]. Im Anschluss folgt etwa am dritten Tag nach Hautgewebsverletzung die zweite oder proliferative Phase mit Gefäßneubildung und Aufbau von Granulationsgewebe, um den Hautdefekt wieder aufzufüllen. Die resultierende Fibrinmatrix stabilisiert somit die Wunde und liefert ein vorläufiges Gerüst für den ablaufenden Wundheilungsprozess. Die Proliferationsphase ist durch eine hohe Zellteilungsaktivität der Fibroblasten und deren Kollagenbiosynthese gekennzeichnet und wird wiederum durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert [52, 101]. Myofibroblasten fungieren als wichtige mesenchymale Zellen, da sie in der Lage sind, durch ihre kontraktile Eigenschaften Wundränder zu adaptieren. Unter dem Einfluss von Zytokinen, einer niedrigen Sauerstoffkonzentration und einer hohen Laktatkonzentration sprießen Kapillaren in das Wundgewebe ein. Dieser als Angiogenese bezeichnete Vorgang ist eine maßgebliche Voraussetzung, um das neu gebildete Granulationsgewebe mit dem für den Stoffwechsel notwendigen Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen [4]. Die Reparations- und Regenerationsphase bildet den Abschluss der Wundheilung. Sie beginnt etwa zwei Wochen nach einer Hautgewebsverletzung und kann bis zu zwei Jahre andauern. Einer der wichtigsten Prozesse während dieser Phase ist die Abstoßung des Wundschorfs und die Bildung einer neuen und intakten Epidermis, was auch als Reepithelialisierung bzw. Proliferationsphase zusammengefasst wird. Die Reepithelialisierung wird hauptsächlich durch Zytokine der *Epidermal-Growth-Factor*-(EGF-)Familie gesteuert [16]. Im weiteren Verlauf reifen die Kollagenfasern zunehmend aus und sorgen somit für eine Eskalierung der mechanischen Festigkeit des Wundgewebes [20]. Es erfolgt eine Umwandlung in Fibrozyten und Myofibroblasten, welche kontraktile Elemente wie Aktin und Myosin enthalten und sich somit zusammenziehen können. Dadurch werden die Kollagenfasern gestrafft, die Wunde schrumpft

und zieht die Wundränder zusammen. Ausgehend von den Wundrändern wandern Epithelzellen über das Granulationsgewebe, um schließlich in der Mitte der ursprünglichen Wunde aufeinanderzutreffen [16]. Dieser Vorgang in Kombination mit einer verstärkten Mitose der Basalzellschicht führt zum Verschluss der Epidermis und somit zum Abschluss der Wundheilung [20]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wundmodulation ein interaktives Wechselspiel zwischen Extrazellulärmatrix und Wundzellen ist, welches als Resultat ein stabiles, kollagenreiches Narbengewebe entstehen lässt. Alle Phasen der Wundheilung werden durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen kontrolliert und durch etliche Wachstumsfaktoren und Zytokine kommuniziert.

1.3 PROBLEMATIK DER INFIZIERTEN WUNDE

Die physiologische Wundheilung dauert im Normalfall 1–2 Wochen [34]. Unter pathophysiologischen Bedingungen hingegen ist die Wundheilung gestört und der Verschluss eines Hautgewebedefekts verzögert oder gar komplett unterdrückt. Definitionsgemäß handelt es sich bei Wundheilungsstörungen um einen prolongierten oder atypischen Verlauf der Wundheilung [80]. Die Übergänge von der physiologischen Wundheilung über verschiedenste Faktoren und Prozesse zu nicht heilenden Wunden sind fließend und nicht streng voneinander abzugrenzen. Der Heilungsverlauf ist von der Art der Verletzung (traumatische oder chronische Defektwunde, Verbrennung), Größe und Lokalisation der Wunde abhängig. Dazu kann es in allen oben beschriebenen Wundheilungsphasen durch systemische und lokale Störfaktoren, wie z.B. nutritive Defizite, Durchblutungsstörungen, Blutgerinnungsstörungen, Erkrankungen mit kataboler Stoffwechsellage, *Diabetes mellitus*, Medikamente, venöse Insuffizienz, Dekubiti bei Bettlägerigkeit und insbesondere durch Infektionen zu Abweichungen kommen [53, 86, 99]. Kommt es zu einer Hautgewebsverletzung und somit zum Verlust der schützenden Abwehrmechanismen, können Mikroorganismen, welche normalerweise an der Hautoberfläche sequestriert sind, tiefer gelegenes Gewebe infiltrieren. Als Kontamination bezeichnet man einen Gewebezustand

mit Bakterienbesiedlung. Bei einer Kolonisation hingegen replizieren sich die Organismen, ohne das Gewebe maßgeblich zu beschädigen. Bei einer lokalen Infektion oder kritischen Kolonisation kommt es zu einer lokalen Gewebsreaktion mit Zellschädigung, wohingegen eine invasive Infektion mit systemischer Beteiligung erhöhte Infektparameter (CRP-Anstieg, Leukozytose) mit sich bringt und zu einer fulminanten Sepsis führen kann [25, 48, 112]. Lokale Infektionen einer Wunde sind nach wie vor einer der Hauptfaktoren gestörter Wundheilung [25, 99]. Definitionsgemäß liegt eine Wundinfektion vor, wenn die Keimlast auf $> 10^5$ CFU/g Gewebe ansteigt [90, 96, 118]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass einem erfolgreichen Wundverschluss immer eine Keimlast von unter 10^5 CFU/g Gewebe zugrunde liegt [25]. Die praktische Erhebung dieses quantitativen Bakteriennachweises ist methodisch jedoch sehr schwierig und findet daher nahezu ausschließlich in klinischen Studien Einsatz. Dennoch sollte man als therapeutisches Ziel die Quantität der Bakterien unter 10^5 CFU/g Gewebe halten, um somit das Risiko einer nachfolgenden systemischen Infektion zu minimieren [22].

Eine Schlüsselrolle spielt jedoch nicht nur die Konzentration der bakteriellen Besiedlung, sondern auch die Qualität und das Spektrum der besiedelten Wunde. Man geht davon aus, dass mehr als vier verschiedene Spezies in einer Wunde zu Wundheilungsstörungen führen können, ohne die kritische Keimzahldichte je erreicht zu haben [25, 63]. Dieser Faktor muss sowohl in der systemischen wie auch der topischen Therapie von Wundinfektionen berücksichtigt werden. Das Vorliegen einer Infektion beeinträchtigt verschiedenste Schritte im Wundheilungsprozess und kann als verlängerte intensiviert Immunreaktion bezeichnet werden, da Bakterien in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α), zu induzieren und somit primär die exsudative Phase der Wundheilung prolongieren [25, 31]. Darüber hinaus geht dieser Zustand mit einer verminderten Produktion von Wachstumsfaktoren einher, welche, wie bereits oben beschrieben, entscheidend für den Wundheilungsverlauf und die anschließende Epithelialisierung sind [111]. Gerade chronische Wunden und Verbrennungswunden, wo lokale Störfaktoren

und ein geschädigtes Immunsystem eine große Rolle spielen, sind für lokale Infektionen prädisponiert.

Allein in Deutschland leiden ca. 5 Millionen Menschen unter Problemwunden sowie Wundheilungsstörungen unterschiedlicher Genese [82, 121] und sind somit extrem anfällig für Wundinfektionen. Wundinfektionen wiederum führen zu verlängerter Hospitalisation und drastisch steigenden Kosten in der Gesundheitsversorgung [17]. Bei Diabetikern werden 60 % aller nichttraumatischen Amputationen vorgenommen [8], deren Ursache zu 85 % eine Wundinfektion im Rahmen einer diabetischen Wundheilungsstörung ist [1]. Auch in der Therapie und Versorgung von Schwerbrandverletzten zählen die Wundheilung und die Kontrolle der Wundinfektion zu den größten Problemen, mit denen wir in der heutigen Zeit zu kämpfen haben. Die steigende Inzidenz und Prävalenz von Wundinfektionen sowie das supprimierte Immunsystem bei Verbrennungspatienten bedingen eine erhebliche Infektionsgefahr [29, 103, 106]. Der Infektion als Haupttodesursache bei Verbrennungsverletzungen erliegen etwa 50 % der Schwerbrandverletzten mit letal endendem Krankheitsgeschehen [38, 43]. Allein in Deutschland ziehen sich 6.000 bis 10.000 Menschen pro Jahr schwere Verbrennungsverletzungen mit anschließender Infektion zu, woran jährlich etwa 700 Patienten versterben [38]. Zusammenfassend können invasive Wundinfektionen nicht nur zu Wundheilungsstörungen, sondern auch zu Bakteriämie oder gar einer fulminanten Sepsis mit letalem Ausgang führen [103].

1.4 PROBLEMEKEME DER WUNDHEILUNG

Grampositive und gramnegative Erreger wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gehören zu den häufigsten Verursachern bakterieller Infektionen oder Komplikationen. Sie erhöhen die Morbidität und Mortalität und können folglich als die primären Problemkeime der Wundinfektion bezeichnet werden [37].

1.4.1 *Staphylococcus-aureus*-Infektionen

Staphylococcus aureus (griech. *staphyle*, ‚die Weintraube‘) ist ein grampositives, koagulasepositives, kugelförmiges, nicht sporenbildendes und unbewegliches Bakterium mit einer Größe von ca. 0,8–1,2 µm [56]. Das Bakterium ist Teil der normalen Hautflora und bei 60 % der gesunden Bevölkerung zeitweise und bei 20 % dauerhaft in den vorderen Nasenflügeln anzutreffen [46, 76]. *S. aureus* ist in der Lage, eine Vielzahl von extrazellulären

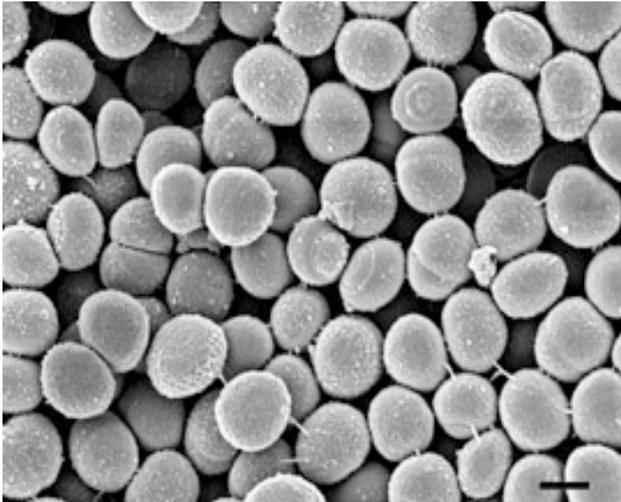


Abbildung 3: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 500 nm

und zellständigen Virulenzfaktoren zu bilden, welche die Bakterien dazu befähigen, der Wirtsabwehr zu entgehen und so Infektionen hervorzurufen [56]. Gerade bei Patienten mit chronischen Wunden und Verbrennungswunden kann *S. aureus* aufgrund des veränderten Wundmilieus und der geschwächten zellulären Abwehr die Wundheilung maßgeblich prolongieren oder

sogar unterdrücken [42]. *S. aureus* ist in den USA die häufigste Ursache für Haut- und Weichteilinfektionen [59, 114] sowie für nosokomiale invasive Infektionen [33]. In Deutschland werden nosokomiale Infektionen seit mehr als zehn Jahren im Rahmen des „Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems“ (KISS) vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) dokumentiert. Hier zeigte sich, dass *S. aureus* mit 21,3 % zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen zählt [77]. Somit stellen *S.-aureus*-Infektionen eine große therapeutische Herausforderung im klinischen Alltag dar und weisen trotz verschiedenster und hochpotenter Antibiotika eine Mortalitätsrate von 20–25 % auf [15]. Ein weiteres großes Problem stellt die zunehmende Resistenzentwicklung dar, die unter anderem zum Auftreten so genannter Methicillin-resistenter Stämme von *S. aureus* (MRSA) geführt hat. Definitionsgemäß liegt eine Methicillin-Resistenz vor, wenn die minimale Hemmkonzentration von Methicillin gegenüber *S. aureus* bei $\geq 4 \mu\text{g/ml}$

liegt [73]. Diese Resistenzen betreffen nicht nur Penicilline, gegen die *S. aureus* Penicillinasen bilden können, sondern erstrecken sich auf alle Betalactame und können vor allem auf Intensivstationen hartnäckige Epidemien auslösen [36, 77]. Die Methicillin-Resistenz von *S. aureus* beruht zum einen auf der Produktion der plasmidkodierenden Penicillinase, der sogenannten β -Lactamase, die den β -Lactam-Ring eines Teils der Penicilline hydrolysiert, und zum anderen auf der Synthese eines genetisch veränderten Penicillin-Bindeproteins (PBP-2a), welches mittlerweile bei ca. 25 % aller Stämme auftritt [56]. Penicilline wirken auf die Zellteilung der Bakterien abtötend, indem sie die Synthese der Zellwand behindern und eine osmotische Lyse der Bakterien auslösen. Das Penicillin-Bindeprotein wird durch eine spezifische Methicillin-Resistenzdeterminante *mecA* kodiert, welche eine geringe Affinität zum β -Lactam-Ring hat. Somit können Antibiotika nicht an das Protein binden, um ihre Wirkung zu entfalten. MRSA kann als ein sich kontinuierlich weiterentwickelnder Erreger angesehen werden [7]. Bereits Ende der 1940er Jahre berichteten Krankenhäuser in Großbritannien und den USA, dass 50 % aller klinisch vorkommenden *S.-aureus*-Stämme Resistenzen gegen Penicillin entwickelt hatten [3]. Kurz nach der Einführung der ersten Isoxazolylpenicilline wurde bereits 1961 der erste Methicillin-resistente *S.-aureus*-Stamm identifiziert [2, 5]. In den letzten 40 Jahren haben sich MRSA-Infektionen in Krankenhäusern weltweit beständig verbreitet, so dass sich regelrechte MRSA-Endemien entwickelt haben, welche insbesondere Patienten mit chronischen Wunden und Verbrennungswunden gefährden [21]. Laut dem National-Nosocomial-Infections-Surveillance-(NNIS-)System-Report sind in den USA mittlerweile nahezu 60 % aller *S.-aureus*-Isolate gegen Methicillin, Oxacillin und Nafcillin resistent [87].

In den USA war MRSA im Jahr 2005 für 94.000 lebensbedrohliche Infektionen und insgesamt 18.650 Todesfälle verantwortlich [59]. Allein in Deutschland stieg die Methicillin-Resistenz von 12,5 % im Jahr 2000 auf über 20 % im Jahr 2005 an [95]. Im Jahr 2002 wurde bei der Behandlung eines diabetischen Fußes Ulcus in den USA der erste Vancomycin-resistente *S.-aureus*-(VRSA)-Stamm nachgewiesen [55]. Drei Jahre später dokumentierte man erstmals

gegen Linezolid resistente MRSA-Stämme der Linie „Barnim-MRSA“ im Rahmen einer Wundinfektion in einem hessischen Krankenhaus [58].

1.4.2 *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektionen

Pseudomonas aeruginosa (von lat. *aerugo*, ‚Grünspan‘) ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges, bewegliches Bakterium mit einer Größe von ca. 2–4 µm [56]. Das komplette Genom des Stammes PAO1 wurde im Jahre 2000 vollständig sequenziert und ist mit 6,3 Millionen Basenpaaren eines der größten unter den bisher sequenzierten Bakteriengenomen [107].

P. aeruginosa besitzt viele unverwechselbare Eigenschaften. So bezieht sich die Namensgebung des Bakteriums auf die charakteristische blau-grüne Färbung des Eiters bei eitrigen Infektionskrankheiten, und durch die Bildung von Aminoacetophenon entsteht der charakteristische süßlich-aromatische Duft, der sich häufig bereits diagnostisch am Krankenbett feststellen lässt [56]. Das Bakterium ist ein weit verbreiteter Boden- und Wasserkeim (Nasskeim) mit geringen Nährstoffansprüchen und einer hohen Resistenz gegenüber



Abbildung 4: *Pseudomonas aeruginosa*. Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 500 nm

Umwelteinflüssen. Hierzu gehören unter anderem Wasserleitungen, Schläuche von Beatmungs- und Inhalationsgeräten, Luftbefeuchter und sogar Desinfektionslösungen wie auch destilliertes Wasser [56, 115]. *P. aeruginosa* ist ein opportunistisches Bakterium und verfügt über ein sehr breites Wirkspektrum, zu dem Pflanzen, Tiere und Menschen zählen [11].

Besonders kritisch sind *P.-aeruginosa*-Infektionen im Krankenhausbereich, da die Bakterien über direkten Patientenkontakt oder über unzureichend sterilisiertes Material an das Pflegepersonal übertragen werden können. *P. aeruginosa* ist eines der wichtigsten und am meisten berücksichtigten Bakterien in der Differentialdiagnose von gramnegativen Infektionen. Wie auch *S. aureus* besitzen die meisten *P.-aeruginosa*-Stämme verschiedenste Virulenzfaktoren,

zu denen Exotoxine und Enzyme zählen [98]. Durch die Bildung von Biofilmen, welche die Keime umschließen, schirmen sich die Bakterien nicht nur gegen Antibiotika ab, sondern unterdrücken auch das Aufspüren der Erreger durch Zellen des menschlichen Immunsystems [74]. Laut KISS gehört *P. aeruginosa* mit 18,1 % zu den zweithäufigsten Erregern nosokomialer Infektionen [77]. Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* mit 57 % der am häufigsten isolierte Organismus von Patienten mit Verbrennungswunden [26] und häufig vergesellschaftet mit dem Auftreten einer Bakteriämie. In einer Studie mit 5.882 Patienten mit Verbrennungen, die über einen Zeitraum von 25 Jahren in Verbrennungszentren eingeliefert wurden, kam es in insgesamt 9 % der Fälle zu einer massiven Bakteriämie aufgrund von *P.-aeruginosa*-Infektionen [79].

Auch *P. aeruginosa* stellt mit einer zunehmenden Resistenzentwicklung ein großes Problem in der Therapie von Wundinfektionen dar. Das Bakterium ist in über 90 % der Fälle resistent gegenüber Antibiotika wie Gentamicin, Carbenicillin, Cephalothin und Ceftazidime [26, 102]. Allein durch den Erwerb eines Genabschnittes (Integron), ausgestattet mit den Genen für eine β -Lactamase und ein Aminoglykosid-modifiziertes Enzym, kann ein *P.-aeruginosa*-Stamm mit multipler Resistenz entstehen, demgegenüber sogar teilweise kein gängiges Antibiotikum mehr eingesetzt werden kann [26].

1.5 THERAPIEMÖGLICHKEITEN, LIMITATIONEN UND NEUE OPTIONEN

Aufgrund der dramatischen epidemiologischen Veränderungen von Methicillin-resistenten *S. aureus* und *P. aeruginosa* ist die effiziente Therapie von Wundinfektionen äußerst schwierig geworden.

Trotz steigender Resistenzentwicklungen und massiven Nebenwirkungen ist die systemische Antibiotikatherapie nach wie vor Goldstandard in der Behandlung von Wundinfektionen [35]. Als Mittel der ersten Wahl in der Behandlung von MRSA-Infektionen gilt das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin (Vancomycin®). Vancomycin® hemmt die Zellwandsynthese grampositiver Erreger, indem es mit den endständigen L-Lysin-D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des bakteriellen Zellwandbestandteils Murein einen Komplex bildet. Die Problematik in der

Vancomycin-Therapie ist jedoch nicht nur die meist unzureichende Gewebepenetration bei oberflächlichen Wundinfektionen, sondern auch die kontinuierlich steigende minimale Hemmkonzentration (MHK) und somit fortschreitende Resistenzentwicklung gegen *S. aureus* [35]. Darüber hinaus muss die Dosierung bei 2 x 1000 mg i.v./Tag liegen und über einen Zeitraum von mindestens 2–3 Wochen erfolgen, um einen effizienten antimikrobiellen Effekt zu erhalten [22]. Des Weiteren ist Vancomycin[®] aufgrund der bekannten Nephrotoxizität nur begrenzt einsetzbar und wegen der notwendigen Dosishöhe häufig mit Nebenwirkungen assoziiert. Obwohl Vancomycin[®] als das derzeit am häufigsten verwendete Antibiotikum in der Behandlung von schweren MRSA-Infektionen gilt und lange als die *last line of defense* angesehen wurde, ist es heutzutage zu einem suboptimalen therapeutischen Mittel in ausgewählten klinischen Umgebungen geworden [108]. Seit einigen Jahren gilt nun Linezolid (Zyvoxid[®]) als wichtigstes Reserveantibiotikum in der Behandlung von MRSA-Infektionen. Linezolid ist ein relativ neues Antibiotikum aus der Gruppe der Oxazolidinone. Es hemmt den Initiationskomplex an der 50S-ribosomalen Untereinheit und wirkt so über eine initiale Inhibierung bakteriostatisch und bakterizid gegen grampositive Erreger [22, 65, 91]. Bedingt durch diesen Wirkmechanismus sind Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika seltener zu befürchten [22, 45]. Linezolid kann sowohl parenteral oder oral bei einer Bioverfügbarkeit von nahezu 100 % verabreicht werden. Auch hier liegt die Dosierung für MRSA-Infektionen mit 2 x 600 mg p.o., i.v./Tag über einen Zeitraum von 2–3 Wochen sehr hoch [22]. Trotz der guten Wirksamkeit gegenüber MRSA-Infektionen ist der Nutzen von Linezolid aufgrund enormer Kosten des Präparats, hoher Toxizität und bereits beschriebener Resistenzen gegenüber *S.-aureus*-Stämmen limitiert [105].

In Bezug auf die Behandlung von *P.-aeruginosa*-Infektionen waren Aminoglykosid-Antibiotika wie Gentamicin (Refobacin[®]) als systemische Therapie lange Zeit das Mittel der Wahl [62]. Gentamicin behindert das Ablesen der mRNA an den Ribosomen durch Bindung an die 30S-Untereinheit. So wird die Proteinsynthese der Bakterien gehemmt [65]. Jedoch wird es aufgrund der massiven Nebenwirkungen, wie Oto- und Nephrotoxizität, nur noch als Notfallmedikament für schwere bakterielle und nosokomiale Infektionen

eingesetzt. Aus diesen Gründen und der zunehmenden Resistenzentwicklung wird Gentamicin zum primären Anteil nur noch als topische Applikation in Form von Augentropfen (Gentamytrex[®]) und Augen- und Hautsalben eingesetzt [26, 65].

Die Gemeinsamkeiten der meisten systemisch applizierten Antibiotika in der Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen sind die steigende Resistenzentwicklung und die schweren Nebenwirkungen aufgrund der Notwendigkeit hoher therapeutischer Konzentrationen [71, 78]. Weiterhin haben die meisten systemisch applizierten Therapeutika eine schlechte Gewebepenetration [35], wie z.B. in Verbrennungswunden, wo die Blutgefäße, welche normalerweise den Antibiotikawirkstoff zur Wunde transportieren, zerstört sind.

Bei der topischen Therapie hingegen kann das Antibiotikum direkt und unter Umgehung der Notwendigkeit eines intakten Blutversorgungssystems auf die Wunde appliziert werden [88]. Folglich hat die topische Therapie den Vorteil, Defizite bei der systemischen Therapie zu umgehen und eine erhöhte Zielkonzentration des jeweilig applizierten Antibiotikums zu gewährleisten. Somit ist der klinische Gebrauch von topischen Antibiotika als äußerst wichtig anzusehen, obgleich die klinische Verfügbarkeit limitiert ist.

Das einzige in Deutschland und den USA zugelassene topische Antibiotikum für die Erregerelimination von MRSA ist Mupirocin (Turixin[®]), allerdings ist es beschränkt auf die Anwendung im Nasenbereich [78]. Die nasale Sanierung soll eine Reduzierung der Kolonisation an anderen Körperstellen nach sich ziehen, dies vor allem bei Epidemien und Patienten mit hohem Risiko für eine mögliche MRSA-Infektion [57]. Mupirocin ist ein Stoffwechselprodukt des Bakterienstammes *P. fluorescens* und in der Lage, die Isoleucyl-tRNA-Synthese der Staphylokokken zu hemmen. Auf diese Weise wird die bakterielle Proteinsynthese paralytisch. Problematisch ist jedoch zum einen, dass in Langzeitbeobachtungen die dauerhafte Eradikation des Erregers nach Therapie mit Mupirocin lediglich bei einem Teil der Patienten gelang [49]. Zum anderen sind bereits in mehreren Studien Resistenzen gegenüber *S. aureus* beschrieben worden [27].

Ein weiteres und gravierendes Problem ist, dass seit dem Jahre 2000 nur drei neue Klassen bzw. Subklassen von Antibiotika zugelassen wurden, zum einen gegen die Behandlung von grampositiven Erregern, und zwar das Oxazolidinon Linezolid und das zyklische Lipopeptid Daptomycin, und zum anderen das Glycylcyclin Tigecyclin mit einem breiteren Wirkspektrum [32, 89]. Bis heute ist kein Breitspektrumantibiotikum für die Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen zugelassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Problematik von Haut- und Weichteilinfektionen im Zusammenhang mit der schlechten Anwendbarkeit von Antibiotika und die zunehmende Resistenzentwicklung von *S. aureus* und *P. aeruginosa* gegenüber herkömmlichen Antibiotika die erfolgreiche Therapie im klinischen Alltag massiv erschweren. Dieses zunehmende medizinische und sozioökonomische Problem führt nicht nur zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt, sondern auch zu mehr Diagnostik- und Behandlungsaufwand und ist somit mit enormen Mehrkosten für die jeweilige Klinik und das gesamte Gesundheitssystem verbunden [36]. Folglich ist es dringend erforderlich, neue Strategien, wie z.B. die topische Therapie, in der Bekämpfung von Wundinfektionen und weitere Möglichkeiten zur aktiven Verbesserung der Wundheilung zu entwickeln.

1.6 TOPISCHE APPLIKATION VON MOXIFLOXACIN ALS NEUES THERAPIEREGIME?

Moxifloxacin (Avelox[®], Bayer, Deutschland) gehört zu den so genannten Chinolonen (Gyrase-Hemmer), einer großen Gruppe von vollsynthetischen antibakteriellen Substanzen. Moxifloxacin wirkt bakterizid durch die Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II und Topoisomerase IV (DNS-Gyrase), die für die DNS-Replikation und Transkription in der bakteriellen Zelle verantwortlich sind [24, 83]. Die Entwicklung der Gyrase-Hemmer begann 1962 mit der Einführung der Nalixidinsäure, als Therapeutikum von Harnwegsinfektionen [72]. Heute haben die Nalixidinsäure und ihre Weiterentwicklungen (Pipemidsäure, Cinoxacin und Rosoxacin) aufgrund der schlechten Pharmakokinetik, geringen Aktivität und der Tendenz einer schnellen

Resistenzentwicklung jedoch keine Bedeutung mehr in der klinischen Anwendung. Mit der Entwicklung von Norfloxacin im Jahre 1980 durch Koga *et al.* wurde jedoch der Grundstein für die Entwicklung der Fluorochinolone gelegt [66]. Die Weiterentwicklung der Chinolone hält bis heute stetig an, um der steigenden Resistenzentwicklung bei Bakterien entgegenzuwirken. Chemisch gesehen sind es die Chinolone, Chinolon-Carbonsäuren oder Aza-Analoga, welche gut gewebe- und liquorgängig sind. Die Chinolone werden gemäß der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in insgesamt vier Gruppen eingeteilt. Moxifloxacin gehört der vierten Gruppe an, wurde von der Firma Bayer entwickelt und kam 1999 unter dem Namen Avelox[®] auf den Markt [83].

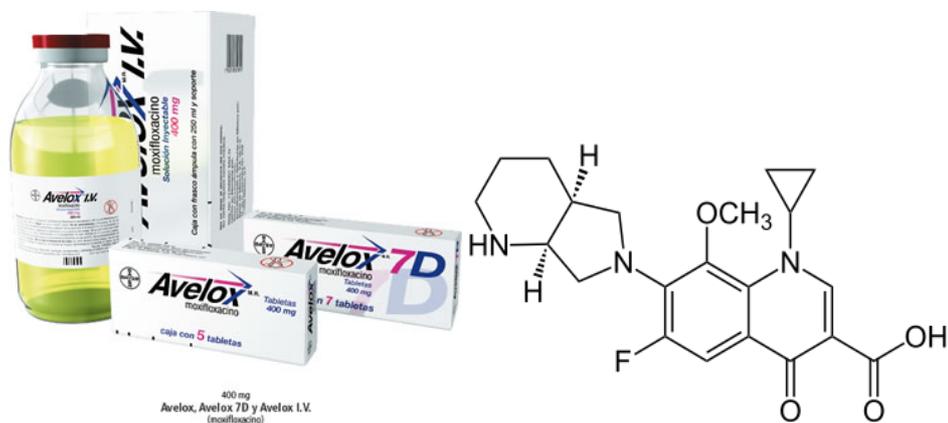


Abbildung 5: Kommerziell erhältliches Moxifloxacin (Avelox[®]), Strukturformel Moxifloxacin

Moxifloxacin fällt unter die Breitspektrumantibiotika und ist gut gegen grampositive Bakterien, wie Staphylo-, Strepto-, Pneumo- und Enterokokken, gramnegative und atypische Erreger wirksam. Darüber hinaus zeichnet sich Moxifloxacin über eine hervorragende Pharmakokinetik, gute Bioverfügbarkeit (ca. 90 %) und wenig Nebenwirkungen aus [6, 83]. Es wird unter anderem gegen Atemwegsinfektionen, wie ambulant erworbene Pneumonien, exazerbierte COPD, lebensgefährliche intraabdominale Infektionen, unkomplizierte und komplizierte Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt, da es über eine sehr gute Gewebegängigkeit verfügt [84]. In Zulassungsstudien von Muijsers *et al.* mit insgesamt 401 Patienten zeigte Moxifloxacin nach oraler Applikation Heilungsraten von unkomplizierten Haut- und Weichteilinfektion in 84 % der Fälle [85]. Nach oraler Gabe von Moxifloxacin wird es zu 90 %

resorbiert und erreicht nach i.v. Applikation von 400 mg Plasmawerte von ca. 4 mg/l nach 0,5–4 Stunden. Die Tagesdosis von Moxifloxacin beträgt 400 mg und wird im Normalfall über 10 Tage verabreicht. Es liegt zu über 40 % an Serumalbumin gebunden vor und wird mit einer Halbwertszeit von 12–13 Stunden zu 40 % renal und 60 % biliär eliminiert. Die Halbwertszeit von ca. 12 Stunden ermöglicht somit die tägliche Einmalgabe. Eine Dosisanpassung bei eingeschränkter Nierenfunktion ist nicht notwendig [68, 83]. Die Grenzwertkonzentrationen für Sensibilität und Resistenz gegen Moxifloxacin liegen wie bei fast allen Fluorochinolonen bei 1,0 µg/ml und 4,0 µg/ml. Folglich sind alle Bakterien mit einer minimalen Hemmkonzentration von > 1,0 µg/ml und < 4,0 µg/ml intermediär empfindlich und alle Erreger mit einem MHK-Wert von $\geq 4,0$ µg/ml resistent gegenüber Moxifloxacin [119].

Somit kann Moxifloxacin aufgrund seines großen Wirkspektrums gegen grampositive und gramnegative Erreger, der hohen Bioverfügbarkeit, der minimalen Nebenwirkungen und vor allem aufgrund der guten Gewebepenetration als ein ideales Antibiotikum für die topische Therapie angesehen werden.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Angesichts der schlechten Anwendbarkeit von Antibiotika und der zunehmenden Resistenzentwicklung von *S. aureus* und *P. aeruginosa* gegenüber herkömmlichen Antibiotika in der Therapie von Haut- und Weichteilinfektionen sowie des wachsenden finanziellen und sozioökonomischen Drucks wird immer deutlicher, dass neue kosteneffektive Therapiealternativen gefunden werden müssen. Ziel dieser vorklinischen Studie war die Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit von topisch appliziertem Moxifloxacin im Vergleich zu einem Trägerkontrollengel, Mupirocin, Linezolid und Gentamicin, unter Zuhilfenahme eines porcinen Infektions- und murinen Verbrennungsmodells.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 AGARPLATTENFERTIGUNG

Mueller-Hinton-(MH-)Agarplatten mit 5 % Schafsblut wurden von der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Mannitol-Agarplatten und Brillance-MRSA-Agarplatten (Selektivagar für MRSA) von der Firma Oxoid, Wesel, Deutschland bezogen. Die Pseudomonas-Isolationsagarplatten (PIA) wurden gemäß des Herstellers (DIFCO, ISO 9000 registered, Becton Dickinson & Spars Company, Maryland 21152 USA) hergestellt. Hierzu wurden 45 g des Pseudomonas-Isolationsagarpulvers mit 960 ml Millipore Wasser (Milli-Q Plus, Ultra Pure Water System) und 20 ml Glycerin (Sigma, Steinheim, Deutschland) gemischt und in 1l-Glasflaschen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlung wurden jeweils 13 ml der ca. 60 °C heißen Lösung in sterile Einweg-Petrischalen mit Entlüftungsnocken (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegossen.

2.2 BAKTERIENKULTUREN

Einen Tag vor dem jeweiligen Infektionszeitpunkt wurde entweder eine Übernachtschüttelkultur von *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in 5 ml Luria-Bertani (LB) Broth Medium (IDGLPC, Lancashire, Großbritannien) oder eine Übernachtschüttelkultur von MRSA (CMRSA-4, zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Gatermann, Ruhr Universität Bochum, Deutschland) in 5 ml Mueller-Hinton (MH) Broth (Oxoid, Wesel, Deutschland) angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am Morgen des jeweiligen Infektionstages wurden die Übernachtschüttelkulturen in 45 ml LB-Medium oder 45 ml MH-Medium überführt und für weitere 2,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, um eine exponentielle Wachstumsphase der Bakterien zu erreichen. Die jeweilige Bakteriensuspension wurde danach zentrifugiert (10 min, 4° C, 880, Megafuge R 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde je nach Trübung in 5–10 ml Phosphat-gepufferter

Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und die optische Dichte bei (OD_{600nm}) im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Anschließend wurde die Bakterienkonzentration mit der folgenden Formel in Kolonienbildende-Einheiten (CFU) pro ml PBS errechnet:

$$\text{CFU/ml} = \text{OD600nm} \times 2,5 \times 10^8 \text{ (Bakterien)}$$

Die Bakteriensuspension wurde mit PBS auf 1×10^8 Bakterien in 250 μl PBS verdünnt, zu jeweils 250 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und auf Eis gelagert, um weiteres Wachstum bis zum Zeitpunkt der Verwendung zu unterbinden.

2.3 KONTROLLAUSSTRICH

Zur Kontrolle der gemessenen Bakterienkonzentration und der Vitalität der verwendeten Bakterien wurde die jeweilige Suspension seriell verdünnt und jeweils drei Kontrollausstriche der Verdünnungsstufen 1:100.000, 1:1.000.000 und 1:10.000.000 mit je 10 μl auf entweder Pseudomonas-Isolationsagar oder MRSA-Selektivagar angefertigt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am Folgetag ausgezählt.

2.4 STERILISATION

Alle hitzestabilen Lösungen, Gefäße, Operationsbestecke und Werkzeuge wurden in einem Autoklav (Varioklav©, Zyclondampf, H&P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) mit einem Wasserdampfdruck von 2 bar bei 121 °C 20 Minuten lang sterilisiert. Hitzeinstabile Substanzen wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 μm steril filtriert. Nach Auswertung bzw. Benutzung wurden alle potentiell kontaminierten Verbrauchsmaterialien sterilisiert und regelmäßig entsorgt.

2.5 BESTIMMUNG VON MHK UND MBK MITTELS MICROBROTH-DILUTION ASSAY

Die Microbroth-Dilution Assays (MDA) wurden nach den Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, Wayne, PA 19087, USA) durchgeführt. Alle in dieser Studie benutzten Antibiotika (Moxifloxacin, Mupirocin, Linezolid und Gentamicin) wurden auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* und MRSA getestet. Zur Herstellung von Bakteriensuspensionen wurden Einzelkolonien von Agarplatten gepickt, in Erlenmeyerkolben mit je 10 ml Mueller-Hinton-Broth überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen im Maßstab 1:20 (50 µl der Kultur plus 950 µl MH-Broth) verdünnt und die optische Dichte bei OD₆₀₀ gemessen, um eine Bakteriensuspension herzustellen, die 4 x 10⁵ CFU/ml enthält.

Die einzelnen Antibiotika wurden in 0,9 % NaCl gelöst, um anschließend eine zweifach serielle Verdünnungsreihe herzustellen. Danach wurden 100 µl der verdünnten Bakterienkulturen mit 11 µl der seriell verdünnten Antibiotika (Endkonzentration 0,1 g/l–97,65625 ng/l) in die 96 Well-Mikrotiterplatten (Ushape, Greiner, Solingen, Deutschland) pipettiert und für 16–18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die minimale Hemmkonzentration (MHK) zu bestimmen, wurde das letzte Well ohne sichtbares Wachstum abgelesen. Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) wurden aus den Wells der MHK, der 2-fachen MHK und der 4-fachen MHK 10 µl in frisches Medium (100 µl MH-Broth) überführt und erneut über Nacht inkubiert. Das letzte klare Well entsprach der MBK.

2.6 THERAPEUTIKA

Die Standard-Gel-Rezeptur (Bayer Innovation GmbH, Chargennummer: N3922A02) wurde als Träger-Kontroll-Gel bei allen Versuchen benutzt und diente darüber hinaus als Trägersubstanz für die in Pulverform vorliegenden Antibiotika. 0,1 % Moxifloxacin (Bayer Innovation GmbH; Chargennummer: BX01X6E), 0,1 % Mupirocin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, M7694;

Chargennummer: 085K4701) und 0,1 % Linezolid (Bayer Innovation GmbH; Chargennummer: 19/8746) wurden gemeinsam in der Standard-Gel-Rezeptur gelöst, indem die verschiedenen Pulver abgewogen und in ein steriles 50ml-Zentrifugenröhrchen (TPP, Biochrom, Berlin, Deutschland) zu dem o.g. Kontrollgel gegeben wurden. Anschließend wurde die gewonnene Lösung mit Hilfe eines Vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries (Si), Bohemia, USA) so lange geschüttelt, bis sich alle Komponenten komplett in dem Gel aufgelöst hatten, zentrifugiert (4000 rpm/2 min) und bis zur Benutzung bei 4 °C auf Eis gelagert. Die jeweiligen Lösungen wurden an jedem Therapietag neu hergestellt, um eine immer gleichbleibende Qualität zu garantieren. 2 % Mupirocin (Infectopyroderm[®], InfectoPharm, Heppenheim, Deutschland) und 0,3 % Gentamicin (MedPhano, Rüttersdorf, Deutschland) wurden als kommerziell erhältliche Salben in der durch die Pharmaunternehmen festgelegten Zusammensetzung benutzt.

2.7 TIERHALTUNG UND VORBEREITUNG

Die Tierversuche wurden gemäß der Tierschutzrichtlinien der Bundesrepublik Deutschland sowie der Genehmigung des Versuchsvorhaben gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz (AZ: 50.8720 Nr. 3.71) durchgeführt. Alle Tiere (Göttinger Miniaturschweine, Ellegaard, Dalmose, Dänemark und Sprague-Dawley-Ratten, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) wurden mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn im Tierstall der BG Universitätskliniken Bergmannsheil (Ruhr-Universität Bochum, Deutschland) eingestallt. Während dieser Zeit wurden sie täglich von den beteiligten Experimentatoren gesichtet, um sie an die Umgebung und die Personen zu gewöhnen.

2.7.1 Göttinger Miniaturschweine

Die weiblichen Göttinger Miniaturschweine (n=3) waren am Liefertag ca. 6 Monate alt und hatten ein Gewicht von 15–20 kg. Alle Miniaturschweine wurden in speziell dafür vorgesehenen Stallungen bei ca. 20–25 °C Raumtemperatur, einer Luftfeuchtigkeit von 65 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus bei kontrolliertem Zugang zu einem speziellen Schweinefutter (Ssniff MPig-H,

Ssniff, Soest, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Die Tiere wurden einzeln gehalten und engmaschig von den Experimentatoren und Tierpflegern überwacht. Jede Box wurde täglich gereinigt und mit neuem Stroh versehen. Nach Versuchsende wurden die Miniaturschweine in Vollnarkose durch eine intravenöse Injektion von T61 (Bayer, Leverkusen, Deutschland) bei einer Dosis von 1 ml/5 kg Körpergewicht (KG) euthanasiert.

2.7.2 Sprague-Dawley-Ratten

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (n=80) mit einem Anfangsgewicht von ca. 150 g wurden vor den Versuchen zu jeweils fünf Tieren in einem Makrolonkäfig (Typ IV 60 cm x 40 cm) untergebracht, was für die sozialen Tiere wichtig ist. Ab dem Verbrennungstag mussten die Tiere jedoch aus Kontaminationsgründen in eine Einzelhaltung überführt werden. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, wurden bei 22 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit und einem kontinuierlichen 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Während der Einzelhaltung wurden die Tiere zwei- bis dreimal pro Woche in gereinigte Käfige mit frischer Einstreu umgesetzt und auf einer täglichen Basis in Zusammenarbeit mit den Tierpflegern engmaschig überwacht. Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Gewicht von 220–260 g. Nach Versuchsende wurden die Sprague-Dawley-Ratten in Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von 1 ml Narcoren (Phenobarbital-Natrium, Athen, USA) euthanasiert.

2.8 PORCINES WUNDINFEKTIONSMODELL

2.8.1 Zeitlicher Versuchsablauf

Tag -10:	Implantation der BO-Wundkammern
Tag -3:	Infektion der Wunden
<u>Tag 0:</u>	Probengewinnung, Randomisierung und 1. Applikation
Tag 2:	Probengewinnung und 2. Applikation
Tag 4:	Probengewinnung und 3. Applikation
Tag 7:	Probengewinnung und 4. Applikation
Tag 9:	Probengewinnung und 5. Applikation
Tag 11:	Probengewinnung und 6. Applikation
Tag 14:	Probengewinnung, Euthanasie und Probenentnahme

2.8.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Am Tag der Wundsetzung bzw. Implantation (Tag -10) wurden die Tiere mittels einer intramuskulären Injektion von 1 mg/kg KG Midazolam (Ratiopharm, Ulm Deutschland), 10 mg/kg KG Ketamin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 0,05 mg/kg KG Atropin (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) sediert/narkotisiert, um sie anschließend zu wiegen und stressarm in den Operationssaal überführen zu können. Dort wurde den Tieren ein intravenöser Zugang über die Ohrvene gelegt, um 0,9%ige Kochsalzlösung infundieren und Medikamente applizieren zu können, gefolgt von einer inhalativen Erhaltungsnarkose mit Isofluran 1–1,5 % (Forene[®], Abbott, Wiesbaden, Deutschland), die mit einem 30%igen Sauerstoff-Luftgemisch über eine eng sitzende Schnauzenmaske für Hunde zugeführt wurde. Zusätzlich zur Inhalationsnarkose wurde einmalig Propofol 2 mg/kg KG i.v. verabreicht und 0,75 mg Fentanyl (Curamed Pharma, Karlsruhe, Deutschland) intramuskulär appliziert, um die Tiere suffizient und ohne Schmerzen einleiten zu können.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde mit einer elektrischen Heizunterlage stabilisiert und die Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz kontinuierlich überwacht und dokumentiert. Die Haare am Rücken und an den Flanken der Tiere wurden mit einem elektrischen Schergerät (GT104, Aesculap, Melsungen, Deutschland) bis auf 5 mm gekürzt, mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) nach einer 10–15-minütigen Einwirkzeit

entfernt und im Anschluss mit Seife und Wasser gründlich abgewaschen. Während des gesamten Enthaarungsvorganges wurde mit großer Sorgfalt gearbeitet, um außerplanmäßige Hautschäden und daraus resultierende Entzündungsreaktionen zu vermeiden.

2.8.3 Implantation der BO-Wundkammern

Vor dem Start der Operation wurden der Rücken und die Flanken der Tiere mit einer Jodlösung (7,5 % Providone Iodine Scrub, S&M, Deutschland) gewaschen und für 20 min mit einer weiteren Jodlösung (10 % Providone Iodine Paint, S&M, Deutschland) zur Reduktion der lokalen Keimflora desinfiziert. Anschließend wurde das Areal steril abgedeckt und erneut unter sterilen Bedingungen mit Alkohol (70 % Isopropanol) abgewaschen. Die angewandten Antiseptika wurden ausgewählt, da sie keinen wesentlichen Einfluss auf die Wundheilung und die Reepithelialisierung haben [54]. Die zu implantierenden BO-Chamber-Wundkammern (BO-Chamber[®], WiMed, Bochum, Deutschland) sind ein zuverlässiges und reproduzierbares *In-vivo*-Modell für die Untersuchung von Wundheilungsstörungen, Wundinfektionen und neuer Therapiemöglichkeiten [104].

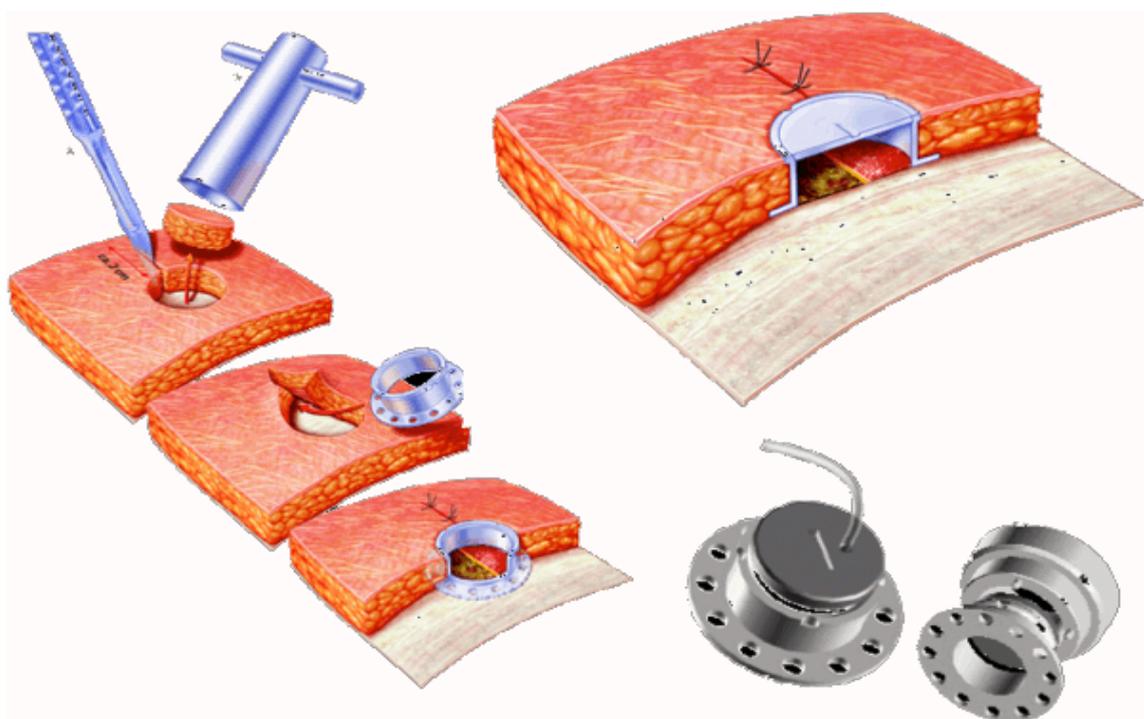


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Implantation einer BO-Chamber[®] [104]

Jede Kammer ist aus Titan gefertigt und hat einen zugehörigen Schraubverschluss. Die Abmessungen der Kammern sind folgende: Höhe: 14 mm; innerer Durchmesser: 25 mm; äußerer Durchmesser (ohne Basisplatte): 32 mm, äußerer Durchmesser (mit Basisplatte): 50 mm. Die Basisplatte jeder Kammer ist perforiert, um das Einwachsen von Granulationsgewebe zu erleichtern und somit die Kammer innerhalb der Haut zu stabilisieren. Die Kammern können mit Hilfe eines Schraubendrehers geöffnet bzw. verschlossen werden, um Medikamente applizieren oder Wundflüssigkeit ablassen zu können. Pro Schwein wurden jeweils 12 runde Wundflächen (25 mm Durchmesser) zwischen dem Schulterblatt und dem Beckenkamm mit einem sterilen chirurgischen Filzmarker eingezeichnet. Die Kammern wurden mit einem Abstand von mindestens 4,5 cm eingezeichnet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, und liegen in 4 Reihen parallel zur Wirbelsäule (2 Reihen pro Seite). Mit Hilfe eines speziell angefertigten BO-Chamber®-Rundskalpells, welches sicherstellt, dass jede Wunde exakt die

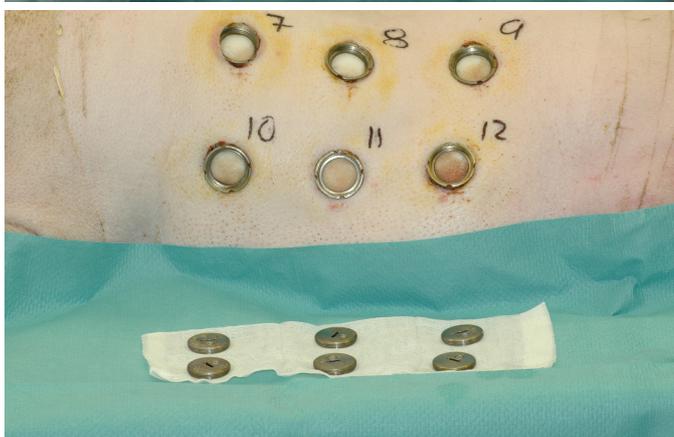


Abbildung 7: Implantation der BO-Chamber® unter sterilen Kautelen am Schweinemodell

gleich Größe hat, und einem Skalpell der Größe 11 (Aesculap, Melsungen, Deutschland) wurde das epidermale, dermale und subkutane Gewebe unter Erhaltung der darunter liegenden Muskelfaszie entfernt und das Randgewebe mittels stumpfer Präparation vorsichtig unterminiert. Eine Hämostase der Wunden wurde mit sterilen Kompressen oder bei größeren Blutungen mittels bipolarer Elektrokauterisation (Erbotom T400C, Erbe Elektromedizin GmbH,

Tübingen, Deutschland) erreicht. Um die Kammern unter der Haut platzieren zu können, wurden vertikale Inzisionen in der 12-Uhr-Position vorgenommen, die im Anschluss mit zwei Einzelknopfnähten wieder verschlossen wurden, so dass die BO-Kammern fest in der Haut fixiert waren.

Im Folgenden wurden zurechtgeschnittene PVA-Schwämme (Coldex[®], Velo, Reichertshofen, Deutschland) in den Kammern platziert, um das Granulationsgewebe zu konditionieren und Wundflüssigkeit zu sammeln. Anschließend wurden die Kammern verschlossen und die Wundränder mit Betaisodona-Salbe (Mundipharma, Limburg, Deutschland) behandelt. Die Tiere erhielten einen Verband aus den folgenden Materialien: Paraffingaze (Jelonet, Smith & Nephew, Lohfelden, Deutschland), sterile Kompressen (Hartmann, Heidenheim, Deutschland), Fixomull (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland), Rolta-soft (Hartmann, Heidenheim, Deutschland) und Peha-Haft (Hartmann, Heidenheim, Deutschland). Der Verband wurde mit Leukoplast (BSN medical, Hamburg, Deutschland) am Schulterblatt und Beckenkamm zirkumferent fixiert. Kurz vor Narkoseende wurde ein Fentanyl-Patch (Durogesic[®], Transdermales System 12 µg/h; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) retroaurikulär appliziert, um eine adäquate postoperative Schmerzmedikation zu gewährleisten. Die Tiere wurden zweimal am Tag von den Tierpflegern und Experimentatoren gesichtet und untersucht, um den Allgemeinzustand und eventuell auftretende postoperative Schmerzen der Tiere zu dokumentieren und zu therapieren.

2.8.4 Bakterielle Inokulation der Wunden

Am Infektionstag (Tag -3) wurden die Tiere erneut narkotisiert, der Verband entfernt, jede Wundkammer mit einem Schraubendreher unter sterilen Bedingungen geöffnet und der PVP-Schwamm (Coldex[®], Velo, Reichertshofen, Deutschland) entfernt. Jede Wunde wurde makroskopisch mit einer sterilen Kompresse gereinigt und fotodokumentiert. Im Anschluss wurde in jede Wundkammer eine zurechtgeschnittene und sterile Kompresse auf dem Wundboden platziert. Zwei der Schweine wurden mit 1×10^8 CFU MRSA verdünnt in 250 µl PBS pro Wunde, das dritte Schwein mit 1×10^8 CFU *P. aeruginosa* verdünnt in 250 µl PBS pro Wunde inokuliert. Anschließend wurde

jede Kammer mit einem neuen PVP-Schwamm (Coldex[®], Velo, Reichertshofen, Deutschland) bestückt und verschlossen.

2.8.5 Randomisierung und Gruppenverteilung

Die Tiere wurden in Testgruppen mit verschiedenen Zielsetzungen unterteilt, die Wundkammern im Anschluss randomisiert und wie folgt therapiert.

Hierbei galt $n=3$ Tiere; $n=12$ Untersuchungsareale/Kammern pro Tier/Gruppe.

Gruppe 1 / MRSA: Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen MRSA unter gleichen Bedingungen.

- Trägerkontrolle (n=3 Kammern)
- 0,1 % Linezolid (n=3 Kammern)
- 0,1 % Mupirocin (n=3 Kammern)
- 0,1 % Moxifloxacin (n=3 Kammern)

Gruppe 2 / MRSA: Wirksamkeit von Moxifloxacin im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Antibiotikasalben gegen MRSA.

- Trägerkontrolle (n=4 Kammern)
- 2 % Mupirocin (n=4 Kammern)
- 0,1 % Moxifloxacin (n=4 Kammern)

Gruppe 3 / *P. aeruginosa*: Wirksamkeit von Moxifloxacin im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Antibiotikasalben gegen *P. aeruginosa*.

- Trägerkontrolle (n=4 Kammern)
- 0,1 % Moxifloxacin (n=4 Kammern)
- 0,3 % Gentamicin (n=4 Kammern)

2.8.6 Probengewinnung und Applikation

Nachdem sich drei Tage nach Inokulation (Tag 0) eine stabile Wundinfektion entwickeln konnte, wurden die Tiere erneut narkotisiert, der Verband entfernt



und die Wundflüssigkeit asserviert, indem die PVP-Schwämme jeder Kammer einzeln und unter sterilen Bedingungen in separate Zentrifugenröhrchen (50 ml; TPP, Biochrom, Berlin, Deutschland) ausgepresst wurden. Anschließend wurde 1 ml der jeweiligen Gel-Rezeptur oder der kommerziellen Salben nach dem Schema der oben beschriebenen Gruppen- und Kammerverteilung auf einen neuen und sterilen PVP-Schwamm pipettiert. Dieser wurde dann mit der jeweiligen Substanz zur infizierten Wundfläche zeigend in der Kammer platziert. Diese Routine der Asservierung von Wundflüssigkeiten und topischen Therapie erfolgte an den Tagen

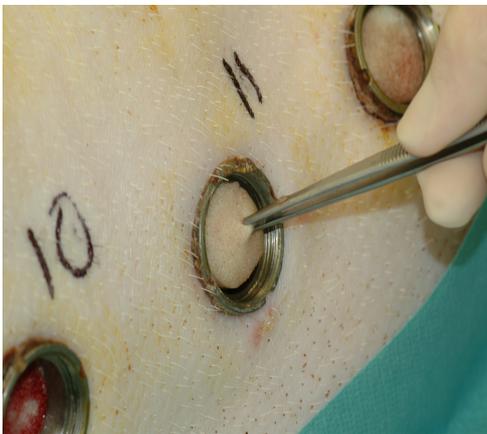


Abbildung 8: Applikation der jeweiligen Gel-Rezeptur auf PVP-Schwämme und anschließende Einlage in die BO-Chamber®

0, 2, 4, 7, 9 und 11. Am Tag 14 wurde nur Wundflüssigkeit entnommen, da keine weitere Applikation vorgesehen war. Bis zur weiteren quantitativen mikrobiologischen

Analytik wurden alle Proben auf Eis gelagert. An jedem dieser Tage fanden darüber hinaus eine Blutentnahme (Serum und EDTA) aus der *Vena subclavia* und eine makroskopische Fotodokumentation der Wunden statt.

2.8.7 Euthanasie und Gewebeprobenentnahme

Nach der letzten Wundflüssigkeits- und Blutentnahme (Tag 14) wurden die Tiere in Narkose durch eine intravenöse Injektion von T61 (Bayer, Leverkusen, Deutschland) bei einer Dosis von 1 ml/5 kg KG euthanasiert. Danach wurden aus jeder Kammer jeweils zwei Punch-Biopsien (6 mm Durchmesser; Stiefel, Offenbach, Deutschland) aus dem zentralen Wundbett entnommen. Die erste Biopsie wurde bis zur am gleichen Tag stattfindenden Homogenisation und

mikrobiologischen Analyse in ein 12ml-Flachbodenröhrchen (TPP, Berlin, Deutschland) überführt und die zweite Biopsie zur histologischen Auswertung in 5 % Formafix (PathoMed Logistik GmbH, Viersen, Deutschland) fixiert. Alle Proben wurden bei 4 °C auf Eis gelagert und direkt im Labor weiterverarbeitet.

2.9 RATTEN-VERBRENNUNGSINFEKTIONSMODELL

2.9.1 Zeitlicher Versuchsablauf

- Tag -2: Vorbereitung der Versuchstiere
- Tag -1: Verbrennungstrauma und Infektion
- Tag 0: Euthanasie von 5 mit MRSA infizierten Ratten (Bestimmung der Grundkeimzahl an Tag 0) und 1. Applikation
- Tag 1: Euthanasie von 17 mit MRSA infizierten Ratten (Bestimmung der Keimzahl an Tag 1 nach Infektion)
- Tag 2: 2. Applikation
- Tag 4: 3. Applikation
- Tag 6: 4. Applikation
- Tag 7: Euthanasie von 15 mit MRSA und 18 mit *P. aeruginosa* infizierten Ratten (Bestimmung der Keimzahl an Tag 7 nach Infektion)
- Tag 8: 5. Applikation
- Tag 10: 6. Applikation
- Tag 12: 7. Applikation
- Tag 14: Euthanasie von 16 mit MRSA infizierten Ratten (Bestimmung der Keimzahl an Tag 14 nach Infektion)

2.9.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn (Tag -2) erneut gewogen und erhielten anschließend eine Inhalationsnarkose. Die Einleitung erfolgte über 2–3 l/min O₂, 0,5–1 l/min N₂O und 3–5 Vol.-% Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und die Hauptnarkose über 0,4–0,5 l/min O₂, 0,5–1 l/min N₂O und 1–1,5 Vol.-% Isofluran. Anschließend wurde den narkotisierten Ratten mit einem elektrischen Schergerät (GT104, Aesculap, Melsungen, Deutschland) das Fell auf dem Rücken vom Nacken bis über den

Lendenwirbelbereich und seitlich entlang der Flanken auf 0,1 mm gekürzt und mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt-Beckinser, Mannheim, Deutschland) bei einer Einwirkzeit von 15 min und Abwaschen unter lauwarmem Wasser depiliert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere separiert und in einzelnen Makrolonkäfigen untergebracht.

2.9.3 Analgesie

In dieser Arbeit wurde ab dem Tag des Verbrennungstraumas besonders hoher Wert auf eine adäquate Schmerztherapie gelegt. Aus diesem Grund sind wir von einer sehr niedrigen Toleranzgrenze für Schmerzen ausgegangen und haben die Schmerztherapie über die in der Literatur beschriebenen üblichen Dosen hinaus großzügig gewählt [67]. Jedem Tier wurden jeweils 30 min vor Versuchsbeginn 0,04 ml (2 units) Temgesic® (Buprenorphinchlorid, Essex Pharma, München, Deutschland) s.c. in Abständen von 12 Stunden über die gesamte Versuchslaufzeit appliziert. Um dennoch etwaige Veränderungen frühzeitig zu bemerken, wurden die Ratten engmaschig von den Tierpflegern und Experimentatoren beobachtet.

2.9.4 Verbrennungstrauma und Infektion

Das in dieser Arbeit verwendete Ratten-Verbrennungsinfektionsmodell [60, 103] ist eine Weiterentwicklung des Ratten-Verbrennungsmodells [28]. Am Tag des Verbrennungstraumas (Tag -1) erhielten alle Tiere die oben erwähnte Analgesie. Frühestens eine Stunde später wurden die Tiere narkotisiert und die



Abbildung 9: Verbrennungstrauma (25 s/60 °C) im Wasserbad

longitudinale sowie sagittale Mittellinie des Rückens mit einem wasserfesten Stift (Edding®, Ahrensburg, Deutschland) markiert und in vier Quadranten unterteilt, um bei allen Tieren ein vergleichbares Hautareal zu verbrennen. Anschließend wurden die Tiere in einen speziell zurechtgeschnittenen Isolierschlauch (Kaiflex, Wilhelm Kaimann GmbH,

Hövelhof, Deutschland), welcher Aussparungen für alle vier Gliedmaßen



Abbildung 10: Applikation der mit 250 µl der jeweiligen Bakteriensuspension benetzten Wundgaze und Abdeckung mit Tegaderm

enthielt, so eingeschlossen, dass auf dem Rücken zwei gleich große Areale durch Aussparungen im Isolierschlauch freilagen, die somit unter Schonung anderer Körperareale in direkten Kontakt mit dem heißen Wasser treten konnten. Diese Areale lagen ca. 1,5 cm lateral der

Wirbelsäule und hatten eine Fläche von ca. 2,5 x 3,5 cm pro Seite. Die Tiere wurden im Isolierschlauch für 25 Sekunden und 60 °C Wassertemperatur im Bereich der beiden Aussparungen am Rücken verbrannt. Die dabei entstandene Verbrennung (2°) macht nach der Formel von Meeh von (Gesamtkörperoberfläche $\text{cm}^2 = 9,64 \times \text{Tiergewicht/g}$) [67, 104] ungefähr 5 % der gesamten Körperoberfläche eines jeden Tieres aus [40]. Nach der Verbrennung wurden die Tiere zügig aus dem Isolierschlauch befreit, gründlich abgetrocknet, mit Softasept® (Braun, Melsung, Deutschland) desinfiziert und die verbrannten Areale mit einem Filzstift markiert. Danach wurden diese mit einer sterilen Wundgaze (Johnson & Johnson, Gargrave, Großbritannien) bedeckt, die auf jeder Seite entweder mit 1×10^8 CFU MRSA oder 1×10^8 CFU *P. aeruginosa* in 250 µl Bakteriensuspension benetzt wurde. Um Kreuzkontamination zu vermeiden und die Wachstumsbedingungen der Bakterien zu verbessern, wurde der gesamte Rückenbereich mit Tegaderm® (6 x 7 cm, 3M Health Care, Borken, Deutschland) okklusiv verbunden. Danach wurde der Wundbereich mit Peha-Haft® (Hartmann, Heidenheim, Deutschland) umwickelt und durch 4 chirurgische Hautklammern (Visitat®, Weck Closure Systems, North Carolina, USA) am Tier fixiert.

2.9.5 Randomisierung und Gruppenverteilung

Jedes Tier erhielt zwei gleich behandelte Untersuchungsareale auf dem Rücken, die anschließend randomisiert und in folgende Testgruppen unterteilt wurden. Hierbei galt (n=71 Tiere, n=142 Untersuchungsareale). 5 Tiere wurden vor der ersten Therapie euthanasiert und tauchen somit nicht in den Therapiegruppen auf.

Gruppe 1 / MRSA

(n=48 Tiere, n=96 Untersuchungsareale pro Gruppe)

- Trägerkontrolle (n=13 Ratten)
- 0,1 % Moxifloxacin (n=17 Ratten)
- 0,1 % Linezolid (n= 3 Ratten)
- 0,1 % Mupirocin (n= 4 Ratten)
- 2 % Mupirocin (n=11 Ratten)

Gruppe 2 / *P. aeruginosa*

n=18 Tiere, n=36 Untersuchungsareale pro Gruppe)

- Trägerkontrolle (n=6 Ratten)
- 0,1 % Moxifloxacin (n=7 Ratten)
- 0,3 % Gentamicin (n=5 Ratten)

2.9.6 Applikation

Die Tiere wurden einzeln narkotisiert und behandelt, um einen reibungslosen Versuchsablauf zu gewährleisten. Vor der Applikation wurde jedem Tier mit einer Insulinspritze (Becton Dickinson, Basel, Schweiz) Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, um später ein großes Blutbild erstellen zu können. Anschließend wurde der Verband unter sterilen Bedingungen entfernt, die Wunde inspiziert und fotodokumentiert. In den Wundarealen wurde ein 1,5 x 1,5 cm großes Areal je Flanke (zwei Areale pro Tier) mit Filzstift markiert, auf welche die Applikation nach dem Schema der oben beschriebenen Gruppenverteilung erfolgte. Je Areal wurden 500 µl des entsprechenden Gels oder Salbe topisch auf eine neu aufgelegte und sterile Wundgaze appliziert. Unmittelbar nach erfolgter Applikation wurde der Wundbereich erneut mit Tegaderm® okklusiv verbunden und der oben beschriebene Standardverband angelegt. Die Routine der topischen Therapie, Blutentnahme und Fotodokumentation erfolgte an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 gemäß dem Therapieschema.

2.9.7 Gewebeentnahme

Zwei Tage post Infektion (Tag 0) wurden 5 mit MRSA infizierte Tiere vor der ersten topischen Applikation mit 1 ml Narcoren (Pentobarbital-Natrium, Athen, USA) euthanasiert, um die Grundkeimzahl an Tag 0 zu bestimmen. Der Verband wurde entfernt und die Wunde inspiziert. Die eingezeichneten 1,5 x 1,5 cm großen Areale wurden vorsichtig mittels steriler Pinzette, Schere und Skalpell exzidiert.

Histologische Proben wurden aus der Mitte dieser Areale herausgeschnitten und in 5 % Formafix (PathoMed Logistik GmbH, Viersen, Deutschland) fixiert. Das verbleibende Gewebe wurde quantitativ entnommen, gewogen (Sartorius, Göttingen, Deutschland) und in 12ml-Flachbodenröhrchen (TPP, Biochrom, Berlin, Deutschland) überführt. 24 Stunden nach der ersten Applikation wurden aus der Gruppe 1 / MRSA 17 Tiere (0,1 % Moxifloxacin n=5; 0,1 % Linezolid n=3; 2 % Mupirocin n=4; Trägerkontrolle n=5) aus dem Versuch genommen, um die Keimzahl an Tag 1 zu bestimmen. 6 Tage später wurden aus Gruppe 1 / MRSA 15 Tiere (0,1 % Moxifloxacin n=5; 2 % Mupirocin n=6; Trägerkontrolle n=4) und aus der Gruppe 2 / *P. aeruginosa* 18 Tiere (0,1 % Moxifloxacin n=7; 0,3 % Gentamicin n=5; Trägerkontrolle n=6) aus dem Versuch genommen, um die Keimzahl an Tag 7 zu bestimmen. 7 Tage später wurden aus der Gruppe 1 / MRSA 16 Tiere (0,1 % Moxifloxacin n=7; 2 % Mupirocin n=5; Trägerkontrolle n=4) aus dem Versuch genommen, um die Keimzahl an Tag 14 zu bestimmen. Alle Tiere wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten euthanasiert, das Gewebe wie oben beschrieben entnommen, bei 4 °C auf Eis gelagert und sofort im Labor weiterverarbeitet.



Abbildung 11: Probenentnahme

2.10 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE MIKROBIOLOGISCHE ANALYSE

2.10.1 Probenhomogenisation

Die Homogenisation der entnommenen Hautproben wurde mechanisch mit Hilfe eines rotierenden Stabhomogenisators (Polytron[®], PT3100, Kinematika, Luzern, Schweiz) durchgeführt. Hierzu wurden die gewonnenen Hautareale aus dem porcinen Wundinfektions- und dem Ratten-Verbrennungsinfektionsmodell mit 3 ml PBS aufgefüllt und mit dem Polytron[®] mechanisch bei 26.000 rpm unter Kühlung auf Eis und durch gleichmäßige Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Um mögliche Kreuzkontaminationen der Proben zu vermeiden, wurde das Messer nach jeder Homogenisation zunächst mechanisch und anschließend mit sterilem H₂O (Millipore GmbH, Schwabach, Deutschland) sowie Ethanol (70 % Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland) und abschließend erneut mit H₂O gereinigt. Im Anschluss wurden alle Proben wieder bei 4 °C auf Eis gelagert.

2.10.2 Verdünnungsreihe

In mit 900 µl PBS gefüllte Röhrchen wurden 100 µl des jeweiligen Homogenisats bzw. der Wundflüssigkeit überführt und somit eine 1:10-Verdünnung angelegt. Hiervon wurde eine serielle Verdünnungsreihe von 1:10–1:10000 vorgenommen. Zwischen den einzelnen Pipettiervorgängen wurden die Röhrchen verschlossen und auf dem Vortex durchgeschüttelt (Heidolph, Unimax 1010 Schüttler, Schwabach, Deutschland), um eine gleichmäßige Bakterienverteilung zu gewährleisten.

2.10.3 Ausplattierung

Die Verdünnungen 1:10 bis 1:10000 der Homogenisate und Wundflüssigkeiten wurden dann je nach Bakterienstamm auf Mannitol-Agarplatten (Selektivmedium zur Isolierung pathogener *Staphylokokken* und Mikrokokken) oder *Pseudomonas*-Isolationsagarplatten und unabhängig vom Bakterienstamm auf Mueller-Hinton-(MH-)Agarplatten +5 % Schafsblut in Triplikaten ausplattiert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 10 µl pro Agarplatte aufgebracht, mit einem Drigalskispatel und einer drehbaren Plattierhilfe verteilt und

anschließend für 18 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

2.10.4 Auszählung

Nach 18 Stunden wurden die Platten aus dem Brutschrank genommen. Die Auszählung der einzelnen Platten geschah manuell unter der Sterilbank (Modell 8511, Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland). Mit Hilfe der gezählten Kolonien erfolgte die Berechnung der Gesamtbakterienzahl in Relation zum Probengewicht. Alle Ergebnisse wurden als \log_{10} *Colony-Forming Units* pro g Wundgewebe (CFU/g) bzw. in \log_{10} *Colony-Forming Units* pro ml Wundflüssigkeit (CFU/ml) in den Graphen angegeben, wobei Keimzahlen $> 1 \times 10^5$ als eine manifeste bakterielle Infektion angesehen wurden [90, 96].

2.11 PERIPHERE BLUTANALYSE

Venöses Blut wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten entweder aus der *Vena subclavia* (Schwein) oder der Schwanzvene (Ratte) entnommen. Bei den Schweinen wurde sowohl ein EDTA- als auch ein Serum-Röhrchen, bei den Ratten nur ein kleines EDTA-Röhrchen entnommen. Ein kleines Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit) wurde mit Hilfe des Blood-Vet abc (SCIL Animal Care Company GmbH, Viernheim, Deutschland) erstellt. Bei den Proben der Ratten wurde das Blut aus den EDTA-Röhrchen quantitativ in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Um anschließend das Serum von den Blutzellen zu separieren, wurden die Röhrchen für 10 min bei 3500 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0, Heraeus, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde quantitativ entnommen, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

2.12 QUANTIFIZIERUNG VON MOXIFLOXACIN MITTELS LC-MS/MS

Blutseren, Wundflüssigkeiten und die homogenisierten Gewebeproben wurden zur Untersuchung der entsprechenden Moxifloxacin-Konzentrationen

herangezogen. Eine Sirocco-Proteinpräzipitationsplatte (Waters, Eschborn, Deutschland) wurde auf einer 1ml-96-Well-Sammelplatte platziert und jeweils 250 µl Internal Standard (Sparfloxacin, Fluka, Germany) und jeweils 100 µl der zuvor gewonnenen Proben hinzugefügt. Anschließend wurde die Proteinpräzipitationsplatte für insgesamt 1 min geschüttelt (Vibrax VXR, IKA, Staufen, Germany) und auf einer Vakuumkammer (Büchi Vacuum System B-178, Büchi, Flaviil, Schweiz) platziert. Die Flüssigkeitsmischung wurde im Anschluss unter Anlegen eines Vakuums (130 mbar für 2 min) in eine Sammelplatte filtriert. Das Filtrat wurde mit 200 µl wässriger Ameisensäure (5 %) (Sigma, Steinheim, Deutschland) verdünnt und anschließend in die Hohlräume der Sammelplatte pipettiert, mit Folie abgedichtet und für 2 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben in den LC-MS-Autosampler (HTC PAL, CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) und in das HPLC-MS/MS-System (*TSQ Quantum Ultra with H-ESI ionization interface*, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) injiziert. Die HPLC-Säule (C18 SunFire, Waters, Eschborn, Deutschland) wurde mit einem Wasser/Methanol-Gradienten, welcher 0,1 % Ameisensäure enthielt, hergestellt. Die Menge von Moxifloxacin wurde als µg/l ermittelt, wobei der Kalibrierbereich zwischen 10 µg/l (LLOQ) und 5.000 µg/l (ULOQ) lag. [Dieser Versuch wurde in Kooperation mit dem Institute of Analytic and Metabolic Science in Bergheim sowie der Bayer Innovation GmbH in Düsseldorf durchgeführt.]

2.13 HISTOLOGISCHE ANALYSE

Bei dem porcinen Wundinfektionsmodell wurden an Tag 14 Punch-Biopsien und bei dem Ratten-Verbrennungsinfektionsmodell an den Tagen 0, 1, 7 und 14 Gewebequerschnitte zur histologischen Analyse entnommen. Alle entnommenen Gewebeproben wurden in 5%-Formafix fixiert und bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum histologische Schnitte und routinemäßige Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbungen aller Gewebeproben angefertigt. Die histologische Begutachtung der Schnitte erfolgte durch zwei verschiedene und unabhängige Pathologen anhand der folgenden Kriterien. Es wurden die Dicke des Granulationsgewebes, die Anzahl der Kapillaren pro 10 Hauptgesichtsfelder,

welche eine 400-fache Vergrößerung repräsentieren, die Reepithelialisierung und Lymphozyteninfiltration ausgemessen und bestimmt. Im Anschluss wurden unter Berücksichtigung aller Schnitte Skalen erstellt, bei denen jeder einzelne Schnitt anhand der oben aufgeführten Kriterien bewertet worden ist.

2.14 RESISTENZTESTUNG DURCH AGARDIFFUSIONSMETHODE

Die asservierten Wundflüssigkeiten von Tag 14 aus den mit 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin therapierten Gruppen und die MRSA-Reinkultur wurden auf separate Mueller-Hinton-Agarplatten überführt und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden von jeder Agarplatte 4 bis 5 Kolonien mit einer sterilen Impföse aufgenommen, in separate Eppendorf-Röhrchen mit 5 ml steriler Kochsalzlösung überführt und bis zu einer Standard-Trübung (0,5 McFarland) suspendiert. Der 0,5-McFarland-Trübungsstandard ist vergleichbar mit einer bakteriellen Suspension von 10^8 CFU/ml. Diese Suspension diente als *Inoculum* für die Mueller-Hinton-Agarplatten, auf welche die Bakterienlösung mit einem sterilen Wattetupfer durch dreimaliges versetztes Ausstreichen aufgebracht wurde. Anschließend wurden auf jede der drei Agarplatten jeweils ein Moxifloxacin- und ein Mupirocin-Testplättchen (jeweils 5 µg) mit einer sterilen Pinzette gelegt und leicht aufgedrückt. Die Platten wurden bei 35 °C für 20 Stunden inkubiert und die Hemmhöfe, welche Aufschluss über die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber den getesteten Substanzen geben, ausgemessen. Die Agardiffusionsmethode und Interpretation der Hemmhofdurchmesser (sensibel, intermediär empfindlich, resistent) wurden nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (*performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard*, 9th ed. Document M2-A9, CLSI, Wayne, PA 19087, USA) durchgeführt.

2.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für alle statistischen Auswertungen wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen und Zeitpunkten mit der Analyse der Varianz (ANOVA) und dem unabhängigen Studenten-*t*-Test untersucht. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0,05$) festgelegt. Für die statistischen Auswertungen wurden SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) sowie Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) Software verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT

3.1.1 Microbroth-Dilution Assay

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK) wurden für alle in dieser Studie verwendeten Antibiotika (Moxifloxacin, Mupirocin, Linezolid und Gentamicin) mit einer seriellen Verdünnung von 0,2 mg/l bis 100 mg/l (Endkonzentration 0,1 g/l–97,65625 ng/l) gegen MRSA und *P. aeruginosa* nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, PA 19087, USA) bestimmt. Sowohl Linezolid als auch Mupirocin zeigten sich mit der gleichen MHK (1,25 mg/l) und MBK (25 mg/l) effektiv gegen MRSA, wohingegen die Wirksamkeit beider Antibiotika gegen *P. aeruginosa* mit einer MHK und MBK von jeweils > 100 mg/l als ineffektiv zu beurteilen ist. Im Vergleich dazu sind Moxifloxacin und Gentamicin sowohl gegen MRSA als auch gegen *P. aeruginosa* effektiv wirksam. Die MHK für Gentamicin gegen beide Bakterienstämme lag bei 0,78 mg/l, während die MBK gegen MRSA bei 0,78 mg/l und gegen *P. aeruginosa* bei 1,56 mg/l lag. Moxifloxacin zeigte eine MHK von 3,13 mg/l gegen MRSA und von 1,25 mg/l gegen *P. aeruginosa*, während die MBK gegen MRSA bei 25 mg/l und gegen *P. aeruginosa* bei 6,25 mg/l lag (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Aufstellung der MHK- und MBK-Ergebnisse für alle Antibiotika, welche gegen beide Bakterienstämme in dieser Studie verwendet wurden

Antibiotika	MRSA		<i>P. aeruginosa</i>	
	MHK (mg/l)	MBK (mg/l)	MHK (mg/l)	MBK (mg/l)
Moxifloxacin	3.13	25	1.25	6.25
Mupirocin	1.25	25	> 100	> 100
Linezolid	1.25	25	> 100	> 100
Gentamicin	0.78	0.78	0.78	1.56

3.1.2 Agardiffusionsmethode

Vor Therapiebeginn wurden zunächst die beiden Antibiotika (0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin) auf ihre Resistenz gegenüber der MRSA-Reinkultur getestet. Hier zeigte sich, dass die MRSA-Reinkultur gegenüber 0,1 % Moxifloxacin mit einem Hemmhofdurchmesser von 18 mm als resistent einzustufen ist, wohingegen 2 % Mupirocin mit einem Hemmhofdurchmesser von 28 mm sensibel ist.

Darüber hinaus wurden die asservierten Wundflüssigkeiten aus dem porcinen Wundinfektionsmodell von Tag 14 und mit 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin therapierten Gruppen auf ihre Resistenz gegenüber 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin getestet. Hierbei ließ sich feststellen, dass die mit MRSA infizierten und über einen Zeitraum von 14 Tagen mit 0,1 % Moxifloxacin therapierten Wunden weiterhin resistent gegenüber 0,1 % Moxifloxacin (18 mm) und sensibel gegenüber 2 % Mupirocin (30 mm) sind. Abschließend waren die MRSA-infizierten Wunden, welche über den gleichen Zeitraum von 14 Tagen mit 2 % Mupirocin behandelt wurden, resistent gegenüber 0,1 % Moxifloxacin (16 mm) und sensibel gegenüber 2 % Mupirocin (25 mm). Die existierende Resistenz gegenüber 0,1 % Moxifloxacin, aber nicht gegen 2 % Mupirocin vor Beginn der Therapie muss bei der Beurteilung der Ergebnisse und im Rahmen der Diskussion berücksichtigt werden.

3.2 PORCINES WUNDINFEKTIONSMODELL

Die zu allen Versuchszeitpunkten durchgeführten Blutanalysen zeigten sich in Bezug auf das Blutbild und die Infektionsparameter im Normbereich. Eine systemische Infektion oder massive Komplikationen konnten somit bei allen drei Versuchstieren ausgeschlossen werden (siehe Abb. 12).

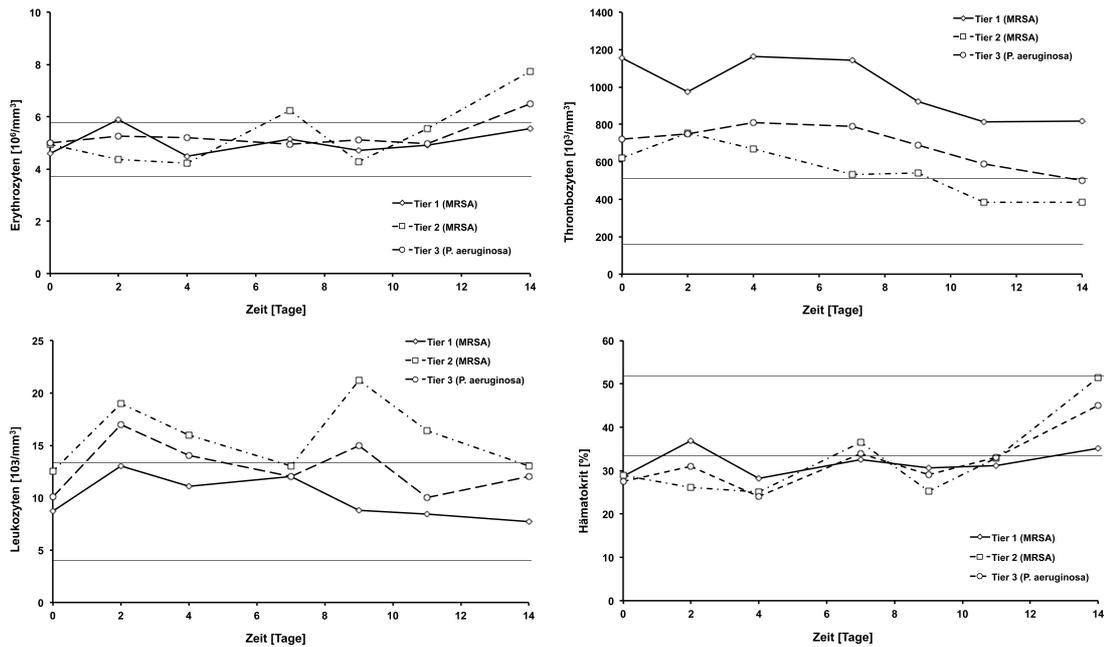


Abbildung 12: Blutwerte der drei Versuchstiere. Die streng horizontal verlaufenden Linien begrenzen den jeweiligen Normbereich für Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und den Hämatokrit (Ellegaard, Dänemark; www.minipigs.dk). Alle Blutwerte befinden sich mit Ausnahme leichter, aber normaler Schwankungen im Normbereich.

3.2.1 Wirksamkeit gegen *Pseudomonas-aeruginosa*-inokulierte Wunden

3.2.1.1 Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit

Nach Inokulation mit 1×10^8 CFU *P. aeruginosa* in jede Kammer und vor dem ersten Therapiezeitpunkt (Tag 0) zeigten alle Wunden eine stabile Infektion mit einer Gesamtmenge an Bakterien zwischen $2,3 \times 10^5$ und $3,3 \times 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit. Während des 14-tägigen Verlaufs stieg die Bakterienmenge innerhalb der Trägerkontrollgruppe bis Tag 11 mit insgesamt $1,2 \times 10^7$ CFU/ml Wundflüssigkeit kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu wiesen die mit 0,1 % Moxifloxacin und 0,3 % Gentamicin therapierten Wunden über den gesamten Verlauf eine signifikant geringere Bakterienzahl im Vergleich zur Trägerkontrollgruppe auf ($p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin, 0,3 % Gentamicin verglichen mit der Trägerkontrollgruppe). Obwohl 0,3 % Gentamicin an Tag 14 eine bakterielle Reduktion auf 5×10^1 CFU/ml Wundflüssigkeit erreichte, war die Differenz zu 0,1 % Moxifloxacin mit einer Bakterienmenge von $1,8 \times 10^3$ CFU/ml Wundflüssigkeit nicht signifikant (siehe Abb. 13).

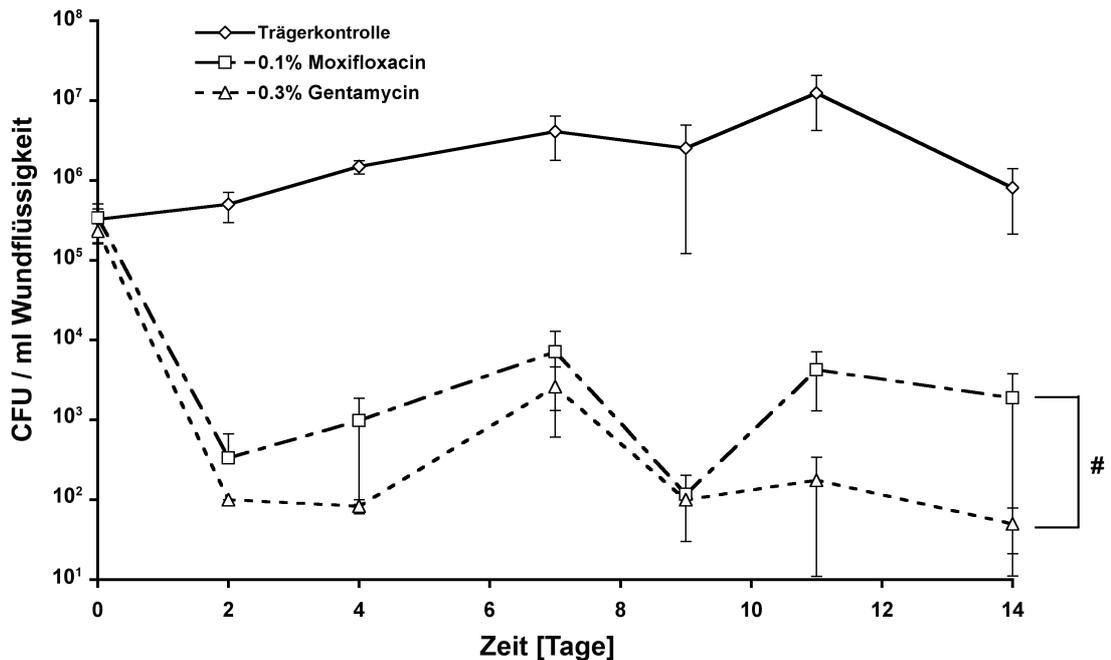


Abbildung 13: Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit von *Pseudomonas-aeruginosa*-infizierten porcinen Wunden und die Auswirkung von topisch appliziertem Moxifloxacin und Gentamicin. Sowohl die Wundflüssigkeiten von den 0,1 % Moxifloxacin als auch 0,3 % Gentamicin therapierten Gruppen befanden sich während des gesamten Verlaufs unterhalb der Infektionsgrenze ($< 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. #, $p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin, 0,3 % Gentamicin versus Trägerkontrolle.

3.2.2 Wirksamkeit gegen MRSA-inokulierte Wunden

3.2.2.1 Makroskopisches Erscheinungsbild der Wunden

Die makroskopische Fotodokumentation aller Wunden erfolgte an jedem Interventions- und Therapiezeitpunkt. 24 Stunden (Tag -9) nach der Implantation der BO-Wundkammern zeigten die Wunden aller experimentellen Gruppen gerötete Wundränder und eine leichte Sekretion neben den Wundkammern. Ab dem Tag der Inokulation (Tag -3) waren die Wundränder aller Gruppen an die Kammerwand adaptiert, so dass es zum Sistieren der Sekretion neben den Wundkammern kam. Alle mit MRSA inokulierten Wunden produzierten ab Tag 0 ein eitriges Wundsekret. Im Therapieverlauf zeigte die Trägerkontrollgruppe einen zunehmenden eitrigem Wundbelag, der die komplette Wundfläche bedeckte, wohingegen die Wundflächen von den mit 0,1 % Mupirocin und 0,1 % Linezolid behandelten Gruppen nur minimale Pus Akkumulation zeigten. 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin waren aus makroskopischer Sicht frei von jeglicher Eiterbildung. In allen Therapiegruppen

konnten die Bildung von Granulationsgewebe und, anhand des dunkelroten Gewebes, eine effiziente periphere Blutversorgung beobachtet werden (siehe Abb. 14).

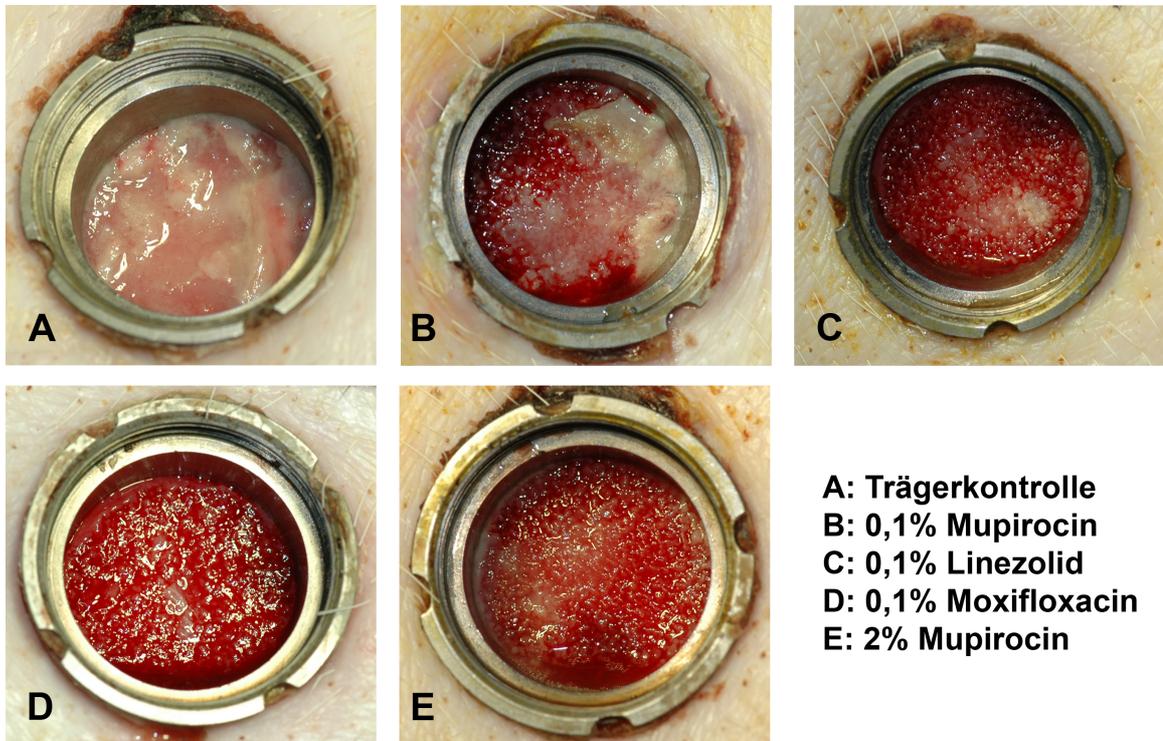


Abbildung 14: Makroskopische Fotodokumentation der Infektionszeichen 17 Tage nach Inokulation bzw. 14 Tage nach der ersten topischen Therapie. Bild A und B zeigen einen starken bis mittelstarken eitrigen Wundbelag, wohingegen in Bild C, D und E nur minimale bis keine Infektionszeichen bzw. Eiteransammlungen zu sehen sind. Das Granulationsgewebe aller Therapiegruppen zeigt eine effiziente Blutversorgung, was sich an der dunkelroten Farbe des Gewebes erkennen lässt.

3.2.2.2 Bakterielle Konzentration in der Wundflüssigkeit

Nach Inokulation mit 1×10^8 CFU MRSA in jede Kammer und vor dem ersten Therapiezeitpunkt (Tag 0) zeigten alle Wunden eine aktive Infektion mit einer Gesamtmenge an Bakterien zwischen $3,9 \times 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit für die 2 % Mupirocin-Kammern (niedrigster Wert) und $1,9 \times 10^6$ CFU/ml Wundflüssigkeit für die 0,1 % Mupirocin-Kammern (höchster Wert). Der initiale Wert für die 0,1%-Moxifloxacin-Kammern lag mit $1,1 \times 10^6$ CFU/ml Wundflüssigkeit geringfügig höher als in den Trägerkontroll-Kammern mit 9×10^5 CFU/ml Wundflüssigkeit. An Tag 2 fand sich innerhalb der 0,1%-Moxifloxacin-Gruppe eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl im Vergleich zur Trägerkontrolle ($3,2 \times 10^4$ CFU/ml Wundflüssigkeit; $p=0,00018$). Im Vergleich zu 0,1 % Moxifloxacin war die quantifizierte CFU für 0,1 % Mupirocin

($4,4 \times 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit) und 0,1 % Linezolid ($5,8 \times 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit) insgesamt 1 log höher, bei gleichzeitiger Signifikanz gegenüber der Trägerkontrollgruppe. Die mit 2 % Mupirocin therapierten Gruppen hingegen konnten mit 1×10^2 CFU/ml Wundflüssigkeit die stärkste bakterielle Reduktion vorweisen. Mit Ausnahme von Tag 11 ($6,7 \times 10^2$ CFU/ml Wundflüssigkeit) lagen die mit 2 % Mupirocin therapierten Gruppen an der Infektionsgrenze und teilweise sogar unterhalb des Detektionslimit ($p < 0,05$, 2 % Mupirocin versus 0,1 % Moxifloxacin, 0,1 % Linezolid und 0,1 % Mupirocin). Ab dem 4. Tag zeigte sich für 0,1 % Moxifloxacin eine bakterielle Reduktion von 98,26 % an Tag 7 bis zu 99,8 % an Tag 9, für 0,1 % Linezolid lag die bakterielle Reduktion an Tag 2 bei 96,78 % und an Tag 9 bei 99,81 %; für 0,1 % Mupirocin bei 97,52 % an Tag 2 und 99,88 % an Tag 4, jeweils im Vergleich zur Trägerkontrollgruppe ($p < 0,05$, 0,1 % Moxifloxacin, 0,1 % Linezolid und 0,1 % Mupirocin *versus* Trägerkontrolle) (siehe Abb. 15).

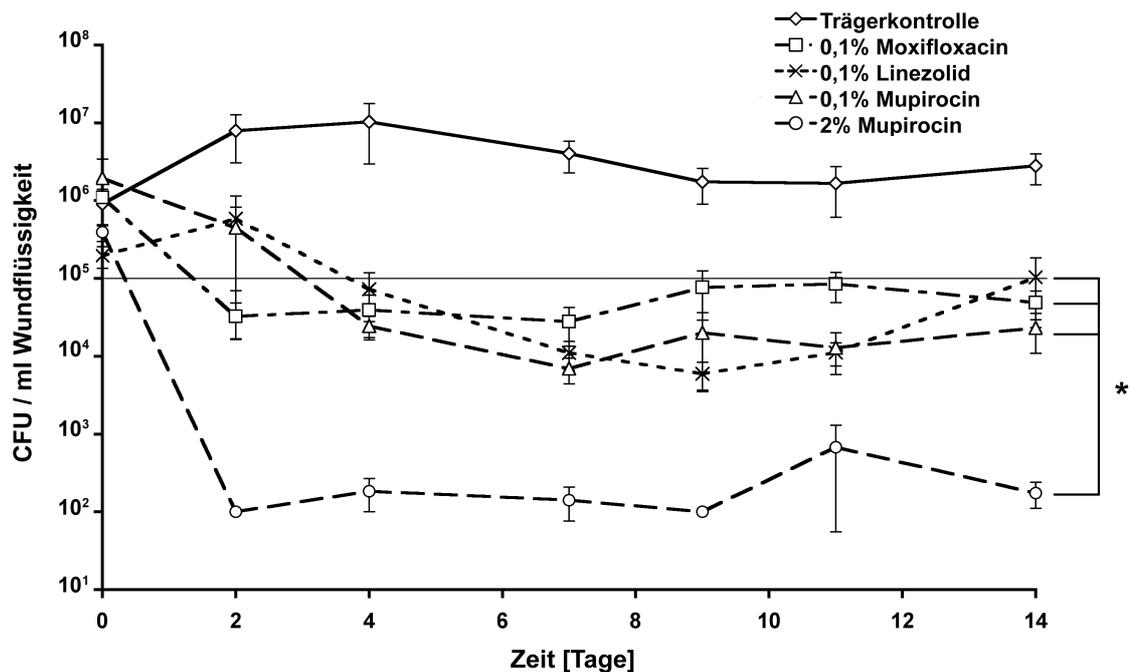


Abbildung 15: Bakterielle Konzentration in Wundflüssigkeit von MRSA-infizierten porcinen Wunden und die Auswirkung von topisch appliziertem Moxifloxacin, Linezolid und Mupirocin. Alle Behandlungsgruppen lagen ab Tag 4 unterhalb der Infektionsgrenze ($< 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit), zu erkennen anhand der eingezeichneten Linie. Alle Therapiegruppen wiesen eine signifikante Bakterienreduktion gegenüber der Trägerkontrollgruppe auf. *, $p < 0,05$, 0,1 % Moxifloxacin, 0,1 % Linezolid, 0,1 % Mupirocin, 2 % Mupirocin *versus* Trägerkontrolle. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.2.2.3 Bakterielle Konzentration im Wundgewebe

Die Gewebeprobe wurden 14 Tage nach der ersten Therapie aus jeder Kammer bzw. Wunde entnommen. Hier fand sich innerhalb der Trägerkontrollgruppe mit $5,4 \times 10^5$ CFU/g Gewebe die insgesamt höchste bakterielle Besiedlung. Eine signifikante bakterielle Reduktion konnte innerhalb der 0,1%-Moxifloxacin-Gruppe ($1,4 \times 10^4$ CFU/g Gewebe; $p=0,012$) und 2%-Mupirocin-Gruppe ($1,8 \times 10^3$ CFU/g Gewebe; $p=0,047$) gegenüber der Trägerkontrollgruppe beobachtet werden. Neben der 0,1%-Moxifloxacin- und 2%-Mupirocin-Gruppe blieben auch 0,1 % Linezolid ($1,1 \times 10^4$ CFU/g Gewebe) und 0,1 % Mupirocin ($4,4 \times 10^4$ CFU/g Gewebe) unterhalb der Infektionsgrenze von 1×10^5 CFU/g Gewebe (siehe Abb. 16).

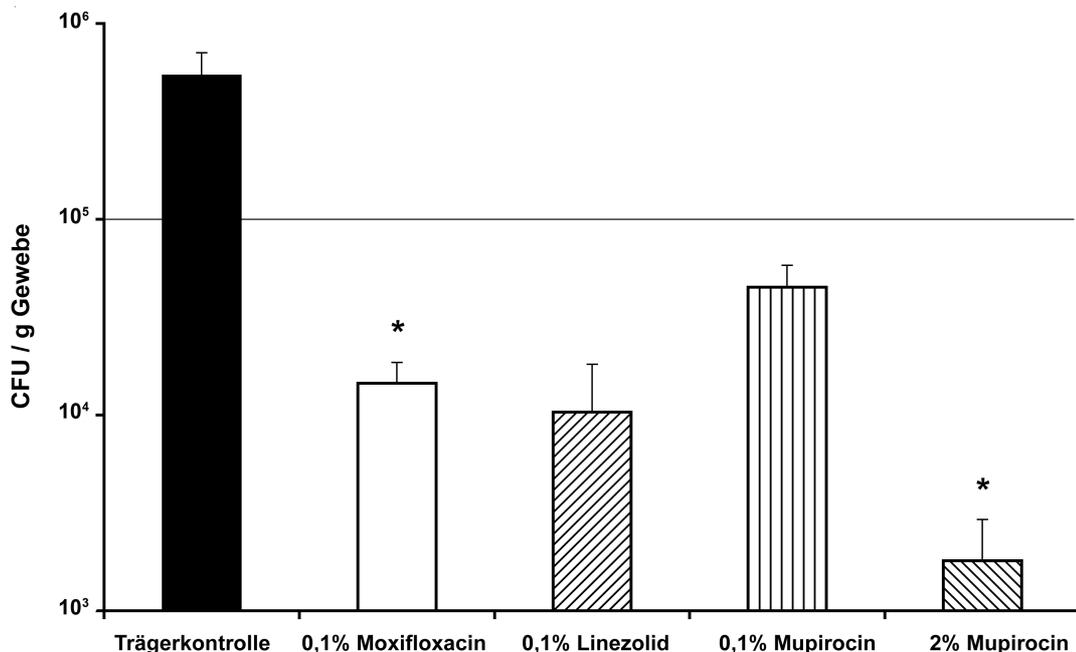


Abbildung 16: Bakterielle Konzentration in Gewebeprobe (Tag 14) von MRSA-infizierten porcinen Wunden. Alle Behandlungsgruppen lagen unterhalb der Infektionsgrenze ($< 10^5$ CFU/ml Wundflüssigkeit), zu erkennen anhand der eingezeichneten Linie. *, $p < 0,05$, 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin versus Trägerkontrolle. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.2.2.4 Quantifikation von Moxifloxacin

Der gesamte Moxifloxacin-Gehalt wurde mit Hilfe des LC-MS/MS-(Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-)Systems für die jeweils gewonnenen Wundflüssigkeiten bestimmt. Die Werte aus der Trägerkontrollgruppe reichten von $101,8 \mu\text{g/l}$ an Tag 2 bis an das

Detektionslimit von 10 µg/l. Die mit Moxifloxacin therapierten Gruppen erreichten Werte von 10 mg/l an Tag 7 und 29 mg/l an Tag 9. Diese Werte entsprechen der 3,2- bis 9,3-fachen MHK von 3,13 mg/l. Im Gegensatz zu den Wundflüssigkeiten war es sowohl in den porcinen Gewebebiopsien als auch in den gewonnenen Blutproben nicht möglich, Moxifloxacin nachzuweisen (siehe Abb. 17).

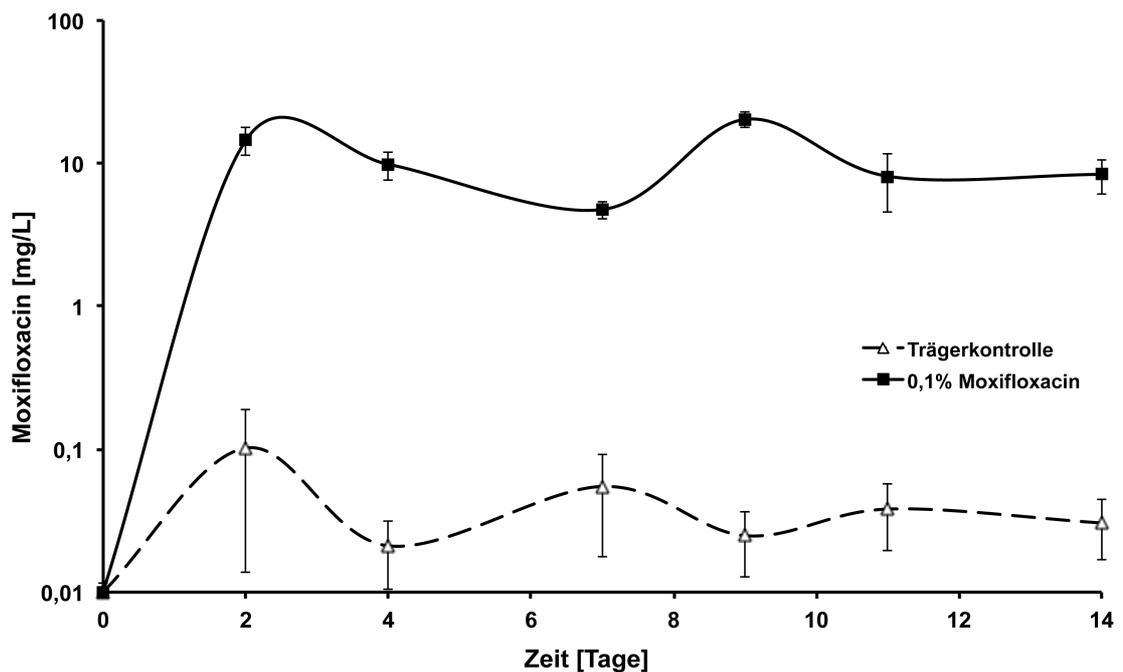


Abbildung 17: Verhältnis zwischen der Keimzahl in der Wundflüssigkeit und der entsprechenden Menge von Moxifloxacin, welche durch die LC-MS/MS-Analyse detektiert wurde über den Zeitraum von 14 Tagen. Diese Korrelation unterscheidet die Therapiegruppe von der Kontrollgruppe und zeigt die Relation zwischen dem Moxifloxacin-Gehalt und der bakteriellen Reduktion. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Konzentration von Moxifloxacin auf der Ebene der x-Achse zeigt die Nachweisgrenze der Messung.

3.3 RATTEN-VERBRENNUNGSINFEKTIONSMODELL

Die Daten der zu allen Versuchszeitpunkten durchgeführten Blutanalysen lagen in Bezug auf das Blutbild und die Infektionsparameter im Normbereich. Eine systemische Infektion konnte somit bei allen Versuchstieren ausgeschlossen werden (siehe Abb. 18).

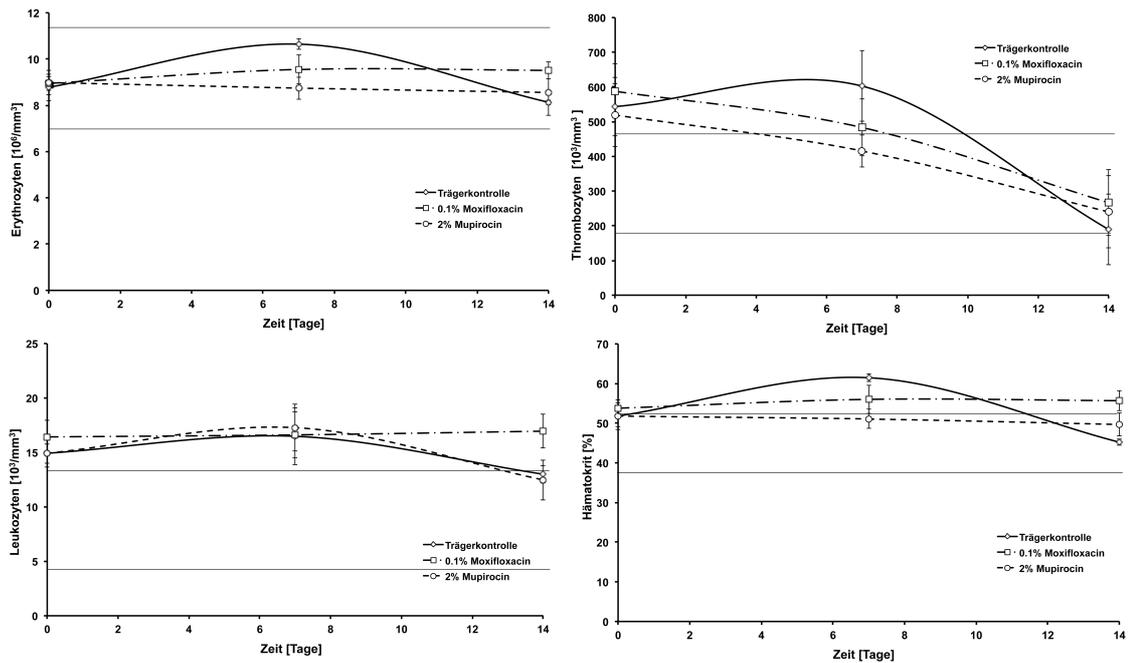


Abbildung 18: Blutwerte der mit MRSA infizierten Ratten. Die streng horizontal verlaufenden Linien begrenzen den jeweiligen Normbereich für Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und den Hämatokrit (Blood-Vet abc, SCIL Animal Care Company GmbH, Viernheim, Deutschland). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.3.1 *Pseudomonas-aeruginosa*-inokulierte Verbrennungswunden

3.3.1.1 Bakterielle Konzentration im Wundgewebe

7 Tage nach Therapiestart wurden insgesamt 18 Tiere euthanasiert bzw. 36 Wunden analysiert, welche entweder zur 0,1%-Moxifloxacin- (n=7), 0,3%-Gentamicin- (n=5) oder der Trägerkontrollgruppe (n=6) gehörten, um die Effizienz gegen *P.-aeruginosa*-infizierte Wunden zu testen. Innerhalb der Trägerkontrollgruppe fand sich mit bis zu $2,6 \times 10^8$ CFU/g Gewebe die höchste bakterielle Besiedlung. Im Gegensatz dazu konnte innerhalb der 0,1%-Moxifloxacin-Gruppe (1×10^4 CFU/g Gewebe) und der 0,3%-Gentamicin-Gruppe ($7,8 \times 10^3$ CFU/g Gewebe) eine signifikante bakterielle Reduktion beobachtet werden ($p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin und 0,3 % Gentamicin versus Trägerkontrolle) (siehe Abb. 19).

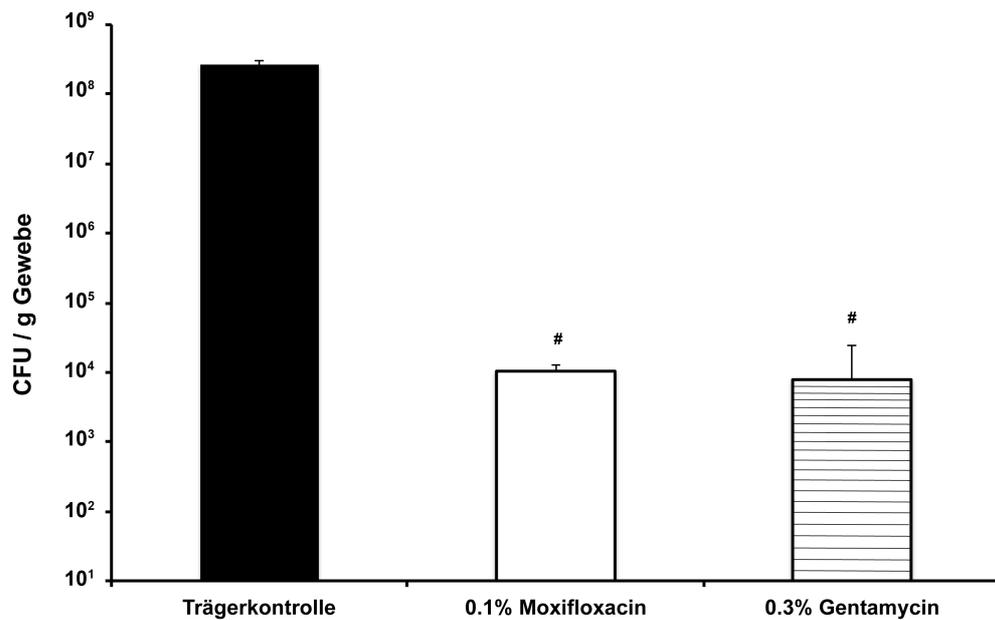


Abbildung 19: Bakterielle Konzentration in Gewebeproben von *P.-aeruginosa*-infizierten Verbrennungswunden 7 Tage nach Therapiebeginn. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. #, $p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin und 0,3 % Gentamicin versus Trägerkontrolle.

3.3.2 MRSA-inokulierte Verbrennungswunden

3.3.2.1 Bakterielle Konzentration im Wundgewebe

Um die Kurzzeit-Effizienz der verschiedenen Antibiotika zu evaluieren, wurden bereits 24 Stunden nach der ersten topischen Therapie Gewebebiopsien entnommen. Die mit Abstand höchste bakterielle Besiedlung fand sich innerhalb der Trägerkontrollgruppe mit 8×10^8 CFU/g Gewebe. Innerhalb der Therapiegruppen zeigten 0,1 % Moxifloxacin mit $1,3 \times 10^4$ CFU/g Gewebe und 0,1 % Mupirocin mit $7,7 \times 10^3$ CFU/g Gewebe eine signifikante bakterielle Reduktion ($p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin; 0,1 % Mupirocin versus Trägerkontrolle). Auch die Therapie mit 0,1 % Linezolid mit $2,7 \times 10^8$ CFU/g Gewebe zeigt eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$, 0,1 % Linezolid versus Trägerkontrolle). Um die Langzeit-Effizienz der verschiedenen Antibiotika zu testen, wurden Gewebebiopsien zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. 24 Stunden nach Inokulation mit MRSA und vor der ersten topischen Therapie wurden zunächst 5 Ratten euthanasiert bzw. 10 Wunden analysiert, um die Grundkeimzahl an Tag 0 zu bestimmen. Hier fand sich in allen Gruppen eine

stabile Infektion von $1,5 \times 10^8$ CFU/g Gewebe. Für den 24-Stunden-Zeitpunkt wurden, wie in Abbildung 9 zu sehen, die bereits analysierten Werte herangezogen.

An Tag 7 kam es sowohl in der Trägerkontrollgruppe mit 6×10^6 CFU/g Gewebe als auch in beiden Therapiegruppen zu einer bakteriellen Reduktion. Hierbei zeigte sich 0,1 % Moxifloxacin mit einer Reduktion auf $1,7 \times 10^5$ CFU/g Gewebe als effizienter gegenüber 2 % Mupirocin mit $6,9 \times 10^5$ CFU/g Gewebe. Im Gegensatz dazu kam es jedoch an Tag 14 zu einer fortschreitenden bakteriellen Reduktion innerhalb der 2%-Mupirocin-Gruppe ($7,6 \times 10^4$ CFU/g Gewebe), während die Keimzahl bei den mit 0,1 % Moxifloxacin therapierten Wunden auf $2,9 \times 10^6$ CFU/g Gewebe leicht anstieg (siehe Abb. 20).

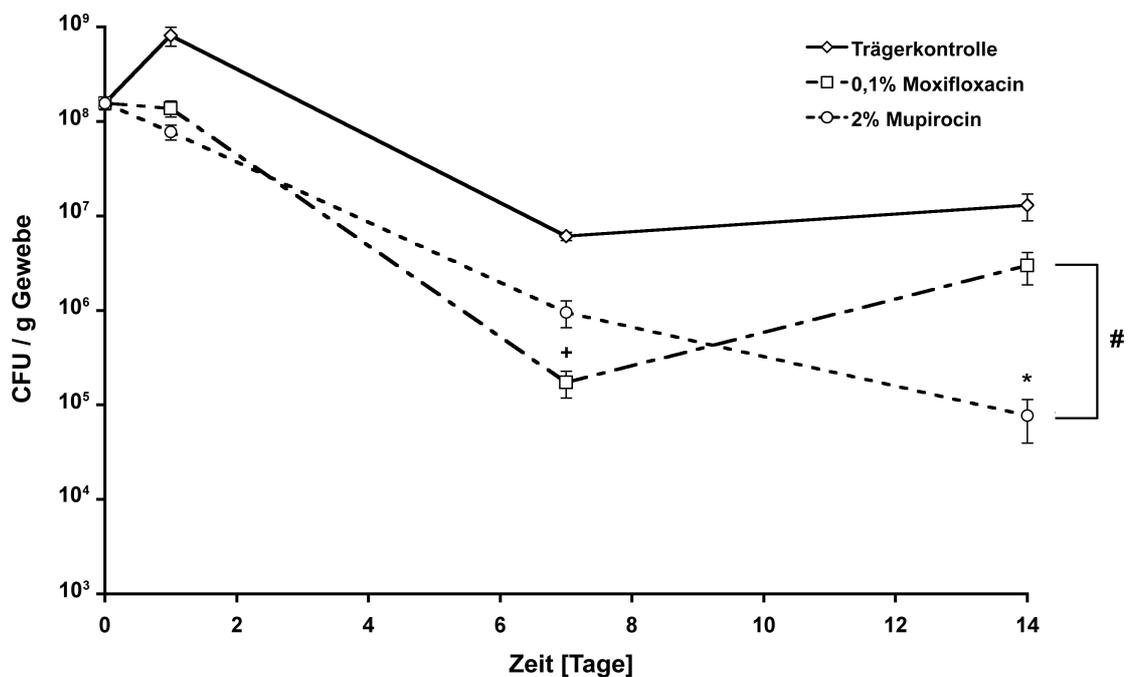


Abbildung 20: Keimzahldichte in Gewebeproben (Tag 0, 1, 7, 14) von MRSA-infizierten Verbrennungswunden. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. #, $p < 0,001$, 0,1 % Moxifloxacin und 2 % Mupirocin versus Trägerkontrolle; +, $p < 0,05$ 0,1 % Moxifloxacin versus 2 % Mupirocin an Tag 7; *, $p < 0,01$, 2 % Mupirocin versus 0,1 % Moxifloxacin an Tag 14.

3.3.2.2 Quantifikation von Moxifloxacin

Der gesamte Moxifloxacin-Gehalt wurde für die an den unterschiedlichen Tagen entnommenen Gewebeproben bestimmt. Die Werte aus der Trägerkontrollgruppe blieben während des gesamten Versuchs bei einer

Hintergrundbelastung von nahezu nicht messbaren Werten. Die Moxifloxacin-Konzentration innerhalb der Verbrennungswunden lag zwischen 6,93 µg/g Gewebe an Tag 1 und 25,51 bzw. 21,88 µg/g Gewebe an Tag 7 und 14. Im Bezug auf das analysierte Blut war weder in den 0,1%-Moxifloxacin-therapierten Gruppen noch in der Trägerkontrollgruppe Moxifloxacin nachzuweisen. Das Verhältnis zwischen der verbliebenen Keimzahl und dem Moxifloxacin-Gehalt, welcher im Gewebe ermittelt wurde, ist vergleichbar mit den Werten aus den Wundflüssigkeiten des porcinen Infektionsmodells (siehe Abb. 21).

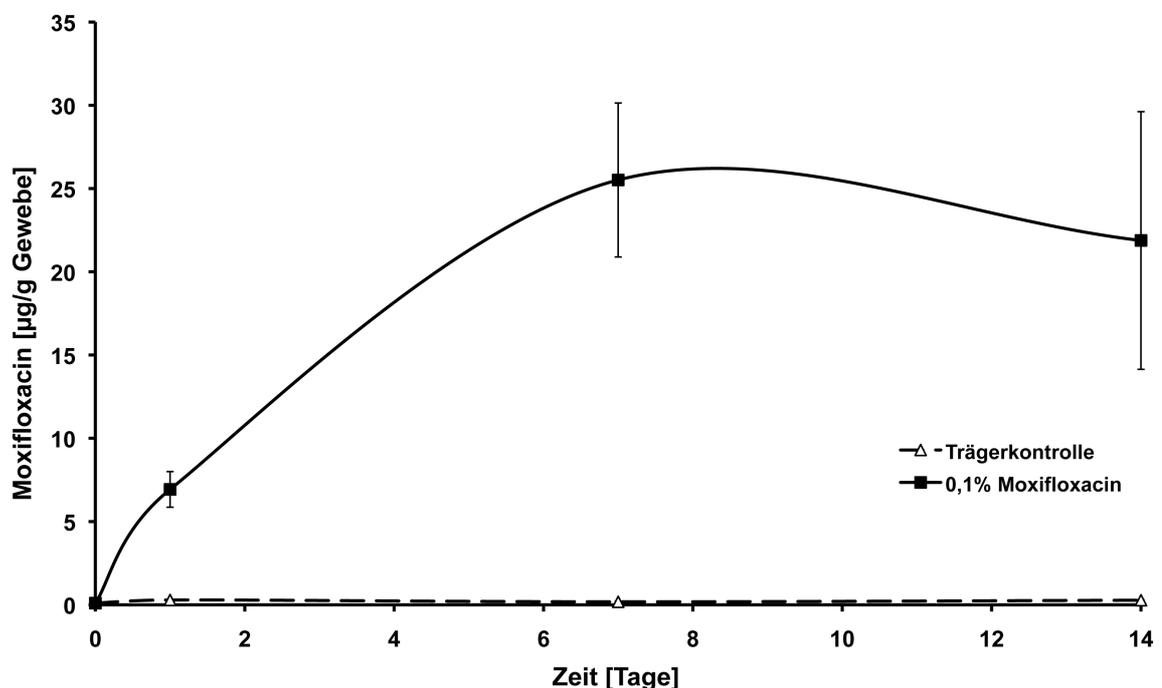


Abbildung 21: Verhältnis zwischen der Keimzahl in den gewonnenen Gewebeprobe und der entsprechenden Moxifloxacin-Konzentration. Die Ergebnisse sind, abgesehen von einem Faktor 1000 in der Konzentration, vergleichbar mit denen aus den porcinen Wundflüssigkeiten. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.3.2.3 Histologische Auswertung

In der histologischen Analyse aller Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitte der untersuchten Gruppen (Trägerkontrolle, 0,1 % Moxifloxacin, 2 % Mupirocin), konnte aufgrund der Schädigung der Epidermis und Dermis bei intakter Subkutis eine Verbrennung zweiten Grades (2°) dargestellt werden. Die Ausbreitung des nekrotischen Gewebes und die damit einhergehende Entzündung, die sich durch eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten

nachweisen lies, nahm in der Trägerkontrollgruppe stetig zu und erreichte am letzten Versuchstag den Höhepunkt. Aufgrund der fortschreitenden Entzündung konnte an Tag 14 in der Trägerkontrollgruppe eine deutliche Ödem- und Nekrosenbildung, bis in die muskulären Schichten reichend, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Therapiegruppen ab Tag 7 eine deutliche Gewebsregeneration beobachtet. Die Wunden, welche mit 0,1 % Moxifloxacin therapiert wurden, zeigten mit 15,1/HPF eine deutliche Reduktion der leukozytären Infiltration. Darüber wurde eine Zunahme der Blutgefäße (18,2/HPF) und eine deutliche Verbreiterung des Granulationsgewebes auf 1,488 μm und somit eine fortschreitende Reepithelialisierung im Gegensatz zur Trägerkontrollgruppe (42,5 Leukozyten/HPF, 8,1 Blutgefäße/HPF und 1,172 μm Granulationsgewebe) dargestellt. Alle mit 0,1 % Moxifloxacin therapierten Präparate zeigten im zeitlichen Verlauf vergleichbare Werte in den angegebenen Kriterien und können somit als signifikant in der Reduktion der Entzündung und nekrotischen Ausdehnung angesehen werden. In der 2%-Mupirocin-Gruppe kam es zwar zu einer Reduktion der tiefen und oberflächigen Entzündung, welche jedoch mit 25,7 Leukozyten/HPF im Gegensatz zu der 0,1%-Moxifloxacin-Gruppe immer noch massiv erhöht war. Darüber hinaus war die Anzahl der Blutgefäße mit 11,2/HPF signifikant niedriger ($p=0,0057$) als die in der 0,1%-Moxifloxacin-Gruppe (siehe Abb. 22).

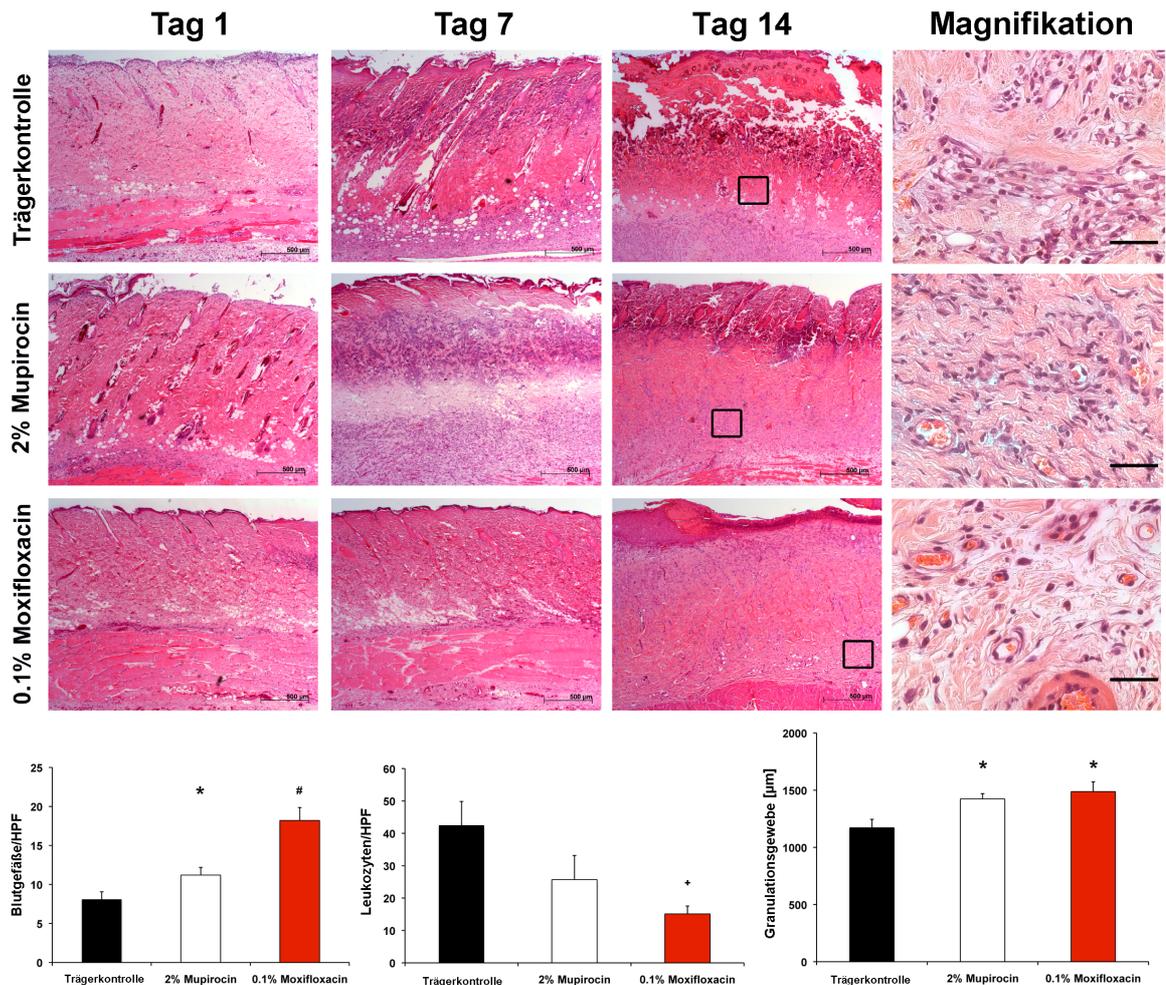


Abbildung 22: Histologische Analyse der mit MRSA infizierten Verbrennungswunden an Tag 1, 7 und 14 in Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung und 50-facher Vergrößerung. Die Maßstabskala ist in jedem Bild unten rechts angezeigt und entspricht 500 μm für die Übersichtsbilder und 50 μm in der Vergrößerung. Die korrespondierenden Graphen unter den histologischen Schnitten demonstrieren die Anzahl der Blutgefäße und Leukozyten pro HPF und die Breite des Granulationsgewebes. *, $p < 0,05$ Therapiegruppen *versus* Trägerkontrollgruppe; #, $p < 0,01$, 0,1 % Moxifloxacin *versus* Trägerkontrolle; +, $p < 0,05$, 0,1 % Moxifloxacin *versus* 2 % Mupirocin und Trägerkontrolle.

4. DISKUSSION

Eine durch *P. aeruginosa* und Methicillin-resistenten *S. aureus* verursachte Infektion stellt im klinischen Alltag eine erhebliche Herausforderung bei der Behandlung von Brandwunden und chronischen Wunden dar. Im Fokus dieser Arbeit steht vor allem *S. aureus*, da dieser sich permanent weiterentwickelnde Keim in Bezug auf die kontinuierliche Ausbreitung und Zunahme in der Resistenzentwicklung zu einem weltweiten Problem herangewachsen ist [46]. Die Prävalenzraten von MRSA in den Industrieländern sind sehr unterschiedlich und reichen von < 1 % (Schweden, Finnland, Dänemark, Niederlande) bis > 40 % (USA, Griechenland, Irland, Italien, Großbritannien). Deutschland liegt mit 20–25 % im Mittelfeld [77]. Derzeit existieren keine einheitlichen Eradikationsstrategien in den unterschiedlichen Ländern und die Fragen nach der optimalen Sanierungsart und -dauer sind offen [122]. Die aus der hohen Prävalenz resultierenden MRSA-Fälle von stationär behandelten Patienten werden in Deutschland auf freiwilliger Teilnahme vom Nationalen Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) mit dem Modul MRSA-KISS ermittelt [77]. Hier konnte gezeigt werden, dass in den Jahren von 2004 bis 2008 die MRSA-Fälle pro 1.000 Patiententage kontinuierlich von 0,63 auf 1,03 anstiegen [14]. In Deutschland fehlen bislang solche vergleichbaren Studien und Untersuchungen, doch hat auch hier die Eindämmung des MRSA-Infektionsrisikos eine große gesundheitspolitische Bedeutung. Systematische Erhebungen am Universitätsklinikum in Essen haben ergeben, dass sich in 70,8 % der chronischen Wunden *S. aureus* und in 21,5 % der Wunden MRSA nachweisen lassen [44]. Eine von Tammelin *et al.* bei 656 Patienten mit chronischen Wunden durchgeführte Studie zeigte, dass 95,1 % aller analysierten Wunden mit mindestens einer bakteriellen Spezies kolonisiert waren (329 mit *S. aureus*) und dass mehr als 25 % der Studienteilnehmer zu einem bestimmten Zeitpunkt im Krankheitsverlauf Antibiotika erhielten. Ungefähr 60 % des Patientenkontingents waren während einer früheren Periode von 6 Monaten mit einer systemischen Antibiotikatherapie behandelt worden [110]. Dieser hohe und weiterhin steigende Gebrauch von systemisch applizierten Antibiotika steuert maßgeblich

zur Resistenzentwicklung innerhalb der verschiedenen Bakterienspezies und der Zunahme von Nebenwirkungen bei. Ein weiteres Problem von systemisch eingesetzten Antibiotika ist oftmals ihre verringerte lokale Verfügbarkeit im peripheren Gewebe. Dies ist zumeist auf die eingeschränkte oder sogar völlig zerstörte periphere Blutversorgung bei Patienten mit chronischen Wunden und Verbrennungswunden zurückzuführen [35]. Folglich ist die systemische Anwendung von Antibiotika zur Behandlung peripherer Wundinfektionen kritisch zu prüfen und zu reevaluieren. Hierbei sind vor allem die hohe Dosis, welche verabreicht werden muss, um einen therapeutischen Effekt in der Peripherie des Gewebe zu erreichen, und die daraus resultierenden Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Topisch applizierte Antibiotika stellen folglich eine hilfreiche und sinnvolle Alternative bei der Behandlung von Wundinfektionen dar und können bei Wunden mit nekrotischem Gewebe, eingeschränkter peripherer Blutversorgung oder bei überschüssiger Bildung von Granulationsgewebe indiziert sein [30].

Antibiotika, welche topisch auf den infizierten Wundbereich aufgebracht werden, können im klinischen Alltag die bessere Wahl sein, da systemische und für den Körper bedrohliche Nebenwirkungen vermieden werden können. Hauptnebenwirkungen systemischer Antibiotika sind Allergien, die Störung der Darmflora (Antibiotika-assoziierte Diarrhoe), das Auftreten von Pilzinfektionen und selten auch die pseudomembranöse Colitis. Gerade bei der Behandlung mit systemischen Breitspektrumantibiotika, welche häufig in der Therapie von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt werden, kann durch die Störung bzw. Zerstörung der Darmflora eine lebensbedrohliche Infektion mit *Clostridium difficile* ausgelöst werden. Einige Antibiotika verursachen auch organotoxische Wirkungen, wie z.B. der Gebrauch von Gentamicin, welcher zu Nieren- und Hörschäden führen kann [26, 65].

Folglich sind die Gemeinsamkeiten der meisten systemisch applizierten Antibiotika in der Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen die steigende Resistenzentwicklung, die schweren Nebenwirkungen aufgrund der Notwendigkeit hoher therapeutischer Konzentrationen und die schlechte Gewebepenetration in der Peripherie [35, 71, 78].

Neben der Minimierung der oben genannten Nebenwirkungen führt die direkte Applikation des antibiotischen Wirkstoffs auf das infizierte Wundareal zu höheren lokalen Konzentrationen, womit die Notwendigkeit einer ausreichenden Gefäßbildung entfällt. Falls die zu behandelnde Wunde nicht stark infiziert und eine systemische Therapie nicht zwingend indiziert ist, sollten kleinere und lokal applizierte Dosen frühzeitig verwendet werden, um somit eine nachfolgende systemische Infektion oder Sepsis zu vermeiden. In diesem Fall muss der menschliche Organismus nicht mit hohen Konzentrationen von Antibiotika belastet werden, da kleinere lokale Dosen die gleiche Wirkung erzielen können. Trotz Studien, in denen diskutiert wird, dass die topische Antibiotikatherapie von infizierten Wunden zu Verzögerung in der Wundheilung und hohen Raten von Kontaktsensibilisierungen führt [39], ist dieser Standpunkt im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Studie jedoch erneut kontrovers zu diskutieren. Klinische Studien zur Wirksamkeit von systemisch verabreichtem Moxifloxacin in der Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen wiesen klinische Heilungsraten zwischen 79 und 90 % auf [41, 92]. Giordano *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass die bakteriologische Eradikationsrate für *S. aureus*, welcher mit Abstand der vorherrschende Keim war, bei 78 und 80 % lag und die Inzidenz von medikamentenbedingten Nebenwirkungen in den Gruppen ähnlich war: nämlich 31 % in der Moxifloxacin-Gruppe und 30 % in der Kontrollgruppe [41]. Die tägliche Dosis für eine systemische Anwendung von Moxifloxacin betrug 400 mg, während die in unserer Studie eingesetzte Gesamtmenge an Moxifloxacin nur 0,5 mg pro Wunde und Tag betrug. Dies stellt eine tägliche maximale Belastung von 2 mg Moxifloxacin pro Tier dar. Während des mindestens 14-tägigen Zeitverlaufes mit 6 Anwendungen war der Gesamtbedarf an Antibiotika im Vergleich zu einer systemischen Anwendung sehr niedrig. Desrosiers *et al.* zeigten anhand einer *In-vitro*-Studie, dass erhöhte Konzentrationen von Moxifloxacin (0,1 bis 0,2 mg/ml) die Anzahl lebensfähiger Bakterien um 2 bis 2,5 logarithmische Skalierungen des biofilmbildenden *S. aureus* oder *P. aeruginosa* verringert [19]. Folglich sollte die im Rahmen unserer Studie verwendete Medikamentendosis für die Beseitigung der biofilmbildenden Bakterien ebenfalls ausreichend sein. Für eine suffiziente und erfolgreiche Therapie spielt vor allem die konzertierte Verwendung

topischer antimikrobieller Wirkstoffe bei der Behandlung von infizierten chronischen Wunden und Verbrennungswunden eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund haben wir uns vorwiegend auf die Analyse der Wirksamkeit von topisch verabreichtem Moxifloxacin zur Bekämpfung von MRSA konzentriert. In diesem Kontext haben wir Moxifloxacin mit Linezolid als einem systemisch verwendeten Antibiotikum sowie mit Mupirocin als einem topisch verwendeten Antibiotikum zur Bekämpfung von MRSA verglichen. Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden alle verwendeten Antibiotika zu der gleichen Konzentration verdünnt, die der üblichen Gelformulierung entsprach. Zusätzlich wollten wir die Wirksamkeit von Moxifloxacin im Vergleich zu konventionellen und im Handel erhältlichen topischen Salben untersuchen. Für diesen Zweck wurde eine Salbe mit einer Konzentration von 2 % Mupirocin (Infectopyroderm[®], InfectoPharm, Heppenheim, Deutschland) verwendet. Gewöhnlich wird systemisch verabreichtes Moxifloxacin nur gegen gramnegative Bakterien eingesetzt. In unserer Studie setzten wir jedoch bei den gleichen Modellen auch *P. aeruginosa* ein, um die breite antimikrobielle Wirksamkeit des Arzneimittels zu demonstrieren. Außerdem führten wir einen Vergleich zwischen Moxifloxacin und einer im Handel erhältlichen 0,3 % Gentamicinsalbe (MedPhano, Rüttersdorf, Deutschland) durch. Die in unserer Studie verwendeten Bakterien wurden auf Empfindlichkeit gegen die eingesetzten Antibiotika getestet und es wurden die entsprechenden minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) ermittelt. Alle Stämme waren den verwendeten Antibiotika gegenüber empfindlich, und die für Moxifloxacin gemessenen Werte stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein [47].

Anhand dieser Studie konnten wir nicht nur beweisen, dass die antimikrobielle Aktivität von Moxifloxacin mit derjenigen bereits klinisch eingesetzter Antibiotika, wie zum Beispiel Mupirocin und Linezolid, vergleichbar ist, sondern auch, dass Moxifloxacin unter den gleichen Bedingungen und bei der Verwendung der gleichen Medikamentendosis für eine effiziente Bakterienreduktion bei MRSA-infizierten Wunden eingesetzt werden kann. Da Wunden für gewöhnlich von verschiedenen pathogenen Keimen besiedelt bzw. infiziert werden und eine Bestimmung der pathogenen Keime leider nicht immer möglich ist, sollte für die entsprechende Behandlung ein Breitbandantibiotikum

verwendet werden. Im Unterschied zu Mupirocin und Linezolid weist Moxifloxacin als Breitbandantibiotikum diese klinisch bedeutsame Wirksamkeit auf.

Des Weiteren werden in der Literatur immer wieder Bedenken geäußert, dass eine topische Antibiotikatherapie zu einer höheren Resistenzentwicklung führen könnte [22, 70]. So zeigten Harkaway *et al.*, dass bei Staphylokokken nach einer 12-wöchigen Therapie mit topisch appliziertem Erythromycin eine Zunahme der Resistenzentwicklung von 25 % auf 50 % zu beobachten war [50]. Andere Studien, unter anderem von Neely *et al.*, konnten jedoch belegen, dass Bakterien, welche bereits gegen systemische Antibiotika als resistent getestet wurden, bei einer topischen Applikation noch Sensitivitäten aufweisen [88].

In unserem Experiment konnten die Sorgen um eine Erhöhung der Resistenzentwicklung bei topischer Antibiotikatherapie jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr konnten wir beobachten, dass sich die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Moxifloxacin im Verlauf der 14-tägigen Behandlungsdauer dieser Studie nicht verändert hat. Hier sollten sich jedoch im Verlauf weitere dezidierte Untersuchungen anschließen.

Im Fall der *P.-aeruginosa*-infizierten Wunden verwendeten wir als Positivkontrolle eine im Handel erhältliche 3 % Gentamicinsalbe, um die klinische Relevanz zu demonstrieren. Gentamicin war gegen beide in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme hochwirksam und darüber hinaus in der üblichen Gelformulierung gut löslich. Aus diesem Grund kann es im Rahmen einer Monotherapie oder in Kombination mit anderen antimikrobiellen Arzneimitteln, wie zum Beispiel Moxifloxacin, eingesetzt werden, um die positiven Eigenschaften der Medikamente zu kombinieren und deren Nachteile bei einer standardisierten topischen Behandlung zu verringern. Zu diesem Thema sollten jedoch weitere Studien durchgeführt werden. Darüber hinaus konnten Guay *et al.* zeigen, dass Moxifloxacin im Vergleich zu Gentamicin eine deutlich bessere Penetration in peripheres Gewebe aufweist [47]. Diese Eigenschaft hat Moxifloxacin seiner molekularen Struktur zu verdanken, was anhand der hohen Konzentration im peripheren Gewebe nach intravenöser Applikation nachgewiesen werden konnte [47].

In diesem Kontext ließen sich die Werte, die bei den Gewebeproben aus den Verbrennungswunden der Ratten ermittelt wurden, mit denjenigen vergleichen, die aus der porcinen Wundflüssigkeit erhoben wurden, was ein deutlicher Hinweis für die gute Gewebepenetration des Antibiotikums ist. Die gemessene Moxifloxacin-Konzentration in der porcinen Wundflüssigkeit wies Werte auf, die über der minimalen Hemmkonzentration (MHK), aber unter der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) lagen (beide *in vitro* ermittelt). Dieser Umstand könnte den gleichmäßigen Verlauf der entsprechenden Kurve erklären, welcher die Anzahl der CFU/ml Wundflüssigkeit nach dem 2. Behandlungstag veranschaulicht. Andererseits zeigen die Gewebekonzentrationen von Moxifloxacin beim Ratten-Verbrennungsinfektionsmodell Werte, die denen der minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) entsprechen. Angesichts des wesentlich geringeren Verteilungsvolumens für Moxifloxacin in den Geweben sollte die therapeutische Konzentration von Moxifloxacin in den Geweben wesentlich höher als die in der Wundflüssigkeit sein. Überraschend war zudem die Tatsache, dass die durchschnittlichen Bakterienzahlen in den Verbrennungswunden der Ratten erheblich höher waren als die Werte aus den vergleichbaren Wundflüssigkeiten und Gewebeproben des porcinen Infektionsmodells.

Die Methode der Probeentnahme könnte die Ursache dafür sein, warum in den porcinen Gewebeproben kein Moxifloxacin entdeckt werden konnte, da bei Schweinen Stanzbiopsieproben mit größerer Gewebetiefe als bei Ratten entnommen wurden, was das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Proben negativ beeinflusste. Diese Aussage macht auch deutlich, dass das Penetrationsverhalten von Moxifloxacin in peripheres Wundgewebe weiter erforscht werden muss.

Die antimikrobielle Aktivität von topisch appliziertem Moxifloxacin gegen eine durch MRSA und *P. aeruginosa* verursachte Wundinfektion wurde anhand von zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht. Wir verwendeten zum einen ein porcines Wundinfektionsmodell, da die Haut des Schweines in Bezug auf Anatomie und Physiologie der des Menschen sehr ähnlich ist [81, 113]. Obwohl Nagetiere nach wie vor ihren unbestrittenen Platz in der wissenschaftlichen Erforschung von dermale Hautersatz haben, spielt bei ihnen die Wundkontraktion die größte Rolle in der Wundheilung, wohingegen beim

Schwein und beim Menschen Wunden hauptsächlich über die Bildung von Granulationsgewebe mit anschließender Reepithelialisierung heilen [109, 113]. Weitere Gemeinsamkeiten zwischen humaner und porciner Haut sind die ähnliche Dicke der Epidermis und Dermis mit einem vergleichbaren Verhältnis zueinander (zwischen 1:10 und 1:13), gut ausgebildete Reteleisten im Bereich des dermo-epidermalen Übergangs und biochemisch vergleichbares porcines und humanes Kollagen. Sullivan *et al.* konnten nach Evaluation von über 25 Wundheilungsstudien zeigen, dass positive Ergebnisse an Schweinemodellen zu 78 % auch beim Menschen einen positiven Effekt zeigten, wohingegen bei Nagetieren dies nur bei 53 % der Studien zutraf [109]. Folglich ist das Schwein als eines der besten Wundheilungsmodelle zu betrachten. Zudem kann pro Tier eine größere Anzahl von Proben und Biopsaten und somit erheblich mehr wissenschaftlicher Aufschluss gewonnen werden. So können mit so einem Modell nicht nur interindividuelle, sondern auch intraindividuelle Probenvergleiche erfolgen.

Die in unserer Studie verwendeten BO-Wundkammern beugen Kontraktionen und Kreuzkontaminationen vor und sind folglich in der Lage, unterschiedliche Beschaffenheiten chronischer Wunden zu simulieren [104].

Andererseits waren wir der Ansicht, dass das Ratten-Verbrennungsinfektionsmodell sich gut für die Studie eignen würde, weil Infektionen, welche von MRSA und *P. aeruginosa* verursacht werden, vorwiegend bei Patienten mit Verbrennungswunden zu beobachten sind, da deren Immunsystem aufgrund des Verlustes der Schutzbarrierefunktion des Epithels beeinträchtigt ist [60]. Anhand der HE-Färbung des Gewebes war eindeutig zu sehen, dass die Wundheilungsergebnisse bei einer topischen Applikation von Moxifloxacin objektiv besser waren als bei den Wunden, welche mit Mupirocin oder dem Trägerkontrollgel behandelt wurden. Diese verbesserten Wundheilungsergebnisse konnten jedoch nicht nur durch die Reduktion der Bakterienzahl erklärt werden, da der Wundheilungsfortschritt bei mit Mupirocin behandelten Wunden, die die gleichen oder sogar leicht niedrigere CFU-Werte zeigten, wesentlich geringer war. In diesem Kontext vermuten wir, dass Moxifloxacin, wie andere Fluorchinolone, die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8), Tumor-Nekrose-Faktor

alpha (TNF-alpha) oder Interleukin-1 beta (IL-1-β) bei aktivierten Monozyten oder eine Akkumulation von Zytokinen in aktivierten Leukozyten [12, 18, 117] verringert. Dies könnte eine entzündungshemmende und geweberegenerative Wirkung haben, womit die Ergebnisse in dieser Studie erklärt werden könnten. Die Ergebnisse der *In-vivo*-Studie zeigten, dass die Verwendung von topisch appliziertem Moxifloxacin sich aufgrund der erheblichen Reduktion grampositiver bzw. gramnegativer Bakterien sowie der Beschleunigung der Wundheilungsprozesse positiv auf die Behandlung infizierter Wunden auswirkte. Abschließend wurde zu Behandlungsende keine Veränderung der Bakterienempfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin im Vergleich zum Behandlungsbeginn festgestellt. Dieser Aspekt sollte jedoch neben dem Gewebepenetrationsverhalten und den Wundheilungseigenschaften von Moxifloxacin in weiteren Studien eingehender untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die steigende Inzidenz von Wundinfektionen bei Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) führt zu hoher Morbidität und Mortalität und ist aufgrund der damit verbundenen enormen Kosten von hohem sozioökonomischen Interesse. Verbunden mit der zunehmenden Erregerresistenz gegenüber Antibiotika und den oft insuffizienten, nebenwirkungsreichen und kostenintensiven systemischen Therapiemöglichkeiten ist es dringend erforderlich, neue Behandlungsmöglichkeiten bei der Therapie von infizierten Wunden zu entwickeln.

Im Rahmen dieser vorklinischen Studie sollte untersucht werden, ob die antimikrobielle Wirksamkeit von topisch appliziertem Moxifloxacin im Vergleich zu einem Trägerkontrollengel, Mupirocin, Linezolid und Gentamicin, unter Zuhilfenahme eines porcinen Infektions- und Ratten-Verbrennungsmodell gegeben ist.

Hierfür wurden zwei Tiermodelle verwendet, welche nach Wundsetzung mit 1×10^8 Colony-Forming Units (CFU) von MRSA oder *Pseudomonas aeruginosa* inokuliert und im Anschluss über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Moxifloxacin und klinisch erprobten Antibiotika (Linezolid, Mupirocin, Gentamicin) sowie einer Trägerkontrolle topisch therapiert wurden. Wundflüssigkeiten, Gewebe- und Blutproben wurden asserviert und quantifiziert.

Beide Bakterienstämme zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegen Moxifloxacin und Gentamicin, während Mupirocin und Linezolid ihre Wirksamkeit nur gegen den MRSA-Stamm zeigen konnten. Die Ergebnisse aller topisch applizierten Antibiotika beweisen den gewünschten Effekt einer signifikanten Bakterienreduktion und erreichten mit Ausnahme der mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-infizierten Verbrennungswunden Werte von $< 10^5$ CFU/g Gewebe. Zusätzlich konnte in der histologischen Analyse ein erhöhtes Wundheilungspotential von Moxifloxacin beobachtet werden. Eine zunehmende Resistenzentwicklung während der gesamten Therapie zeigte sich hingegen nicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die topische Therapie mit Moxifloxacin eine vielversprechende Möglichkeit zur Medikamentenapplikation im Sinne einer neuen, nebenwirkungsarmen und effizienten Behandlung von MRSA-bedingten Wundinfektionen darstellen kann.

6. SUMMARY

Wound infection is a common risk for patients with chronic nonhealing wounds, causing high morbidity and mortality. Currently, systemic antibiotic treatment is the therapy of choice, despite often leading to several side effects and the risk of an insufficient tissue penetration due to impaired blood supply. If systemically delivered, moxifloxacin penetrates well into inflammatory blister fluid, muscle, and subcutaneous adipose tissues and might therefore be a possible option for the topical treatment of skin and infected skin wounds.

In this study, topical application of moxifloxacin was investigated in comparison to mupirocin, linezolid, and gentamicin using a porcine wound infection and a rat burn infection model. Both animal models were performed either by an inoculation with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or *Pseudomonas aeruginosa*. Wound fluid, tissue, and blood samples were taken, and bacterial counts as well as the moxifloxacin concentration were determined for a 14-day follow-up. A histological comparison of the rat burn wound tissues was performed. Both strains were susceptible to moxifloxacin and gentamicin, whereas mupirocin and linezolid were effective only against MRSA.

All antibiotics showed efficient reduction of bacterial counts, and except with MRSA, infected burn wounds reached bacterial counts below 10^5 CFU/g tissue. Additionally, moxifloxacin was observed to promote wound healing as determined by histologic analysis, while no induction of bacterial resistance was observed during the treatment period. The use of topical antibiotics for the treatment of infected wounds confers many benefits. Moxifloxacin is therefore an ideal candidate, due to its broad antibacterial spectrum, its high efficiency, and its potential to promote wound healing.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1]. Apelqvist, J., Larsson, J. (2000). What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? *Diabetes Metab Res Rev* **16 Suppl 1**: S75-83.
- [2]. Barber, M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* **14**: 385-93.
- [3]. Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M. (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **2**: 641-4.
- [4]. Baum, C.L., Arpey, C.J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* **31**: 674-86; discussion 686.
- [5]. Benner, E.J., Kayser, F.H. (1968). Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2**: 741-4.
- [6]. Blondeau, J.M. (1999). A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new respiratory quinolones'. *J Antimicrob Chemother* **43 Suppl B**: 1-11.
- [7]. Boucher, H.W., Corey, G.R. (2008). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**: S344-9.
- [8]. Bowler, P.G. (2002). Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann Med* **34**: 419-27.
- [9]. Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., Attinger, C.E. (2006). The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* **117**: 12S-34S.
- [10]. Bruce, J., Russell, E.M., Mollison, J., Krukowski, Z.H. (2001). The quality of measurement of surgical wound infection as the basis for monitoring: a systematic review. *J Hosp Infect* **49**: 99-108.
- [11]. Chastre, J., Fagon, J.Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **165**: 867-903.
- [12]. Choi, J.H., Song, M.J., Kim, S.H., Choi, S.M., Lee, D.G., Yoo, J.H., Shin, W.S. (2003). Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3704-7.
- [13]. Clark, R.A. (1993). Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* **11**: 647-66.

- [14]. Cosgrove, S.E., Qi, Y., Kaye, K.S., Harbarth, S., Karchmer, A.W., Carmeli, Y. (2005). The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**: 166-74.
- [15]. Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., Carmeli, Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* **36**: 53-9.
- [16]. Coulombe, P.A. (2003). Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* **121**: 219-30.
- [17]. Crombleholme, T.M. (2000). Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing. *Wound Repair Regen* **8**: 460-72.
- [18]. Dalhoff, A. (2005). Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* **33 Suppl 2**: 55-70.
- [19]. Desrosiers, M., Bendouah, Z., Barbeau, J. (2007). Effectiveness of topical antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro. *Am J Rhinol* **21**: 149-53.
- [20]. Diegelmann, R.F., Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**: 283-9.
- [21]. Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., Beach, M. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**: S114-32.
- [22]. Dissemmond, J., Korber, A., Lehnen, M., Grabbe, S. (2005). [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronic wounds: therapeutic options and perspectives]. *J Dtsch Dermatol Ges* **3**: 256-62.
- [23]. Drenckhahn, D., Asan, E., Benninghoff, A., Benninghoff, D., (2004), Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16., völlig neu bearb. Aufl. ed. AnatomieMünchen: Elsevier Urban & Fischer. XII, 876 S.
- [24]. Drlica, K., Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 377-92.
- [25]. Edwards, R., Harding, K.G. (2004). Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* **17**: 91-6.

- [26]. Estahbanati, H.K., Kashani, P.P., Ghanaatpisheh, F. (2002). Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* **28**: 340-8.
- [27]. Fawley, W.N., Parnell, P., Hall, J., Wilcox, M.H. (2006). Surveillance for mupirocin resistance following introduction of routine peri-operative prophylaxis with nasal mupirocin. *J Hosp Infect* **62**: 327-32.
- [28]. Fitzwater, J., Purdue, G.F., Hunt, J.L., O'Keefe, G.E. (2003). The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma. *J Trauma* **54**: 959-66.
- [29]. Fox, C.L., Jr., Rappole, B.W., Stanford, W. (1969). Control of pseudomonas infection in burns by silver sulfadiazine. *Surg Gynecol Obstet* **128**: 1021-6.
- [30]. Franz, M.G., et al. (2008). Guidelines to aid healing of acute wounds by decreasing impediments of healing. *Wound Repair Regen* **16**: 723-48.
- [31]. Freedman, G., Cean, C., Duron, V., Tarnovskaya, A., Brem, H. (2003). Pathogenesis and treatment of pain in patients with chronic wounds. *Surg Technol Int* **11**: 168-79.
- [32]. French, G.L. (2008). What's new and not so new on the antimicrobial horizon? *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 6**: 19-29.
- [33]. Fridkin, S.K., et al. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* **352**: 1436-44.
- [34]. Fritsch, P., *Dermatologie und Venerologie für das Studium*, in Springer-Lehrbuch2009, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- [35]. Garau, J., Bouza, E., Chastre, J., Gudiol, F., Harbarth, S. (2009). Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* **15**: 125-36.
- [36]. Geffers, C., Gastmeier, P. (2011). Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* **108**: 87-93.
- [37]. Geffers, C., Sohr, D., Gastmeier, P. (2008). Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**: 1167-70.
- [38]. Germann, G., Steinau, H.U. (1993). [Current aspects of burn treatment]. *Zentralbl Chir* **118**: 290-302.
- [39]. Gillitzer, R. (2002). [Modern wound management]. *Hautarzt* **53**: 130-45; quiz 146-7.

- [40]. Gilpin, D.A. (1996). Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns* **22**: 607-11.
- [41]. Giordano, P., Song, J., Pertel, P., Herrington, J., Kowalsky, S. (2005). Sequential intravenous/oral moxifloxacin versus intravenous piperacillin-tazobactam followed by oral amoxicillin-clavulanate for the treatment of complicated skin and skin structure infection. *Int J Antimicrob Agents* **26**: 357-65.
- [42]. Goldstein, E.J., Citron, D.M., Nesbit, C.A. (1996). Diabetic foot infections. Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes Care* **19**: 638-41.
- [43]. Gorecki, P., Schein, M., Rucinski, J.C., Wise, L. (1999). Antibiotic administration in patients undergoing common surgical procedures in a community teaching hospital: the chaos continues. *World J Surg* **23**: 429-32; discussion 433.
- [44]. Graue, N. (2008). MRSA in chronischen Wunden - was gilt es zu beachten? *WundManagement*: 4-7.
- [45]. Grohs, P., Kitzis, M.D., Gutmann, L. (2003). In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 418-20.
- [46]. Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* **368**: 874-85.
- [47]. Guay, D.R. (2006). Moxifloxacin in the treatment of skin and skin structure infections. *Ther Clin Risk Manag* **2**: 417-34.
- [48]. Guo, S., Dipietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res* **89**: 219-29.
- [49]. Harbarth, S., Dharan, S., Liassine, N., Herrault, P., Auckenthaler, R., Pittet, D. (1999). Randomized, placebo-controlled, double-blind trial to evaluate the efficacy of mupirocin for eradicating carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1412-6.
- [50]. Harkaway, K.S., McGinley, K.J., Foglia, A.N., Lee, W.L., Fried, F., Shalita, A.R., Leyden, J.J. (1992). Antibiotic resistance patterns in coagulase-negative staphylococci after treatment with topical erythromycin, benzoyl peroxide, and combination therapy. *Br J Dermatol* **126**: 586-90.

- [51]. Hebda, P.A., Collins, M.A., Tharp, M.D. (1993). Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* **11**: 685-96.
- [52]. Heng, M.C. (2011). Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *Int J Dermatol* **50**: 1058-66.
- [53]. Henne-Bruns, D., Kremer, B., Dürig, M., Barth, H., (2008), *Chirurgie : 311 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Duale Reihe* Stuttgart: Thieme. XXXVII, 1417 S.
- [54]. Hirsch, T., Jacobsen, F., Rittig, A., Goertz, O., Niederbichler, A., Steinau, H.U., Seipp, H.M., Steinstraesser, L. (2009). [A comparative in vitro study of cell toxicity of clinically used antiseptics]. *Hautarzt* **60**: 984-91.
- [55]. Hirsch, T., et al. (2008). Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC Surg* **8**: 5.
- [56]. Hof, H., Dörries, R., Geginat, G., (2009), *Medizinische Mikrobiologie : [Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene] ; 237 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Duale Reihe* Stuttgart: Thieme. XX, 731 S.
- [57]. Hudson, I.R. (1994). The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections: a review of recent experience. *J Hosp Infect* **27**: 81-98.
- [58]. Institut, R.K. (2009). Staphylokokken-Infektionen in Deutschland im Jahr 2002, aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. *Epidemiologisches Bulletin*: 277-284.
- [59]. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among dialysis patients--United States, 2005. (2007). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **56**: 197-9.
- [60]. Jacobsen, F., Mittler, D., Hirsch, T., Gerhards, A., Lehnhardt, M., Voss, B., Steinau, H.U., Steinstraesser, L. (2005). Transient cutaneous adenoviral gene therapy with human host defense peptide hCAP-18/LL-37 is effective for the treatment of burn wound infections. *Gene Ther* **12**: 1494-502.
- [61]. Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., Gratzl, M., *Histologie, in Springer-Lehrbuch* 2005, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- [62]. Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* **40**: 615-21.

- [63]. Kalghatgi, S., Friedman, G., Fridman, A., Clyne, A.M. (2010). Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* **38**: 748-57.
- [64]. Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* **12**: 390-9; quiz 400-1.
- [65]. Karow, T., Lang-Roth, R., (2012), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2012 ; [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2011, Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, umfassende Dosierungen ; in Farbe]*. 20. Aufl. edPulheim: [Selbstverl.]. 1275 S.
- [66]. Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S., Irikura, T. (1980). Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J Med Chem* **23**: 1358-63.
- [67]. Kohn, D.F., Martin, T.E., Foley, P.L., Morris, T.H., Swindle, M.M., Vogler, G.A., Wixson, S.K. (2007). Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **46**: 97-108.
- [68]. Kruse, M., Stahlmann, R. (2006). [New antibiotics for the therapy of respiratory tract infections]. *Pneumologie* **60**: 417-27.
- [69]. Kujath, P., Michelsen, A. (2008). Wunden - von der Physiologie zum Verband. *Dtsch Ärzteblatt* **105**: 239-248.
- [70]. Lapolla, W.J., Levender, M.M., Davis, S.A., Yentzer, B.A., Williford, P.M., Feldman, S.R. (2011). Topical antibiotic trends from 1993 to 2007: use of topical antibiotics for non-evidence-based indications. *Dermatol Surg* **37**: 1427-33.
- [71]. Lentino, J.R., Narita, M., Yu, V.L. (2008). New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 3-15.
- [72]. Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P. (1962). 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem* **91**: 1063-5.
- [73]. Lowy, F.D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* **339**: 520-32.
- [74]. Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* **5**: e1000354.

- [75]. Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**: 75-81.
- [76]. Martinez, L.R., Han, G., Chacko, M., Mihu, M.R., Jacobson, M., Gialanella, P., Friedman, A.J., Nosanchuk, J.D., Friedman, J.M. (2009). Antimicrobial and healing efficacy of sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. *J Invest Dermatol* **129**: 2463-9.
- [77]. Mattner, F., Bange, F.C., Meyer, E., Seifert, H., Wichelhaus, T.A., Chaberny, I.F. (2012). Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: recommendations of an expert panel of the German Society For Hygiene and Microbiology. *Dtsch Arztebl Int* **109**: 39-45.
- [78]. McConeghy, K.W., Mikolich, D.J., LaPlante, K.L. (2009). Agents for the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy* **29**: 263-80.
- [79]. McManus, A.T., Mason, A.D., Jr., McManus, W.F., Pruitt, B.A., Jr. (1985). Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol* **4**: 219-23.
- [80]. Menke, N.B., Ward, K.R., Witten, T.M., Bonchev, D.G., Diegelmann, R.F. (2007). Impaired wound healing. *Clin Dermatol* **25**: 19-25.
- [81]. Meyer, W., Schwarz, R., Neurand, K. (1978). The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* **7**: 39-52.
- [82]. Mostow, E.N. (1994). Diagnosis and classification of chronic wounds. *Clin Dermatol* **12**: 3-9.
- [83]. Moxifloxacin. (2008). *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 127-31.
- [84]. Mu, Y.P., Liu, R.L., Wang, L.Q., Deng, X., Zhu, N., Wei, M.D., Wang, Y. (2012). Moxifloxacin monotherapy for treatment of complicated intra-abdominal infections: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Clin Pract* **66**: 210-7.
- [85]. Muijsers, R.B., Jarvis, B. (2002). Moxifloxacin in uncomplicated skin and skin structure infections. *Drugs* **62**: 967-73; discussion 974-5.
- [86]. Mutschler, W. (2012). [Physiology and pathophysiology of wound healing of wound defects]. *Unfallchirurg* **115**: 767-73.
- [87]. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. (2004). *Am J Infect Control* **32**: 470-85.

- [88]. Neely, A.N., Gardner, J., Durkee, P., Warden, G.D., Greenhalgh, D.G., Gallagher, J.J., Herndon, D.N., Tompkins, R.G., Kagan, R.J. (2009). Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics? *J Burn Care Res* **30**: 19-29.
- [89]. Norrby, S.R., Nord, C.E., Finch, R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis* **5**: 115-9.
- [90]. O'Meara, S., Nelson, E.A., Golder, S., Dalton, J.E., Craig, D., Iglesias, C. (2006). Systematic review of methods to diagnose infection in foot ulcers in diabetes. *Diabet Med* **23**: 341-7.
- [91]. Paladino, J.A. (2002). Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. *Am J Health Syst Pharm* **59**: 2413-25.
- [92]. Parish, L.C., Routh, H.B., Miskin, B., Fidelholtz, J., Werschler, P., Heyd, A., Haverstock, D., Church, D. (2000). Moxifloxacin versus cephalexin in the treatment of uncomplicated skin infections. *Int J Clin Pract* **54**: 497-503.
- [93]. Pomahac, B., Svensjo, T., Yao, F., Brown, H., Eriksson, E. (1998). Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 333-44.
- [94]. Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* **17**: 1063-72.
- [95]. Resch, A., Wilke, M., Fink, C. (2009). The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. *Eur J Health Econ* **10**: 287-97.
- [96]. Robson, M.C., Mannari, R.J., Smith, P.D., Payne, W.G. (1999). Maintenance of wound bacterial balance. *Am J Surg* **178**: 399-402.
- [97]. Rook, A., Burns, T., Wiley online library., Rook's textbook of dermatology, 2010, Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ.
- [98]. Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., Prince, A.S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 1209-23.
- [99]. Santos, N.R., de, M.S.J.B., Almeida, P.F., Ribeiro, A.A., Cangussu, M.C., dos Santos, J.N., Pinheiro, A.L. (2011). Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg* **29**: 177-82.
- [100]. Schiebler, T.H., Korf, H.-W., Anatomie : Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, in Springer-Lehrbuch2007, Steinkopff Verlag: Darmstadt.

- [101]. Sprugel, K.H., McPherson, J.M., Clowes, A.W., Ross, R. (1987). Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am J Pathol* **129**: 601-13.
- [102]. Steinstraesser, L., Oezdogan, Y., Wang, S.C., Steinau, H.U. (2004). Host defense peptides in burns. *Burns* **30**: 619-27.
- [103]. Steinstraesser, L., et al. (2002). Activity of novispirin G10 against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1837-44.
- [104]. Steinstraesser, L., et al. (2006). A novel titanium wound chamber for the study of wound infections in pigs. *Comp Med* **56**: 279-85.
- [105]. Stevens, D.L., Herr, D., Lampiris, H., Hunt, J.L., Batts, D.H., Hafkin, B. (2002). Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis* **34**: 1481-90.
- [106]. Stone, H.H. (1966). Review of pseudomonas sepsis in thermal burns: verdoglobulin determination and gentamicin therapy. *Ann Surg* **163**: 297-305.
- [107]. Stover, C.K., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-64.
- [108]. Stryjewski, M.E., Corey, G.R. (2009). New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care* **15**: 403-12.
- [109]. Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* **9**: 66-76.
- [110]. Tammelin, A., Lindholm, C., Hambræus, A. (1998). Chronic ulcers and antibiotic treatment. *J Wound Care* **7**: 435-7.
- [111]. Tarnuzzer, R.W., Schultz, G.S. (1996). Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* **4**: 321-5.
- [112]. Thomas Hess, C. (2011). Checklist for factors affecting wound healing. *Adv Skin Wound Care* **24**: 192.
- [113]. Vardaxis, N.J., Brans, T.A., Boon, M.E., Kreis, R.W., Marres, L.M. (1997). Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat* **190 (Pt 4)**: 601-11.
- [114]. Vinh, D.C., Embil, J.M. (2005). Rapidly progressive soft tissue infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 501-13.

- [115]. Warburton, D.W., Bowen, B., Konkle, A. (1994). The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. *Can J Microbiol* **40**: 987-92.
- [116]. Weber, C. (2007). Die Haut - Schutz und schutzbedürftig zugleich. *Dtsch Apoth Ztg* **6**: 598- 602.
- [117]. Weiss, T., Shalit, I., Blau, H., Werber, S., Halperin, D., Levitov, A., Fabian, I. (2004). Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1974-82.
- [118]. White, R.J., Cutting, K.F. (2006). Critical colonization--the concept under scrutiny. *Ostomy Wound Manage* **52**: 50-6.
- [119]. Wiedemann, B., Heisig, P. (1993). [Fluoroquinolone carboxylic acids: is research on the development of resistance becoming invalidated?]. *Pharm Unserer Zeit* **22**: 286-95.
- [120]. Williams, A., (2003), *Transdermal and topical drug delivery : from theory to clinical practice* London [u.a.]: Pharmaceutical Press PhP. xii, 242 S.
- [121]. Winter, H., Nusser, B. (2003). Problemwunden-Herausforderung für Medizin und Pflege. *Hartmann Wundforum* **3**: 8-13.
- [122]. Wischnewski, H., Mielke, M. (2007). Übersicht über aktuelle Eradikationsstrategien bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus verschiedenen Ländern. *WundManagement* **6**: 243-248.

DANKSAGUNGEN

Rückblickend auf die letzten Jahre gilt mein besonderer Dank **Herren Prof. Dr. Lars Steinsträßer** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe des Labors für Molekulare Onkologie und Wundheilung der Klinik für Plastische Chirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Steinau.

Die unentwegte wissenschaftliche, persönliche und freundschaftliche Unterstützung, Motivation, Förderung und Betreuung dieser Arbeit, wie auch meiner Selbst, war stets ein zentrales Anliegen von Herren Professor Steinsträßer. Er gab mir immer die Möglichkeit meine wissenschaftlichen Ideen frei zu entfalten, realisieren und darüber hinaus meine Ergebnisse in den USA zu präsentieren. Auch mein praktisches Jahr in den USA wäre ohne Ihn nicht möglich gewesen.

Des Weiteren, möchte ich mich bei **Herren Dr. Frank Jacobsen** für seine freundschaftliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit, der theoretischen Planung und Durchführung dieser Arbeit, sowie sein exzellentes Fachwissen bedanken.

Ebenso gilt mein Dank **Frau Andrea Rittig, Herren Dr. Matthias Schulte** sowie der **gesamten Arbeitsgruppe**, für die unentwegte Hilfestellung, Bereitschaft zur kritischen/ernsten/lustigen Diskussion und eine in jeder Hinsicht enorm bereichernde Zusammenarbeit.

Auch möchte ich mich bei all meinen Freunden für die fortwährende Unterstützung in jeder Hinsicht bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank **Thomas Irlbeck** und **Rafael Hasler**, die während der gesamten Zeit immer für mich da waren.

Am Ende gilt mein größter Dank jedoch **meinen Eltern** und insbesondere meiner verstorbenen Mutter die das Ende dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte und der ich diese Arbeit in tiefer Liebe und Verbundenheit gewidmet habe, für Ihren unentwegten Beistand, die Begleitung durch Freuden und Leiden und Ihr stetes Bestreben mir die Ausbildung zum Arzt und die Anfertigung dieser Arbeit zu ermöglichen. Danke aus tiefstem Herzen!

LEBENS LAUF

Christian André Fisahn

* 05/07/1982 in Dortmund, Deutschland

AUSBILDUNG

03/2012	BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH , Bochum, Assistenzarzt für Unfallchirurgie und Orthopädie
11/2011	Aprobation als Arzt
11/2011	Universität Witten/ Herdecke , Witten Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2008 – 11/2011	Ruhr-Universität Bochum , Bochum BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH Klinik für Plastische Chirurgie Labor für Molekulare Onkologie und Wundheilung
04/2005 – 11/2011	Universität Witten/Herdecke , Witten Studium der Humanmedizin
08/1996 – 07/2002	Rudolf-Steiner-Schule Dortmund , Dortmund Allgemeine Hochschulreife
01/1999 – 12/1999	Seton-Catholic-Central High School , Plattsburgh, USA, High School Year
08/1993 – 12/1996	Goethe Gymnasium Dortmund , Dortmund
Praktisches Jahr	
09/2010 – 01/2011	Chirurgie/Unfallchirurgie, Helios Klinikum Wuppertal, Universität Witten/Herdecke, Witten
05/2010 – 09/2010	Innere Medizin, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA
02/2010 – 05/2010	Plastische Chirurgie, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Mitglied in folgenden Fachgesellschaften

2010	Plastic Surgery Research Council (PSRC)
2009	European Plastic Surgery Research Council (EPSRC)

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten und Medline gelistete Abstracts

Fisahn C, Steinstraesser L, Kuzon WM Jr: *Financial Viability of Outpatient Wound Care Centers in the United States* (in submission)

Jacobsen F, **Fisahn C**, Sorkin M, Thiele I, Hirsch T, Stricker I, Klaassen T, Roemer A, Fugmann B, Steinstraesser L: *Efficacy of Topically Delivered Moxifloxacin against Wound Infection by Pseudomonas aeruginosa and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, Antimicrob Agents Chemother. 2011 May; 55(5):2325-34. Epub 2011 Feb. 22. [Impact 2011: 4.802]

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Efficacy testing of topical delivered Moxifloxacin against MRSA in a porcine wound infection model*, Burns 35S (2009) S21: FRI016

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Antimicrobial activity of Moxifloxacin against MRSA wound infection in a large animal wound infection model*, Plastic and Reconstructive Surgery, June Supplement 2009, 99

Vorträge und Poster auf wissenschaftlichen Kongressen

Fisahn C, Steinstraesser L, Kuzon WM Jr: *Financial Viability of Outpatient Wound Care Centers in the United States*, European Plastic Surgery Research Council, 3rd

Kraneburg U, Jacobsen F, Thiele I, **Fisahn C**, Jeismann P, Ring A, Al-Benna S, Langer S, Stricker I, Steinau HU, Steinstraesser L: *Beta Defensins in a Gram Positive Infected Porcine Skin Wound*, 56. Plastic Surgery Research Council, Louisville, Kentucky, USA, May 2011 (oral presentation)

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Moxifloxacingel gegen MRSA im infiziertem Großtiermodell*, Chirurgisches Forum „Tissue Engineering und Wundheilung“.127. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 20-23.4.2010, ICC Berlin, Germany (oral presentation)

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Topische Therapie mit Moxifloxacin bei MRSA-Infektion in einem porcinen Wundmodell*, Jahrestagungen DGPRÄC/VDÄPC Hannover, Germany, September 2009 (poster presentation)

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Efficacy testing of topical delivered Moxifloxacin against MRSA in a porcine wound infection model*, FRI016, EBA 13th European Burns Association Congress, Lusane, Switzerland, September 2009 (poster presentation)

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, AL-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Antimicrobial activity of Moxifloxacin against MRSA wound infection in a large animal wound infection model*, 54. Plastic Surgery Research Council, Pittsburgh, USA, May 2009 (oral presentation)

Buchkapitel

Fisahn C, Jacobsen F, Hirsch T, Thiele I, Al-Benna S, Fugmann B, Steinau HU, Steinstraesser L: *Moxiflosacingel gegen MRSA im infizierten Großtiermodell*. Chirurgisches Forum 2010, 39: 257-258