Untersuchungen zur Wundheilung unter Verwendung von Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester

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 Peter Jeismann, geboren am 19. März 1973 in Dortmund

Betreuer:

Klinik:

Prof. Dr. med. Lars Steinsträßer

Klinik für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie Evangelisches Krankenhaus Oldenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen3		
1.	Einleitung	5
1.1	Anatomie der Haut	5
1.2	Wunde und Wundheilung	8
1.3	Defizitäre Wundheilung	9
1.4	Therapieoptionen	10
1.5	Kieselgel	14
1.6	Wachstumsfaktoren TGF-β	16
1.7	Modellorganismus Schwein	17
1.8	Aufbau und Ziel dieser Arbeit	18
2.	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.2	Tierversuch	24
2.3	Präparation der Untersuchungsareale	25
2.4	Wundversorgung	26
2.5	Postoperatives Prozedere	28
2.6	Planimetrie	
2.7	Verbandwechsel	28
2.8	Biopsiegewinnung	29
2.9	Messung der Narbenstabilität	
2.10	Histologische Beurteilung	
2.11	Expressionsbestimmung für TGF- β 1 und TGF- β 2	31
2.11.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	31
2.11.2	Expressionsanalyse	32
2.12	Immunhistochemische Darstellung	33
2.12.1	Markierung mit MAC 387, Anti-CD 68 und Anti-Cathepsin K	33
2.12.2	Inkubation mit Sekundärantikörpern	34
2.12.3	Anfärben der markierten Strukturen	35
2.12.4	Peroxidasefärbung	35

2.12.5	Hämatoxylin-Gegenfärbung	35
2.12.6	Fluoreszenzfärbung	36
2.13	Ermittlung von Fremdkörpergranulomen	36
2.14	Statistische Verfahren	37
3.	Ergebnisse	38
0.4	Vereuebachlauf	20
3.1 2.2	Wundheilung	ەدەر مە
3.Z		
3.3 2.4		41
3.4 2.5		40
3.5		
3.0	Expression von TGF-p T und TGF-p Z	
3.7	Entzundungsreaktionen	
4.	Diskussion	65
1 1	Mundhailung	GE
4.1	Tiermedell	
4.2		68
4.5	Einfluss auf die Wachstumsfaktoren	60
4.4	Abbau dos Kiosolsäuromatorials <i>in vivo</i>	
4.5		70
4.0	Aughlick und klinischer Nutzen	
4.7		12
5.	Zusammenfassung	73
6.	Literatur	77
7.	Anhang	83
7.1	Danksagung	83
7.2	Erklärung	85
7.3	Lebenslauf	85

Abkürzungen

°C	Grad Celsius	
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)	
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary	
	desoxyribonucleic acid)	
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)	
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	
g	Gramm	
h	Stunde (<i>hora</i>)	
HE	Hämatoxylin und Eosin	
IL	Interleukin	
i.m.	intramuskulär	
i.v	intravenös	
kg	Kilogramm	
kgKG	Kilogramm Körpergewicht	
I	Liter	
m	Meter	
MAC	(Antikörper) monoclonal antibody core	
mg	Milligramm	
min	Minute	
ml	Milliliter	
mm	Millimeter	
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Hydrargyros)	
mМ	millimolar	
MMP	Matrix-Metalloproteinasen	
Ν	Newton	
ng	Nanogramm	
OP	Operation	
PBS	phosphatgepufferte NaCI-Lösung (phosphate buffered saline)	
PBST	PBS mit 0,05% Polysorbat-20 (Tween 20)	
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)	

pН	negativer dekadischer Logarithmus der	
	Wasserstoffionenkonzentration (potentia Hydrogenii)	
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)	
SD	Standardabweichung (standard deviation)	
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)	
sec	Sekunde (<i>secunda</i>)	
S.C.	subkutan	
SMAD	(intrazelluläres Protein) s <i>mall body size mothers against</i>	
	decapentaplegic	
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)	
TNF	Tumornekrosefaktor	
μm	Mikrometer	
μg	Mikrogramm	
μl	Mikroliter	
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial	
	growth factor)	
VGF	vaskulärer Wachstumsfaktor (vascular growth factor)	
Vol%	Volumenprozent	
хg	vielfaches der Gravitationsbeschleunigung	

1. Einleitung

Die Haut ist nach der Muskulatur das größte Organ des menschlichen Körpers. Als Grenzschicht zwischen Organismus und Umwelt hat die Haut die primäre Aufgabe, den Körper vor äußeren Einflüssen zu schützen. Gleichzeitig muss für die Beweglichkeit des Organismus eine ausreichende Flexibilität erhalten bleiben. Als großflächiges Sinnesorgan leitet die Haut mechanische und thermische Reize sowie Schmerz weiter. Hierbei werden äußere, aber auch innere Reize wahrgenommen, verarbeitet und an das Zentralnervensystem Für einzelne spezifische Regulationsvorgänge, weitergeleitet. wie die Temperaturkontrolle und die Hautatmung, ist eine begrenzte Durchlässigkeit für thermische Energie, Sauerstoff, Kohlendioxid und Wasser erforderlich. Darüber hinaus hat die Haut im Laufe der Evolution immer wieder Funktionen der Kommunikation entwickelt, die auch beim Menschen eine Rolle spielen und Stimmungen, Krankheiten und Verletzungen anzeigen.

Im grundsätzlichen Aufbau hat sich die Haut evolutionär bei den Säugetieren analog entwickelt und zeigt im Tiermodell dementsprechend teilweise reproduzierbare Eigenschaften, die auf die Verhältnisse der menschlichen Haut übertragen werden können. Hierbei ist die Fähigkeit der Haut, nach einer Verletzung zu heilen, von wesentlicher Bedeutung. Diese Fähigkeit unterliegt verschiedensten Einflussfaktoren und kann durch eine Reihe therapeutischer Maßnahmen unterstützt werden.

1.1 Anatomie der Haut

Die Haut ist in drei Schichten Epidermis, Dermis und Subkutis aufgebaut (Abb. 1). Die Epidermis ist die äußerste Grenzschicht und besteht aus Epithelgewebe, welches sich vornehmlich aus Keratinozyten zusammensetzt. Die Keratinozyten bilden mit ihren stabilen Kontaktflächen, den Desmosomen, einen dichten Zellverbund. An der Gesichtshaut kann die Epidermis stellenweise nur 0,05 mm dünn sein, während sie an der Fußsohle eine Stärke von 4 mm und mehr erreicht.

Die äußerste Schicht der Epidermis ist das *Stratum corneum*, welches aus fest verbundenen avitalen Epithelzellen ohne Zellkern besteht und sich von den vitalen Zellen abgrenzt. An der Leistenhaut der Hand- und Fußflächen findet diese Abgrenzung über eine lipidreiche Schicht, das *Stratum lucidum* statt. Bei den Schleimhäuten fehlen diese beiden äußeren avitalen Schichten.

Die tiefste Schicht der Epidermis ist das *Stratum basale. Hier* befinden sich die Basalzellen, die durch Zellteilung die Epidermis stetig erneuern. Während eine Tochterzelle an der Basalmembran, der Grenze zwischen Epidermis und Dermis, verbleibt, wandert die andere über die darüberliegenden Schichten, das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulare*, unter zunehmenden Verlust der Organellen zur Oberfläche, um schließlich als avitales Zytoskelett Teil der äußersten Hornschicht zu werden. Ebenfalls an der Basalmembran, zwischen den Basalzellen, befinden sich die Melanozyten. Diese produzieren das Pigment Melanin und schleusen es über Melanosomen in die Keratinozyten ein, um die tieferen Gewebe vor ultravioletter Strahlung zu schützen. Das *Stratum basale* kleidet auch Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen aus, die tiefer in die Haut hineinragen.



Abb. 1: Schematische Darstellung der Haut. Quelle: http://www.scfonline.com/english/27_e/Images27_e/skin_verybig27_e.jpg 06.02.2012)

Die unter der Epidermis liegende Lederhaut, die Dermis, ist der stabilisierende

Teil der Haut. Sie besteht größtenteils aus Bindegewebe, ist zwischen 1 mm und 20 mm dick und verankert die Hautanhangsgebilde wie Haare und Nägel. Neben den Haarfollikeln befinden sich in der Dermis merokrine, holokrine und apokrine Drüsen mit den entsprechenden Ausführungsgängen und auch Nerven und Blutgefäße.

Die wesentlichen Zellen der Dermis sind die Fibroblasten. Sie synthetisieren die stabilisierenden bindegewebigen Vernetzungen aus Kollagen und Proteoglycanen und leisten damit den maßgeblichen Beitrag zur Bildung der mechanisch bedeutsamen Eigenschaften der Haut, wie Elastizität und Reißfestigkeit. Die Fibroblasten synthetisieren und sezernieren, ebenso wie in der Dermis vorkommende extravasale Leukozyten auch, Zytokine zur Signalübermittlung zwischen den Zellen. Diese Botenstoffe übernehmen z.B. bei Verletzungen und Heilungsvorgängen wichtige Steuerungsfunktionen der Keimabwehr und der Regeneration.

Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten. Oberflächennah liegt das *Stratum papillare*, das direkt an die Epidermis über die Basalmembran angrenzt, mit dieser zapfenförmig verzahnt ist und sie über ein Kapillarnetz mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. In diesen oberflächennahen Papillen befinden sich Rezeptoren und Tastkörper, die die Wahrnehmung mechanischer Reize und der Temperatur ermöglichen. Auch freie Nervenendigungen befinden sich dort, die teilweise bis in die Epidermis reichen können.

Die tiefer gelegene, proximale Schicht der Dermis ist das von Kollagenund Elastinfasern durchflochtene *Stratum reticulare*, das mit seinen stabilisierenden und elastischen Eigenschaften den wesentlichen Anteil der Lederhaut darstellt. Weitere Strukturen innerhalb des *Stratum reticulare* sind Schweißdrüsen und Haarfollikel. Auch der Großteil der Mechanorezeptoren befindet sich in diesem Bereich, wie z.B. die Dehnungsreiz signalisierenden Ruffinikörperchen, die vibrationsempfindlichen Vater-Pacini-Körperchen oder in der Leistenhaut der Handflächen und Fußsohlen - die drucksensiblen Meissner-Tastkörper.

Die unter der Dermis liegende Subkutis besteht zum Großteil aus Fettzellen, Adipozyten, die der Energiespeicherung, der Regulation des Fettstoffwechsels und des Wärmehaushaltes dienen. Auch mesenchymale Stammzellen sind hier beherbergt. Die Subkutis ist von bindegewebigen Strängen und Septen durchzogen, die die Haut mit der darunter liegenden Muskelfaszie bzw. der Knochenhaut verbinden und somit zum einen die Haut stabilisieren und zum anderen als Verschiebeschicht die erforderliche Beweglichkeit ermöglichen. In der Subkutis befinden sich zudem größere Gefäße und Nerven, die als Leitungsbahnen auch längere Strecken überwinden.

1.2 Wunde und Wundheilung

Die Einflüsse, die ständig auf die Haut wirken, bedeuten Beanspruchung, Belastung und potenzielle Gefährdung für die Integrität der Haut und damit eine Gefährdung für den Schutz des Organismus. Die Einflüsse von außen sind oft physikalischer Natur, wie Druck, Zug und Scherkräfte, Strahlung und Temperatur. Wird dabei die Belastungsgrenze der Haut überschritten, entsteht eine Wunde - sei es, dass diese Einflüsse akut Verletzungen verursachen oder dass sie die Haut durch dauerhaftes Wirken schädigen.

Wunden können aber auch durch Fehlregulationen des Körpers verursacht werden. Typische Vertreter dieser intrinsischen Faktoren sind Durchblutungsstörungen wie arterielle Verschlusskrankheit und venöse Insuffizienz. Aber auch Sensibilitätsstörungen verursachen häufig indirekt Wunden, wenn sie verhindern, dass Druckläsionen rechtzeitig bemerkt werden. Auch seltenere Ursachen wie Autoimmunprozesse mit Vaskulitis sowie infektiöse und bösartige Erkrankungen können zur Entstehung von Wunden führen.

Weil all diese Einflüsse sehr unterschiedlicher Natur sind, muss das Abwehrverhalten der Haut entsprechend flexibel angepasst sein. Verletzungen müssen verzögerungsarm, effektiv und dauerhaft geschlossen werden, nach der Heilung sollten Flexibilität und Elastizität erhalten bleiben und die Thermoregulation sollte weiter uneingeschränkt funktionieren.

Eine oberflächliche Wunde, bei der nur die Epidermis beschädigt ist, wird als Erosion bezeichnet. Bei ungestörten physiologischen Verhältnissen verheilt eine solche Verletzung ohne Narbenbildung durch Rekrutierung teilungsfähiger Keratinozyten.

Ein tieferer Defekt, der in die Dermis hinein ragt, verheilt dagegen unter Bildung einer Narbe, in der Haarfollikel und Drüsen nicht wiederhergestellt werden. Der Heilungsvorgang einer Wunde ist umso störungsanfälliger, je mehr Gewebe geschädigt ist. Die Phasen der Wundheilung, die sich in ihrer Abfolge überlappen, sind Hämostase, Exsudation, Proliferation und Regeneration.

Sind Blutgefäße verletzt, setzen zunächst die Prozesse der Blutgerinnung, der Hämostase ein. Die Thrombozytenaggregation und die durch die Gerinnungsfaktoren des Blutplasmas entstehenden Fibrinvernetzungen sorgen für eine Eindämmung des Blutverlustes, indem sie die verletzten Blutgefäße verschließen. In der folgenden Exsudationsphase werden Zytokine aktiv, Faktoren des angeborenen Immunsystems und Wachstumsfaktoren, die zum einen antibakteriell wirken können und damit eine Keiminvasion unterdrücken und zum anderen Teile des erworbenen Immunsystems zur gezielten Keimabwehr aktivieren. Innerhalb der ersten Stunden wandern als Zellen des erworbenen Immunsystems zunächst neutrophile Granulozyten und kurz darauf Monozyten ein. Im späteren Verlauf der Wundheilung wandern aus den umliegenden Strukturen der verletzten Dermis die beweglichen Fibroblasten in die Wunde. Die eingewanderten Zellen sezernieren weitere Zytokine zur Keimabwehr und zum Wundverschluss. Nach außen kann als Zeichen der Entzündung eine sichtbare Schwellung des umliegenden Gewebes deutlich werden.

In den anschließenden Phasen der Proliferation und Regeneration finden vermehrt Zellteilungen statt. Das von den Fibroblasten synthetisierte Kollagen vernetzt sich, das Bindegewebe organisiert sich zur Narbe, Gefäße sprossen ein. Schließlich werden die bei der Verwundung entstandenen Verluste in der oberflächlichen Epidermis durch proliferierende Keratinozyten wieder ausgeglichen, und die Wunde wird auch an der Oberfläche wieder verschlossen (Singer et al., 1999).

1.3 Defizitäre Wundheilung

Störungen in der Wundheilung sind eine häufige Herausforderung in der Medizin. Zeigt eine Wunde bei konsequenter ursachenbezogener Therapie nach vier Wochen keine Heilungstendenz, spricht man von einer chronischen Wunde (Sedlarik, 1998). Häufig sind lokale Störfaktoren. wie Mangeldurchblutung bei Angiopathie, fehlendes Schmerzempfinden durch Neuropathie, lokaler Druck, Ödeme und Wundinfektion an der Entstehung chronischer Wunden beteiligt. Damit vergesellschaftet fördern allgemeine Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Mangelernährung und Immobilität die Entstehung chronischer Wunden. Auch langjährige Nikotinabhängigkeit und Adipositas sind häufige Begleitumstände bei einer ausbleibenden Wundheilung. In den Industrienationen leiden geschätzte 5% der Population an chronischen Wunden (Mostow, 1994). In Deutschland werden jährlich ca. 4 Millionen Menschen mit chronischen Wunden behandelt (Schmidt, 2010).

Die häufigsten Ursachen für Heilungsstörungen bei Wunden sind Durchblutungsstörungen. In den USA beispielsweise sind ca. 1% der Gesamtbevölkerung bzw. 3,5% der über 65 jährigen aufgrund venöser Insuffizienz von chronischen Wunden betroffen (Moor et al., 2009).

Der auslösende Faktor von Dekubitalgeschwüren ist andauernde mechanische Belastung, die zur lokalen Minderdurchblutung führt. In Verbindung mit verminderter Wahrnehmung von Wundschmerz und mangelnder Mobilität entsteht so diese Läsion.

Meist sind die Ursachen der Chronifizierung einer Wunde multifaktoriell. Neben der schlechten Durchblutung sind primär aseptische Wunden oft bakteriell kontaminiert, kolonialisiert und auch heilungsstörend infiziert, eventuell mit multiresistenten Keimen (Robson et al., 1990). Die Behandlung dieser Wunden gestaltet sich in vielen Fällen langwierig, was belastend für die Patienten und unbefriedigend für die Behandelnden ist (Pragnell et al., 2010).

Die unterschiedlichen Faktoren chronischer Wunden und die daraus resultierenden Aspekte einer gestörten Wundheilung erfordern eine individuell angepasste Therapie und eine entsprechend große Bandbreite der therapeutischen Möglichkeiten.

Für ein erfolgreiches Ergebnis ist neben der direkten Wundbehandlung stets die Mitbehandlung der zugrundeliegenden Ursache und der beteiligten Grunderkrankungen notwendig. Bei venöser Insuffizienz muss durch Kompression der Extremität die Fließgeschwindigkeit des Blutes erhöht werden, bei arteriellen Verschlüssen muss die Durchblutung ggf. durch operative Maßnahmen verbessert werden, bei Zuckerkrankheit ist eine Normalisierung des Stoffwechsels anzustreben (Rüttermann, 2013).

1.4 Therapieoptionen

Die natürlichen Prozesse der Wundheilung bei akuten oder chronischen Wunden können durch therapeutische Maßnahmen direkt an der Wunde erheblich unterstützt werden. Schon bei einer akuten Verletzung stehen dem Behandelnden in der ersten Phase verschiedene Maßnahmen zur Verfügung, um die Hämostase zu unterstützen. Hierzu zählen Kompression der verletzten oder zuführenden Gefäße, Hochlagerung des betroffenen Körperteils und auch gerinnungsfördernde Verbandmittel, wie QuikClot[®].

Um Heilungsstörungen und Chronifizierungen zu verhindern, ist die Vermeidung bzw. die rechtzeitige Wahrnehmung und konsequente Behandlung von Wundinfektionen von entscheidender Bedeutung.

Zur Vorbereitung von Operationswunden ist der Einsatz desinfizierender Präparate in oberflächlicher Anwendung vor dem Eingriff hinlänglich auf Wirksamkeit untersucht und im klinischen Alltag etabliert. Auch Bäder in desinfizierenden Präparaten können sich indikationsbezogen als nützlich erweisen (Webster et al., 2007).

Bei Schnittwunden ist oft der primäre Wundverschluss durch Herbeiführung von direktem Kontakt der Schnittränder mittels Naht oder Klebestreifen indiziert. Bei komplikationslosen Verläufen bleibt eine so versorgte Wunde nach wenigen Tagen dauerhaft verschlossen.

Wunden, die nicht mittels Primärverschluss therapiert werden, benötigen längere Heilungszeiten und aufwendigere Verfahren.

Als chirurgische Therapie von großflächigen Wunden werden Methoden wie die autologen Spalt- und Vollhauttransplantation und andere plastische Rekonstruktionsverfahren angewendet.

Bei kleineren und potenziell infizierten Defekten der Haut mit Substanzverlust ist die offene Wundheilung eine häufige und technisch einfache Methode, bei der die Wunde sauber und gleichzeitig feucht gehalten wird. Hierbei heilt die Wunde vom Wundgrund her in Richtung Oberfläche wie zu. Der Heilungsverlauf mit Exsudation und Proliferation soll dabei durch Erhalt eines feuchten Wundmilieus unterstützt werden. Nekrotisches Gewebe dagegen sollte trocken gehalten werden, um die Entwicklung einer feuchten Gangrän zu vermeiden. Grundsätzlich sind Nekrosen aber chirurgisch zu entfernen, um die Infektionsgefahr zu reduzieren (Hunt, 1997; Mustoe et al., 2006).

Das Prinzip der offenen Wundheilung wird im einfachsten Fall verwirklicht durch regelmäßige Spülung der Wunde mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung und Débridement, wobei avitales Gewebe sowie potentiell infizierte Flüssigkeiten und Beläge entfernt werden. Dieses Vorgehen kann durch verschiedene Wundauflagen und durch kontinuierliche Absaugung bei der Vakuumtherapie unterstützt werden.

11

Wird eine Wundauflage eingesetzt, sollte diese gewisse Standards erfüllen, um den Heilungsvorgang optimal zu unterstützen: Sie sollte eine Barrierefunktion zum Schutz gegen eindringende Krankheitserreger bieten, Wundsekret aufnehmen und gleichzeitig die Wunde vor dem Austrocknen schützen. Dabei gelingt im Idealfall die Anregung von Zellproliferation, Kollagenproduktion und Heilung (Öztürk et al., 2010).

Bei Wundauflagen müssen prinzipiell zwei Arten der Anwendung unterschieden werden. Zum einen werden Materialien benutzt, die resorbierbar in der Wunde verbleiben, zum anderen werden Materialien zur Verbesserung der Wundheilung in die Wunde verbracht, die von dort wieder entfernt werden müssen.

Resorbierbare dermale Wundauflagen, die schon klinisch etabliert sind, enthalten Substanzen, die dem proliferierenden Gewebe die nötige Grundsubstanz zur Neustrukturierung der Dermis geben. Zu den derzeit am häufigsten verwendeten resorbierbaren Wundauflagen zählen folgende: Suprathel[®], das synthetisch aus Milchsäurepolymeren hergestellt wird. Integra[®], das aus bovinem Kollagen hergestellt und mit einer oberflächlichen Silikonbeschichtung gegen das Austrocknen versehen wird. Matriderm[®], das ebenfalls aus bovinem Kollagen produziert und anteilig mit Elastin versetzt wird. Matriderm[®] wird oft als Goldstandard der resorbierbaren Wundauflagen beschrieben, das in Versuchen bei der Behandlung von Verbrennungswunden auch gute Heilungsergebnisse in Kombination mit autologen Spalthauttransplantationen erzielt hat (Kim et al., 2013).

Mit diesen synthetischen dermalen Ersatzverfahren wird durch semipermeable Eigenschaften eine Keimbarriere geschaffen und das feuchte Milieu der Wunde erhalten. Die genannten Wundauflagen werden biologisch abgebaut, verfügen aber über eine ausreichende Halbwertzeit, um den Heilungsprozess lange genug zu unterstützen, bevor sie nach einer Heilungsdauer von ca. vier bis sechs Wochen abgebaut sind.

Biologische Verfahren, die ebenfalls als resorbierbare Wundauflagen bezeichnet werden können sind der Einsatz azellulärer Dermis humanen oder porcinen Ursprungs, der vielversprechende Ergebnisse in der Wundbehandlung z.B. bei Mammarekonstruktionen zeigt (Ettl et al., 2012), sowie die Anwendung von *in vitro* vermehrten Keratinozyten des Patienten, bei der die Zellen im flächenhaften Zellverbund die nötigen Prozesse der Wundheilung als biologisch aktive Wundauflage unterstützen können (Golinski et al., 2009).

Diesen in der Wunde verbleibenden resorbierbaren Materialien stehen die nicht resorbierbaren Materialien gegenüber, die regelmäßig gewechselt werden müssen und daher prinzipiell einen höheren Arbeitseinsatz bei der Wundversorgung erfordern. Ihnen werden in erster Linie Exsudat bindende und reinigende Wirkungen zugeschrieben (Voggenreiter et al., 2009). Hierzu zählen aus Baumwolle gefertigte Mullkompressen, aus Braunalgen hergestellte Alginate, Gel bildende Hydrokolloide, absorbierende Aktivkohle und auch künstliche Schaumstoffe, wie Polyurethan und Polyacrylat. Diese Materialien binden Flüssigkeit und reduzieren so den potenziellen Nährboden für Keime.

Auch die Vakuumtherapie ist ein Verfahren mit nicht resorbierbaren Wundauflagen. Dabei wird die Wunde mit Polyurethanschaumstoff ausgefüllt, mit einer luftdichten Folie an ein System subatmosphärischen Drucks von üblicherweise negativen 120 mmHg angeschlossen und so durch die permanente Exsudatabsaugung von innen her gereinigt. Zusätzlich wird das Wundödem reduziert, die Durchblutung verbessert und so die Heilung begünstigt (Probst et al., 2010).

Je nach Aspekt der Wunde muss die passende Methode gewählt werden (Fonder et al. 2008). Hydrokolloidverbände zeigen gute Effekte bei trockenen Wunden, nässende oder infizierte Wunden dagegen benötigen eine stärker saugfähige Wundauflage, wie z.B. aus Alginat oder Aktivkohle. Großflächige, mangeldurchblutete nicht heilende Wunden profitieren von der Vakuumtherapie (Clare et al., 2002). Auch Fliegenmaden der Species *Lucilia sericata* werden zur Behandlung von Problemwunden eingesetzt. Hierbei macht man sich zunutze, dass sich diese Tiere hauptsächlich von nekrotischem Gewebe ernähren (Bowling et al., 2007).

Erweiterungen bei der Entwicklung von Wundauflagen stellen solche dar, bei denen Medikamente mit schmerzlindernden oder antimikrobiellen Eigenschaften in das Verbandgewebe eingebracht sind. Versuche mit Wundauflagen, die Ibuprofen in die Wunde abgeben, ergaben Reduktion von Schmerz und Juckreiz bei autologen Hauttransplantationen (Cigna et al., 2009). Es befinden sich bereits zahlreiche Wundauflagen mit Silberionen auf dem Markt, die antibakteriell gegen ein breites Spektrum von Keimen wirken. Auch Kombinationen von Vakuumtherapie mit Silberhaltigen Schwämmen wurden erfolgreich erprobt (Gerry et al., 2007) Ebenso wurden bei Versuchen mit Verbänden, die das Antibiotikum Doxycyclin in die Wunde abgeben, gute Ergebnisse mit reduzierten Infektionsraten erzielt (Adhirajan et al., 2009).

Denkbar nützlich für die Wundverbände könnten auch Farbveränderungen zur Anzeige wichtiger Parameter wie z.B. des pH-Werts sein, da sich mit Zunahme des pH-Werts Hinweise auf Wundheilungsstörungen ergeben können (Dissemond et al., 2003).

Für resorbierbare Wundauflagen wäre mit Blick auf das derzeitige Angebot auch ein günstiger Preis von Vorteil. Vor allem diejenigen Patienten könnten davon profitieren, denen angesichts der globalen sozioökonomischen Bedingungen kein Zugang zu kostenintensiven Therapien zur Verfügung steht. Neben den medizinischen Eigenschaften ist nicht zuletzt auch die Finanzierbarkeit einer Therapie von großer Bedeutung (Carter, 2010).

1.5 Kieselgel

Als mögliche Erweiterung der Optionen für die Wundbehandlung mit resorbierbaren Wundauflagen wird von der Firma Bayer das Material Polyhydroxykieselsäureethylester vorgestellt, das in dieser Studie näher betrachtet werden soll.

Als Kieselsäuren werden die Sauerstoffsäuren des Siliziums bezeichnet. Monokieselsäure, Si(OH)₄, tendiert zu Kodensationsreaktionen, bei denen unter Wasserabspaltung Di- und Trikieselsäuren sowie schließlich cyclische Kieselsäuren und Polykieselsäuren entstehen, deren Summenformel (H_{2n+2} Si_nO_{3n+1}) deren Summenformel oft vereinfacht als Si(OH)₂ H₂O angegeben wird. Am Ende der wasserabspaltenden Reaktionskette steht neben Wasser das Siliciumdioxid (SO₂), das als amorphe Kieselsäure über eine Löslichkeit in Wasser von 120 mg/l verfügt. Durch Kohlensäure, Wasser und Energie wird diese Reaktion in Richtung der Monokieselsäure umgekehrt. Im physikalisch vom Wasser getrennten Zustand sind diese Polykieselsäuren altbewährte Trocknungs- und Adsorptionsmittel, die ca. 1/3 des Eigengewichts an Wasser aufnehmen können. Verkettete und vernetzte amorphe Kieselsäuremoleküle im wässrigen Milieu werden als Kieselgel bezeichnet.

Beim Menschen ist Silizium ein essenzielles Spurenelement, das an der Bildung von Knochen, Knorpel, Haut und Kollagen beteiligt ist.

Zwei Forscher vom Fraunhofer Institut für Silicatforschung in Würzburg, Walther Glaubitt und Jörn Probst, haben eine Technik entwickelt, mit der über Kondensationsreaktionen aus Sole strukturierte Fasern aus Polyhydroxykieselsäureethylester (H[OSi₈0₂(OH)_x(OC₂H₅)_{6-x}]_nOH) hergestellt werden können. Diese werden im Herstellungsprozess zu einem Gewebe versponnen, um als Wundauflagematerial eingesetzt zu werden (Abb. 2; Probst, 2004).

Die systemische Dosierung des Materials, das auch zur Prophylaxe bei Krankheiten mit gestörter Angiogenese verwendet werden soll, wird zwischen 0,1 bis zu 25mg/kgKG pro Tag empfohlen (Patent 2011).



Abb. 2: Wundauflage aus Kieselgelfasern (Silica Gel Fiber Wound Dressing), Quelle: Fraunhofer Gesellschaft: Zukunft braucht Forschung, Forschungspreise, 2008

Die Firma Bayer stellt diese Vliese mit pharmakologischen Methoden steril her. Makroskopisch bestehen die 4 x 4 cm großen Vliese aus geradlinigen ca. 40 µm dicken Fasern des Kieselgelmaterials, die in mehreren Schichten übereinander 2 mm stark versponnen sind. Das Material ist farblos, spröde und zerbrechlich.

Laut Angaben des Herstellers können Polyhydroxykieselsäureethylesterfasern die Wundheilung verbessern. Sie sollen über eine ausreichend langsame biologische Resorptionsfähigkeit verfügen, die auch auf ihrer geringen physikalischen Wasserlöslichkeit basiert. Laut Hersteller besitzen sie eine Barrierefunktion für die Wunde, fördern die Neubildung der Haut und werden biologisch gut verträglich abgebaut. Es werden Eigenschaften erwähnt, die die Wundheilung in der Granulationsphase positiv unterstützen können: Es seien gutes Adhärenzverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten ebenso zu erwarten wie eine durch die dreidimensionale Struktur des Vlieses begünstigte Neubildung von Gefäße.

Es wurden klinische Tests in zwölf dermatologischen Kliniken und zwei gefäßchirurgischen Kliniken innerhalb Deutschlands durchgeführt (http://www.bayer.com.au/scripts/pages/en/bayer news/local news/readnews.p hp?id=90b65b5673ef41397ae75548f29aa910, 01.10.2013). Die Ergebnisse der abgeschlossenen Untersuchungen, die sich auf die Behandlung chronischer venöser Unterschenkelgeschwüre konzentrierten, liegen nicht vor (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00998673?term=NCT00998673&rank=1 Zugriff vom 16.10.2014).

In-vitro-Untersuchungen von Fasern aus Polyhydroxykieselsäureethylester an Zellkulturen beschreiben molekulare Vorgänge, denen entzündungshemmende Eigenschaften zugesprochen werden können und die einer Reduktion hypertropher Narben- und Keloidbildung dienlich sein können. Hierzu gehören im Wesentlichen die Inhibition der proinflammatorischen Interleukine IL-1β, IL-6 und IL-8 in der Fibroblastenkultur. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erhöhung der VGF-Expression bei mit Kieselgel indirekt inkubierten humanen Endothelzellen beobachtet. Andererseits wurden in derselben Studie neben den potenziell günstigen Eigenschaften auch Beobachtungen gemacht, die auf zellulärer Ebene eine reduzierte Entwicklung der Fibroblasten und der Keratinozyten beschreiben (Grotheer, 2012).

1.6 Wachstumsfaktoren TGF-β

Wachstumsfaktoren sind Botenstoffe, die ihre Wirkung in Zellen entfalten und diese zur Teilung und zur Proliferation anregen können. Bei der Wundheilung spielen verschiedene Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für die Koordination der Gewebeneubildung. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehört auch der *Transforming Growth Factor Beta*, TGF-β. Dieser in drei Isoformen vorliegende Wachstumsfaktor ist evolutionär sehr konstant und z.B. bei Insekten ebenso wie beim Menschen aktiv. Er spielt zunächst eine entscheidende Rolle bei der Embryogenese. Er beeinflusst die Apoptose, die Migration von Zellen sowie ihre Adhäsion und Differenzierung.

Die Expression von TGF-β im Gewebe ist aber auch bei gestörter Narbenbildung, bei Keloiden und bei fibrotischen Erkrankungen wie Sklerodermie erhöht.

Für TGF-β 1 und TGF-β 2 werden darüber hinaus die konkrete Beteiligung an der Narbenbildung im Herzmuskel nach einem Infarkt, aber auch hemmende Wirkungen auf T-Helferzellen (TH-1 Zellen), also antiinflammatorische Effekte beschrieben (Abed, 2009). TGF-β 1 kann Monozyten und Makrophagen stimulieren, proangiogenetische Effekte verursachende Zytokine zu sezernieren (Ren, 2005). Aus diesen Eigenschaften kann eine Beteiligung von TGF-β an der Wundheilung abgeleitet werden; konkreter Einfluss kommt den Makrophagen und Keratinozyten zu, die bei der Wundheilung TGF-β 1 sezernieren und damit die Fibroblastenproliferation im umgebenden Gewebe stimulieren (Singer et al., 1999).

Die Fibroblasten haben erheblichen Anteil an der Kollagensynthese, die über molekulare Signalwege gesteuert wird. Die in den extrazellulären Raum abgegebenen TGF-β wirken auf die spezifischen Rezeptoren in den Zellmembranen und aktivieren darüber intrazellulär SMADs, die ihrerseits im Zellkern Genexpressionen und Proteinsynthese aktivieren (Schmierer et al., 2007).

Bei der Wundheilung wird TGF- β zunächst durch das durch Thrombozyten sezernierte Zytokin Thrombospondin aktiviert. Danach setzen die aktivierten TGF- β weitere Signalkaskaden im Zellkern in Gang, die bei Leukozyten die Koordination der Abwehr und bei den Fibroblasten die Steuerung der Kollagensynthese beeinflussen. In gesunder Haut liegen die Rezeptoren für TGF- β vermehrt in der Epidermis, in den produzierenden Zellen der Anhangsgebilde und in vaskulären Strukturen. Bei Fibroblasten finden sich die Rezeptoren dagegen seltener. Im Rahmen der Wundheilung nimmt auf den Fibroblasten aber die Rezeptorendichte für TGF- β zu. Es wird davon ausgegangen, dass eine erhöhte Expression dieser Wachstumsfaktoren mit erhöhter Aktivität von Fibroblasten einhergeht (Altmeyer et al., 2010).

1.7 Modellorganismus Schwein

Die Haut der Säugetiere inklusive des Menschen ist in der Grundstruktur vergleichbar. Unterschiede bestehen in der Stärke der einzelnen Schichten, dem Vorkommen von Drüsen, der Intensität der Behaarung und dem Vorkommen von intrakutaner Muskulatur. In der Literatur werden verschiedene In-Vivo-Wundheilungsmodelle an Säugetieren beschrieben. Nagetiere, wie z.B. Ratten und Mäuse, sind leicht und kostengünstig zu halten, was die Verwendung einer höheren Anzahl an Versuchstieren pro Studie erleichtert (Bell et al., 1983; Greenhalgh, 2005). Es bestehen iedoch Besonderheiten in der Pathophysiologie der Wundheilung bei Nagern. Bei diesen Tieren kommt auf einem Großteil der Körperfläche der Panniculus carnosus hinzu, eine intrakutane Muskelschicht, die die Wundkontraktion unterstützt (Meyer et al., 1978). Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zum Großteil der menschlichen Haut dar, wo eine vergleichbare Struktur nur vereinzelt und rudimentär im Skrotum oder als Platysma am Hals vorkommt.

Mit dem Schwein dagegen steht für die Simulation typischer menschlicher Hautdefekte ein besser geeignetes Modell zur Verfügung. Wunden kontrahieren sich bei der Heilung sowohl beim Schwein als auch beim Menschen hauptsächlich durch neu gebildetes Granulationsgewebe. Die Wundkontraktion durch Muskelzellen spielt dagegen keine wesentliche Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Untersuchungsergebnisse am Schweinemodell auch beim Menschen zu 78% eintreten, während bei Nagern nur 53% Übereinstimmungen erzielt werden. Das Schwein, bei dem auf den Rücken mehrere Wunden nebeneinander vergleichend untersucht werden können, wird als ein exzellentes Wundheilungsmodell beschrieben (Sullivan et al., 2001).

Ein erweitertes Modell ist das mit Streptocotocin behandelte Versuchstier, bei dem die insulinproduzierenden Zellen des Pankreas medikamentös deaktiviert werden. Hierbei wird das Tier in einen Zustand versetzt, der einem Diabetes mellitus entspricht (Marshall, 1979). Dieser Ansatz kann helfen, die Erforschung von Wunden im hyperglycämischen Milieu zu verbessern. Ein Modell zur Untersuchung von Heilungsvorgängen mit den typischen Aspekten der defizitären Wundheilung beim Menschen mit Durchblutungsstörungen aber steht bisher nicht zur Verfügung.

1.8 Aufbau und Ziel dieser Arbeit

Die Behandlung von Wunden ist ein zentraler Bestandteil der Medizin. Bei Erfahrungen aus Jahrtausenden besteht noch immer Potenzial, die Behandlungsmethoden zu verbessern und zu erweitern.

Der Einsatz anorganischer Wundauflagen aus Kieselgel könnte laut

Angaben des Herstellers eine Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten über die bisher etablierten Methoden hinaus zur Wundbehandlung darstellen. Das Ziel dieser Arbeit ist daher die systematische Untersuchung der Wirksamkeit der Kieselgelfasern als Wundauflage *in vivo* am Tiermodell Minischwein zur Therapie von Vollhautwunden unter Berücksichtigung der vom Hersteller postulierten Vorteile in der Wundheilung. Dabei sollen die lokalen Prozesse der Heilung klinisch, makroskopisch, mikroskopisch, molekularbiologisch und physikalisch betrachtet werden. Die Veränderung von Wundheilung und Narbenbildung sollten ebenso beurteilt werden wie der biologische Abbau der Kieselgelfasern. Im Vergleich zu organischen Wundauflagen aus Kollagen einerseits und zu einer Kontrollgruppe andererseits sollen eventuelle Vorteile und Nachteile bei der Wundheilung dargestellt und die vom Hersteller angesagten positiven Effekte geprüft werden.

Insgesamt soll so ein Material in seiner Wirkungsweise untersucht und dargestellt werden, das im klinischen Alltag das therapeutische Spektrum erweitern könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Materialien und deren Hersteller

Versuchstiere:		
Göttinger Minischwein	Ellegaard A/S, Dalmose, Dänemark	
Medikamente:		
Atropin, Fentanyl, Ketamin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland	
Pflaster: Fentanyl 12,5 µg/h und		
25 μg/h		
Midazolam	Rotexmedica, Trittau, Deutschland	
Betaisodona [®] Salbe	Mundipharma, Limburg a.d. Lahn,	
	Deutschland	
Propofol, Isofluran, Temgesic [®]	Essex Pharma, München,	
	Deutschland	
Octenisept [®] ,	S&M, Norderstedt, Deutschland	
Jodlösung 10% Povidone Prep	Dynarex, Orangeburg, NY, USA	
Solution [®]		
7.5% Povidone Iodine Scrub [®]		
NaCl 0,9% Infusionslösung,	Braun, Melsungen, Deutschland	
Softasept [®]		
Isopropanol, Trichloroethane	Sigma-Aldrich, Hamburg	
	Deutschland	
T61	Intervet, Unterschleißheim,	
	Deutschland	
Verbandmaterial		
Polyhydroxykieselsäureethylester:	Bayer Innovation, Düsseldorf,	
Silica Gel Fibre Wund Dressing	Deutschland	
Matriderm®	Dr. Suwelak Skin and Health Care,	
	Billerbeck, Deutschland	
Urgotül [®]	Urgo, Sulzbach, Deutschland	

Verbandmaterial Fortsetzung (Tab. 1)		
Peha-Haft [®]	Hartmann, Heidenheim, Deutschland	
Fixomull [®] , Leukoplast [®]	BSN Medica, Hamburg, Deutschland	
Jelonet [®]	Smith & Nephew, Schenefeld,	
	Deutschland	
Rolta-Soft [®]	Hartmann, Heidenheim, Deutschland	
Chemikalien und Medien		
PBS Pufferlösung	PAA Laboratories, Linz, Österreich	
Ethanol, Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Formalin Formafix 5% gepuffert	PathoMed, Viersen, Deutschland	
Xylol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Zitratpuffer, Hämatoxylin, Eosin, 4',6-	Sigma-Aldrich, Hamburg,	
diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Deutschland	
Steriles H ₂ O	Baxter, Unterschleißheim,	
	Deutschland	
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland	
Bestimmungskits und Antikörper		
SuperScript First Strand Synthesis	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
System for RealTime PCR		
RNeasyKit, RNase free DNAse Set,	Quiagen, Hilden, Deutschland	
Antikörper MAC 387	Acris Antibodies, San Diego, CA,	
	USA	
Antikörper Anti-CD 68	Transgenic, Kobe, Japan	
Millipore Wasser	Merck Millipore	
Ultra Pure Water System	Billerica, MA, USA	
Antikörper Pferd-Ziege, Pferd-Maus,	Vector Laboratories, Burlingame,	
Pferdeserum, Vectastain [®] -Kit	CA, USA	
Antikörper Anti-Cathepsin K	Santa Cruz Biotechnologies, Santa	
	Cruz, CA, USA	
Alexa Fluor 488	Life Technologies GmbH, Darmstadt,	
	Deutschland	

Bestimmungskits und Antikörper Fortsetzung (Tab. 1)		
Hämatoxylin, Eisessig, DAPI	Sigma-Aldrich, Hamburg,	
	Deutschland	
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Sonstige Materialien		
Futtermittel für Minipigs	Ssniff, Soest, Deutschland	
Tätowierfarbe Sailor Jerry	Deep Colours!, Neuburg,	
turbo schwarz	Deutschland	
Biopsie-Stempel 6 mm	Stiefel, Offenbach a.M., Germany	
Skalpelle No. 11, 23 Op-cutlery Punch	Aesculap, Melsungen, Deutschland	
(steril)		
Fertiginsulinspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland	
Objektträger Superfrost,	Gerhard Menzel, Braunschweig,	
Deckgläschen	Deutschland	
Permanentmarker	Pelikan, Hannover, Deutschland	
Software Microsoft Office Excel 2007,	Microsoft Deutschland,	
-Word 2007	Unterschleißheim, Deutschland	
Software Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, München,	
	Deutschland	
Schnauzenmaske / Kleintiermaske	Heiland, Hamburg, Deutschland	
Geräte		
-80°C Gefrierschrank	Electrolux, Medical Refrigeration	
	Nürnberg, Deutschland	
Autoklav VARIOKLAV	Zyclondampf, H&P Labortechnik,	
	Oberschleißheim, Deutschland	
Arbeitsbank, Variolab Mobilien W90	Waldner, Wangen, Deutschland	
Sterilbank "Hera safe" Sterile	Heraeus Instruments, Hanau,	
Arbeitsbank laminar flow; für Zellkultur	Deutschland	
und Virusanzucht		
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Si), Bohemia,	
	NY, USA	

Geräte Fortsetzung (Tab. 1)		
Pipettierhilfe Eppendorf Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	
Leica LMD 6500 Microdissection	Leica Biosystems, Nussloch,	
System	Deutschland	
Mikroskop, Mikroskopkamera, Soft-	Axioskop Zeiss, Jena, Deutschland	
ware		
Federkraftmesser Pesola 100N	PCE Deutschland, Meschede,	
	Deutschlang	
Polytron	Kinematica, Luzern, Schweiz	
PT 3100/PT6100		
Wasserbad Typ 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik,	
	Burgwedel, Deutschland	
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode,	
	Deutschland	
Präzisionswaage AJ 150	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland	
Ultrazentrifuge Suprafuge 22	Kendro, Langenselbold, Deutschland	
PCR-Gerät Light Cycler	Roche, Mannheim, Deutschland	
Stericlin Folie zur Hitzesterilisation	Vereinigte Papierwarenfabriken,	
	Feuchtwangen, Deutschland	
Chirurgischer Marker mit Linealkappe	Tyco Healthcare, Jersey City, NJ,	
	USA	
Schermaschine Aesculap Favorita II	Aesculap, Melsungen, Deutschland	
Hochfrequenzchirurgiegerät Cauter	Draeger, Lübeck, Deutschland	
Laptop TravelMate 800	Acer Computer, Ahrensburg,	
	Deutschland	
Laptop Lenovo Thinkpad T60	Lenovo Deutschland, Stuttgart,	
	Deutschland	

2.2 Tierversuch

Drei gesunde, 20 bis 30 kg schwere, hellhäutige weibliche Göttinger Minischweine (Ellegaard A/S, Dalmose, Dänemark) im Alter zwischen 10 und 12 Monaten wurden zur Akklimatisierung für mindestens eine Woche bei 22°C, 65% relativer Luftfeuchtigkeit und einem tageszeitlichen Rhythmus von je 12 Stunden Licht und Dunkelheit gehalten, da dies im Wesentlichen stressreduzierten natürlichen Umweltbedingungen entspricht. Den Tieren wurde eine standardisierte Kost (Futter für Minipigs, Ssniff Soest, Deutschland) mit Trinkwasser nach Belieben zur Verfügung gestellt.

Nach der Akklimatisierungszeit wurden bei jedem der Versuchstiere unter Allgemeinnarkose zwölf Vollhautwunden unter sterilen Kautelen chirurgisch präpariert und anschließend therapiert (Abb. 3).



Abb. 3: Schema der Wundverteilung

Die zwölf an jedem Versuchstier präparierten Vollhautwunden wurden in jeweils drei Gruppen unterteilt. Pro Schwein wurden nach zufälliger Anordnung je vier Wunden (n=4) mit den gleichen Methoden behandelt.

Die Wunden wurden an den postoperativen Tagen 7, 14, 28 und 42 makroskopisch vermessen und hinsichtlich verschiedener Heilungskriterien beurteilt. Ferner wurden Biopsien zur weiteren Analyse gewonnen.

Das Land Nordrhein-Westfalen genehmigte den Tierversuch mit der Referenznummer 9.93.2.10.32.07.025.

2.3 Präparation der Untersuchungsareale

Die Operationen wurde eingeleitet mit der Sedierung der Schweine mit Midazolam (Rotexmedica, Trittau, Deutschland) 0,5 mg/kgKG und Ketamin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 10 mg/kgKG i.m. gefolgt von der Anlage eines intravenösen Ohrvene peripheren Katheterzugangs über eine und kontinuierliche Infusion von 0,9% NaCI-Lösung (Braun. Melsungen, Deutschland). Die Erhaltungsanästhesie wurde mit Isofluran (Essex Pharma, München, Deutschland), 1-3 Vol.% unter kontinuierlicher Überwachung von Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung fortgesetzt. Zusätzlich wurden bei Bedarf Atropin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 0,5 mg und Fentanyl (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 0.05 mg in Einzeldosen sowie Propofol (Essex Pharma, München, Deutschland) 2 mg/kgKG i.v. gegeben. Das Narkosegas wurde mit einem 30% igen Sauerstoff-Luftgemisch per Schnauzenmaske (Kleintiermaske, Heiland, Hamburg, Deutschland) verabreicht.

Die Borsten am Rücken des Tieres wurden mit einem Langhaarschneider (Aesculap, Melsungen, Deutschland) gekürzt und mit Enthaarungsmitteln (Veet, Mannheim, Deutschland) entfernt. Vor der Exzision wurde jede der zwölf zu Wunden mit einer 3 x 3 cm präparierenden quadratischen aroßen Papierschablone und einem chirurgischen Filzmarker (Tyco Healthcare, Jersey City, NJ, USA) als innere Linie angezeichnet. Eine weitere äußere Markierung um jede dieser Flächen wurde zusätzlich mit einem Abstand von 1 cm zum vorgesehenen Wundrand gezeichnet. Die inneren und äußeren Linien wurden zur permanenten Markierung und zur späteren Darstellung der Wundkontraktion tätowiert. Zwischen den Flächen wurde ein Abstand von mindestens 4,5 cm intakter Haut belassen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Paravertebral wurde zwischen den Wunden und der dorsalen Medianlinie beidseits ein 6 cm breiter Abstand eingehalten.

Die Rücken der Tiere wurden mit Jodlösung (7.5% Povidone lodine Scrub[®], Dynarex, Orangeburg, NY, USA) abgewaschen und anschließend mit einer weiteren Jodlösung (10% Povidone Prep Solution[®], Dynarex, Orangeburg, NY, USA) für 20 min desinfiziert.

25

Anschließend wurde das Areal steril abgedeckt, und es erfolgte ein erneutes Abwaschen mit Alkohol (70% Isopropanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) unter sterilen OP-Bedingungen.

Mit Pinzette und Skalpell (Aesculap, Melsungen, Deutschland) wurden die inneren, mittels Tätowierung markierten Hautflächen von 3 x 3 cm unter Einbeziehung des subkutanen Fettgewebes in die Tiefe bis zur Faszie exzidiert. Hämostase der Wunde wurde mit sterilen Kompressen und bei stärkeren Blutungen mit Elektrokauterisation erreicht (Abb. 4).



Abb. 4: a) Anzeichnen der Wundflächen c) fertig präparierte Wunde b) Tätowierung

d) Einsetzen der Wundauflage

Alle Wunden wurden fotografisch dokumentiert.

2.4 Wundversorgung

Zur Verteilung der einzelnen Behandlungsmethoden wurden pro Tier insgesamt zwölf Wunden präpariert, die in drei Gruppen mit je vier Wunden eingeteilt wurden. Die konkrete Verteilung wurde zuvor nach dem Zufallsprinzip bestimmt und am Tag der Wundpräparation wie folgt umgesetzt:

Die Wundversorgung wurde bei jedem der drei Tiere vergleichend mit dem Kieselgelmaterial, mit einer weiteren Wundversorgung und einer Negativkontrolle durchgeführt. Die resorbierbaren Wundauflagen wurden kurz vor der Applikation in steriler 0,9%iger NaCI-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) angefeuchtet und somit weicher und lokal verträglicher gemacht. Die Negativkontrollen fanden als Wundversorgung ohne direkten Kontakt mit resorbierbaren Materialien statt.

Beim ersten Versuchstier wurde die Wundheilung bei jeweils vier Wunden (n=4) erstens unter Therapie mit einer einfachen Lage des Kieselgelmaterials (Silica Gel Fibre Wound Dressing[®], Bayer Innovation, Düsseldorf, Deutschland) zweitens unter der Therapie mit einer 2 mm starken Lage Kollagenmatrix (Matriderm[®] Dr. Suwelak Skin and Health Care, Billerbeck, Deutschland) und drittens bei der Kontrollgruppe mit Jelonet[®] Fettgaze (Smith & Nephew, Schenefeld, Deutschland) verglichen.

Beim zweiten Versuchstier wurde die Wundheilung von jeweils vier Wunden (n=4) verglichen mit vier Lagen der Wundauflagen aus Kieselgel, vier Lagen Matriderm[®] und der Kontrollgruppe ohne direkte Wundauflage. Die hier herbeigeführte lokale Überdosierung wurde als Defektauffüllung aber auch als Provokationstest bewusst gewählt. So sollten etwaige Nebenwirkungen besser zur Darstellung kommen und im Vergleich mit den anderen Methoden klarer bewertet werden können.

Beim dritten Versuchstier wurde die Wundheilung unter Therapie mit einer einfachen Lage Wundauflagen aus Kieselgels (n=4), unter einer Lage der Wundauflagen aus Kieselgel plus Tränkung des Wundgrundes mit gesättigter wässriger Kieselgellösung (n=4) und der Kontrollgruppe (n=4) verglichen. Auch hier wurde die zusätzliche Applikation der Lösung als Überdosierung gewählt, um dadurch provozierte Effekte besser herauszustellen.

Zur Herstellung der gesättigten Kieselgellösung wurden zuvor 10 g Fasern steril in 1 I 0,9% NaCl gelöst, bei Zimmertemperatur 24 h lang geschwenkt und anschließend steril filtriert. Diese wässrige Lösung wurde in der letzten Gruppe zusätzlich zur Kieselgelwundauflage bei allen Verbandwechseln mit sterilen Spritzen (Braun, Melsungen Deutschland) auf die vier Wunden aufgebracht.

Alle Wunden wurden über der primären Wundauflage unter sterilen Kautelen mit Kompressen, Tegaderm[®], Fixomull[®], Rolta-Soft[®] und Peha-Haft[®] verbunden

und mit Leukoplast[®] fixiert.

2.5 Postoperatives Prozedere

Nach der Narkose wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit kantenlosen Wänden zur Minimierung einer zusätzlichen Verletzungsgefahr oder Beschädigung der Verbände gehalten. Zur Analgesie wurden Fentanyl-Pflaster 12,5 µg/h bzw. 25 µg/h (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) hinter einem Ohr appliziert. Die Tiere wurden weiter wie zuvor unter standardisierten Bedingungen gehalten und versorgt.

2.6 Planimetrie

Für die Flächenmessung wurde ein sichtbares Protokoll der Abmessungen der Wunde erstellt, indem an den Tagen 7, 21, 28, 35 und 42 die Wunde mit einer sterilen Klarsichtfolie (Stericlin, Vereinigte Papierwarenfabriken, Feuchtwangen, Deutschland) bedeckt wurde und sowohl der Wundrand als auch der tätowierte äußere Rand 1:1 mit Permanentmarker aufgezeichnet wurden.

Nach digitalem Ablichten der Folie wurde die Fläche anhand der Anzahl der Pixel ermittelt (mittels Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems, München, Deutschland). Die prozentuale Veränderung der Wundflächen wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2007 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) anhand der Formel (aktuelle Fläche / Fläche an Tag 0) x 100 berechnet und im zeitlichen Verlauf graphisch dargestellt.

2.7 Verbandwechsel

An den postoperativen Tagen 3, 7, 10, 14, 28, 35 und 42 wurden Verbandwechsel durchgeführt. Die hierfür erforderliche Anästhesie wurde stets wie oben beschrieben durchgeführt. Die Wunden wurden verbandfrei in Augenschein genommen und fotografiert. Für die Planimetrie wurden die Wunden bei jedem Verbandwechsel wie oben beschrieben abgezeichnet und vermessen. Die primären Wundauflagen wurden in der Wunde belassen, in der entsprechenden Gruppe wurde bei jedem Verbandwechsel die gesättigte Kieselgellösung auf die Wunde appliziert.

2.8 Biopsiegewinnung

An den Tagen 7, 14 und 28 wurden mit Biopsie-Stempeln (Stiefel, Offenbach a.M., Deutschland) Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm aus jeder Wunde gewonnen. Diese Eingriffe fanden in oben beschriebener allgemeiner Anästhesie während des Verbandwechsels statt. Die biopsierten Wunden und Narben wurden vor der Biopsieentnahme, wie oben beschrieben, fotografiert, abgezeichnet und danach verbunden (Abb. 5).

Alle gewonnenen Biopsien wurden vorbereitend zur histologischen Untersuchung in 5% gepufferter Formaldehydlösung (PathoMed, Viersen, Deutschland) fixiert.

Beim letzten Versuchstier, bei dem zusätzlich Kieselgel als gesättigte Lösung verwendet wurde, wurden zusätzlich aus den dorsal liegenden Anteilen der Wunden Biopsien als Kryokonservate in flüssigem Stickstoff gewonnen und anschließend bei -80°C gelagert (Gefrierschrank -80°C, Electrolux, Medical Refrigeration, Nürnberg, Deutschland).



Abb. 5: Schema der Wundpräparation. Gezeigt werden die Präparation, die Tätowierungen und die Biopsien an den Tagen 7, 14 und 28 sowie eine 4mm breite Biopsie an Tag 42.

Am 42. Tag nach Präparation der Wunden wurden nach der Abzeichnung und Fotodokumentation aus jeder Wunde im mittleren Teil oberhalb der Stanzbiopsien je ein 4 mm breiter und 60 mm langer Streifen unter Einbeziehung der unverletzten Seitenteile und der Subcutis exzidiert (Skalpell Aesculap, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurden die narkotisierten Tiere durch intravenöse Gabe von 5 ml T61 (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) eingeschläfert.

2.9 Messung der Narbenstabilität

Die an Tag 42 exzidierten 4 x 60 mm langen Streifen der Narbe wurden sofort nach der Exzision zwischen einer chirurgischen Klemme und einer Federwaage (Präzisionswaage AJ 150, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) aufgespannt. Durch manuellen Zug an der Klemme wurde zunehmend Kraft aufgewendet, bis das Präparat riss. Die Kraft [N] wurde am feststehenden Ring abgelesen, dokumentiert und später mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) vergleichend berechnet und graphisch dargestellt.

2.10 Histologische Beurteilung

Alle Biopsien, d.h. sowohl die Stanzbiopsien der Tage 7, 14 und 28 als auch die Querschnittsbiopsien von Tag 42. wurden 5% in gepufferter Formaldehydlösung (PathoMed, Viersen, Deutschland) fixiert und histologisch aufgearbeitet. Dazu wurden die Proben mit Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) in aufsteigenden Konzentrationen von 30%, 70%, 90%, 100% entwässert. Mit Xylol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wurde schließlich der Alkohol entzogen, die Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet und zur Aushärtung 12 h bei Raumtemperatur gelagert. Mittels Mikrotom der Abteilung für Pathologie im Klinikum Bergmannsheil Bochum wurden von jeder Biopsie Schnittpräparate mit einer Dicke von je 2 µm angefertigt und mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Die gefärbten Schnitte wurden bezüglich Bindegewebsproliferation, Vaskularisierung, Reepithelialisierung, Fremdkörperabbau und Entzündungsreaktionen in mikroskopischer Betrachtung verglichen und bewertet. Zur Dokumentation und für eine Gesamtansicht wurden die histologischen Schnitte mikroskopisch digital fotografiert und zu Übersichtsbildern montiert (Axioskop Zeiss, Jena, Deutschland; Leica LMD

6500 Microdissection System, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland; Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems, München, Deutschland).

2.11 Expressionsbestimmung für TGF-β 1 und TGF-β 2

Als Marker für Bindegewebsproliferation und indirekten Hinweis auf die Kollagensynthese in der Narbe wurde exemplarisch die Genexpression der Wachstumsfaktoren TGF-β 1 und TGF-β 2 bestimmt. Dazu wurden diejenigen Biopsien verwendet, die an Tag 14 dem Versuchstier entnommen wurden, an dem die Behandlung mit einer einfachen Lage Kieselgel, mit einer einfachen Lage Kieselgel plus gesättigter Lösung sowie als Negativkontrolle ohne Wundauflage durchgeführt wurde. Dazu wurden die bei -80°C kryokonservierten Stanzbiopsien verwendet. Die RNA der Hautzellen wurde dafür aus allen Schichten der Biopsie isoliert, in cDNA transkribiert und die entsprechenden Gene mittels PCR dargestellt und quantifiziert.

2.11.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zunächst wurden die bei -80°C gefrorenen Stanzbiopsien aufgetaut und längs in 10 mg bis maximal 30 mg schwere Streifen geschnitten, in denen sowohl die Epidermis als auch die Dermis und Teile der Subkutis enthalten waren. Das genaue Gewicht wurde gemessen (Präzisionswaage AJ 150, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) und zur späteren Berechnung dokumentiert. Zur RNA-Isolierung wurden Fertigkits mit den nötigen speziell bezeichneten Reagenzen verwendet und gemäß Anleitung angewendet (RNeasyKit und RNase free DNAse Set, Quiagen, Hilden, Deutschland). Die in Längsstreifen geschnittenen und gewogenen Hautpräparate wurden mit 600 µl RLT-Puffer und 290 µl MQ-Wasser mit dem Polytron (PT 3100/PT6100 Kinematica, Luzern, Schweiz) homogenisiert und mit 10 µl Qiagen Proteinase K-Lösung im 55°C warmen Wasserbad (Typ 1092 GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Megafuge 1.0R Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) und der Uberstand in ein neues Reagenzglas überführt. Zu dem RNA-haltigen Überstand wurden 450 µl 100% iges Ethanol gegeben. Diese Mischung wurde auf eine RNeasy-Minisäule pipettiert und 15 sec bei 8.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer wurde erneut zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen.

Die zu isolierende RNA verblieb gebunden an der Matrix der Tube der RNeasy-Minisäule. Daraufhin wurde die RNA 15 min bei Raumtemperatur unter 10 µl DNase mit 70 µl RW-Puffer inkubiert. Die somit von DNA befreite RNA wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, bei 8.000 x g zentrifugiert und daraufhin zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Bei diesen Prozeduren verblieben die Nukleotide weiterhin gebunden an die Matrix der RNase-Minisäule, und die Reinheit der RNA wurde maximiert. Im folgenden Schritt wurde die Säule 2 min lang zentrifugiert und daraufhin die RNA mittels 30 µl RNase-freien Wassers durch Zentrifugation in ein RNase-freies Reagenzglas eluiert.

1 μl dieser RNA-Lösung wurden mit 49 μl DEPC-Wasser in einer Mikroküvette photometrisch (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) untersucht und so die Konzentration der RNA bestimmt. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C bis zur c DNA-Synthese gelagert.

Die cDNA-Synthese zur späteren Quantifizierung der Wachstumsfaktoren wurde mit Reagenzien eines Fertigkits (SuperScript First Strand Synthesis System for RealTime PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt; 1 μ g der zuvor eingefrorenen RNA-Lösung wurde mit 1 μ l 10 mM dNTP-Mix, 1 μ l Random Hexamers (50 ng/ μ l) auf 10 μ l DEPC-Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde 5 min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gelegt. 2 μ l 10 x RT-Puffer, 4 μ l 25mM Magnesiumchlorid, 2 μ l 0,1 M DTT und 1 μ l rekombinanter RNAse-Inhibitor ("RNase OUT") wurden für jede Probe angesetzt und mit der RNA-Mischung 2 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

Danach wurde jeder Probe 1 µl SuperScript II, entsprechend 50 U reverse Transcriptase hinzugefügt, das Ganze bei 42°C für 50 min inkubiert und dabei in cDNA transkribiert. Die Reaktion wurde mittels finaler Erwärmung auf 70°C für 15 min gestoppt

2.11.2 Expressionsanalyse

Die hergestellte cDNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im LightCycler (Roche, Mannheim, Deutschland) zur relativen Quantifizierung der Expression der Proteine TGF- β 1 und TGF- β 2 untersucht. Vorbereitend für die Expressionsanalyse von TGF- β 1 wurden aus einem Reagenzienset (SuperScript First Strand Synthesis System for RealTime PCR, Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) 7,4 μ l DEPC-H₂O, 0,2 μ l forward Primer (20mM), 0,2 μ l reverse Primer (20mM), 0,2 μ l Sonde11, 10 μ l 2 x Probes Master und 2 μ l der zuvor transkribierten cDNA pro Ansatz verwendet. Für die Analyse von TGF- β 2 wurde das Gleiche mit der Sonde 38 als spezifischer Primer durchgeführt. Zur Bestimmung der Genexpression wurden schließlich die Konzentrationen der beiden Gene in Relation zur Konzentration des nicht regulierten Housekeeping Gene, Gen 18S rRNA mit der Sonde 48, gesetzt. Das Gesamtvolumen jeder einzelnen Probe betrug 20 μ l, sämtliche Messungen wurden dreifach durchgeführt.

Nach dem Start des PCR-Geräts für 10 min bei 95°C führte das Programm insgesamt 40 Zyklen durch. 94°C für 15 sec (Denaturierung), 60°C für 10 sec (Annealing=Primeranlagerung) 72°C für 10 sec (Extension). Die Bedingungen waren sowohl für die zu untersuchenden Gene als auch für das Housekeeping Gen identisch. Sämtliche gemessene mRNA-Konzentrationen wurden auf die 18s rRNA-Expression normalisiert.

2.12 Immunhistochemische Darstellung

Zur Darstellung der Entzündungsaktivität wurden verschiedene Methoden angewendet, um Makrophagen und weitere Zellen der monozytären Reihe anzufärben und so etwaige Veränderungen der Entzündungsaktivität bei den verschiedenen Behandlungsmethoden darzustellen.

2.12.1 Markierung mit MAC 387, Anti-CD 68 und Anti-Cathepsin K

Zur Markierung der Immunzellen erfolgte zunächst die Vorbereitung der histologischen Präparate.

Die ungefärbten in Paraffin fixierten Schnittpräparate wurden nach einer einstündigen Hitzefixierung bei 70°C auf dem Objektträger (Superfrost Ultra Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) mit Ethanol in absteigenden Konzentrationen, 100%, 90%, 70%, 30%, entparaffiniert. Mit Xylol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wurde schließlich der Alkohol entzogen. Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen demaskiert, indem die Objektträger in 1%iger Citratlösung (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) ca. 10 min in der Mikrowelle (Scharp, Hamburg, Deutschland) erhitzt wurden. Der Erhitzungsvorgang wurde beobachtet und ein Aufkochen verhindert, da starke Blasenbildung die Präparate von den Objektträgern hätte ablösen können. Nach 45 minütiger Abkühlphase bei 4°C wurden die Präparate 30 min mit Blockierlösung behandelt. Diese Blockierlösung wurde angesetzt mit PBST und 1,5% Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), da die sekundären Antikörper (s.u.) vom Pferd stammten und unspezifische Bindungsstellen im Präparat somit blockiert wurden. Nach der Inkubationsphase wurden die Präparate zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Nach der Blockierung folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Es wurden drei verschiedene Antikörper verwendet, die stets nach demselben Vorgehen angewendet wurden. Zusammen mit dem Antikörper MAC 387 wurden Anti-CD 68 und Anti-Cathepsin K verwendet:

Anti-CD 68 (Transgenic, Kobe, Japan) in den Konzentrationen 1:50 und 1:200, MAC 387 (Acris Antibodies, Inc., San Diego, CA, USA) in den Konzentrationen 1:200 und 1:1000, beide hergestellt in Mäusen, und Anti-Cathepsin K, (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) in den Konzentrationen 1:100 und 1:50, hergestellt in Ziegen. Die entsprechenden Antigene werden an Makrophagen, Monozyten und anderen Zellen des Immunsystems exprimiert. Die bezogenen Antikörper eignen sich gemäß Herstellerangaben zur Darstellung porciner Monozyten. Nach der 30-minütigen Inkubationsphase wurden die ungebundenen Antikörper mit zwei Waschungen für jeweils 5 min mit PBS entfernt.

2.12.2 Inkubation mit Sekundärantikörpern

Die mit den primären Antikörpern markierten Strukturen im Präparat wurden im Folgenden mit dem sekundären Antikörper behandelt, diese waren bei den mit Anti-CD 68 und MAC 387 behandelten Präparaten Antikörper aus Pferdeserum gegen molekulare Strukturen der Maus (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), bei den mit Anti-Cathepsin K behandelten Präparaten Antikörper aus Pferdeserum gegen Strukturen der Ziege (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Diese Sekundärantikörper sind biotinyliert. Durch die Bindung an Biotin wird die spätere Anfärbung mittels Avidin oder Streptavidin ermöglicht. Die Präparate wurden mit den Antikörpern Anti-Maus IgG bzw. Anti-Ziege IgG 30 min in der Verdünnung 1:100 in 1,5% Pferdeserum (15 µl Serum auf 1000 µl PBST) inkubiert und anschließend erneut 2 x 5 min in
PBS gewaschen.

2.12.3 Anfärben der markierten Strukturen

Um die sekundären Antikörper zu markieren und für die mikrosko-pische Untersuchung sichtbar zu machen, wurde entweder DAB als Substrat der Meerrettichperoxidase oder an Streptavidin konjugiertes, grün fluoreszierendes Alexa Fluor 488 verwendet.

2.12.4 Peroxidasefärbung

Für die Peroxidasefärbung wurden die mit Sekundärantikörpern inkubierten Präparate weiter mit dem Peroxidase Reagenz aus dem Vectastain Elite ABC Kit (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) behandelt. Die Peroxidase-Substratlösung setzte sich wie folgt aus dem Inhalt des Elite ABC Kits zusammen: 1 ml Milliporewasser, 20 μ l Pufferlösung, 40 μ l DAB, 20 μ l H₂O₂ und 20 μ l Nickellösung.

Nach der Abkühlung folgte eine 30-minütige Inkubation in 3% H₂O₂ zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Danach folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern Anti-CD 68 in PBST 1:50 und 1:100 sowie ohne Antikörper als Negativkontrolle. Nach 60-minütiger Inkubation und erneuter 5-minütiger PBS-Waschung wurden, wie oben beschrieben, die Sekundärantikörper aus Pferdeserum, biotinylierte Anti-Maus IgG Antikörper, in PBST in einer Konzentration 1:100 angesetzt und die Präparate weitere 30 min inkubiert. Nach 5-minütiger Waschung in PBS wurden die Präparate mit der angesetzten Lösung, in der Avidin an Peroxidase gebunden vorliegt, 30 min inkubiert.

Die Reaktion der sich unter der Substratlösung braun färbenden Präparate wurde alle 2-min per PBS-Waschung unterbrochen und die Färbung unter dem Mikroskop beurteilt, erneut mit dem Substrat inkubiert, bis nach 30-min eine optimale Färbung vorlag. Die Präparate wurden mikroskopisch betrachtet, das Ergebnis wurde dokumentiert und die Präparate wurden bei 4°C in PBS gelagert.

2.12.5 Hämatoxylin-Gegenfärbung

Nach der Darstellung durch Peroxidase begann die Gegenfärbung der Zellkerne mit 5-minütiger Inkubation in filtrierter Hämatoxylinlösung (Sigma Aldrich Chemie, München, Deutschland), anschließender Waschung mit Leitungswas-

35

ser, bis keine Verfärbung des Wassers mehr sichtbar war. Danach wurden die Präparate zehnmal kurz in 2% glacial alcohol (2 ml Eisessig, Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland, sowie 98 ml H₂O, Baxter Unterschleißheim, Deutschland) und anschließend zehnmal kurz in Wasser getaucht. Daraufhin wurde die Fixierung in 1,5 ml Ammoniak und 98,5 ml 70%igem Ethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) abgeschlossen. Die Präparate wurden in aufsteigenden Ethanolreihen und Xylol entwässert und mit einem Tropfen Entellan Mounting Medium (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) eingedeckelt und abgeschlossen.

2.12.6 Fluoreszenzfärbung

Für die floureszierende Alexa-Fluor-488-Färbung wurde Streptavidin, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in PBST auf 5 mg/ml verdünnt, und die mit Sekundärantikörpern inkubierten Präparate wurden 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden zwei Waschungen mit PBS für jeweils 5 min durchgeführt. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit 4´,6-Diamidino-2-phenyindol (DAPI, Sigma Aldrich Chemie, München, Deutschland) 300 ng/ml.

Der Abschluss der Färbung erfolgte mit zwei Waschungen mit PBS für jeweils 5 min. Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe eines Tropfens Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland) und eines Deckgläschens (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) konserviert. Die Schnitte wurden zwischen den Auswertungen kühl bei 4°C und dunkel gelagert.

2.13 Ermittlung von Fremdkörpergranulomen

Zur quantitativen Darstellung der Entzündungsreaktionen wurden die histologischen Schnitte ausgewertet. Pro Präparat wurden in 40-facher Vergrößerung im *Stratum reticulare* 20 Gesichtsfelder gesichtet, in denen gehäuft und kumuliert Cathepsin K-positiv markierte Zellen vorkommen. Die positiven Areale, die die angefärbten monozytären Zellen enthielten, wurden gezählt, die Anzahl dieser Areale in den einzelnen Schnittpräparaten wurden in Relation zu den negativen Abschnitten gesetzt, und die verschiedenen Gruppen wurden verglichen.

2.14 Statistische Verfahren

Die erhobenen Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel $2007^{\text{®}}$ (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) dokumentiert und auf Normalverteilung geprüft. Arithmetische Mittelwerte wurden ebenso berechnet, wie die Standardabweichung (SD = *Standard Deviation*) als Maß für die Streuung von Werten um den gemeinsamen Mittelwert bzw. der Standardfehler (SEM = *Standard Error of the Mean*) als Maß für die Streuung von Mittelwerten. In den Tabellen werden die Werte gerundet auf maximal zwei Dezimalstellen angegeben.

Zur Überprüfung, ob die Stichproben der untersuchten drei Gruppen den gleichen Mittelwert aufweisen, sich also in diesem Merkmal jeweils nicht unterscheiden, wurde ein 2-seitiger, gepaarter T-Test durchgeführt.

Das Ergebnis des angegebenen T-Tests ist jeweils der aus Daten berechnete empirische Signifikanzwert p (p-Wert). Je kleiner der p-Wert ausfällt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese H0 ("es gibt keinen Unterschied" bzw. "es besteht kein Zusammenhang") abgelehnt und die Arbeitshypothese H1 ("es gibt einen Unterschied" bzw. "es besteht ein Zusammenhang") angenommen werden kann. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese H0 fälschlicherweise angenommen wird, wird mit dem Signifikanzniveau α angegeben. Das Signifikanzniveau wurde in dieser Arbeit mit α =0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchsablauf

Die drei Tierversuche wurden nacheinander durchgeführt. Die Tiere waren durchweg von gesunder Grundkonstitution und zeigten während der Heilungsphasen keine Anzeichen von Schmerzen oder Krankheiten. Bei Tiere nachlassender Narkose zeigten die normales Verhalten, die postoperativen Verläufe waren komplikationslos. Gelegentlich wurden die Wundverbände an der Stallwand gescheuert, was als Juckreiz interpretiert wurde, bei der analgetischen Therapie war dieses Verhalten nur sehr selten zu beobachten. Ernsthafte Beschädigungen der mit Leukoplast[®] befestigten Verbände oder Verletzungen ereigneten sich nicht. Die makroskopischen Vergleiche wurden während der Verbandwechsel und im Nachhinein anhand der Fotografien durchgeführt. Die histologischen Betrachtungen fanden ebenfalls später nach Beendigung der Operationen statt.

3.2 Wundheilung

Während der sechswöchigen Heilungsphase kam es zu keinen Komplikationen. Nennenswerte Eiterbildung, Fieber oder andere Infektionszeichen waren nicht zu erkennen.

Bei den Wunden, die mit Wundauflagen aus verschiedenen Materialien in einfacher Stärke behandelt wurden, ließen sich an Tag 42 makroskopisch betrachtet keine Unterschiede der Wundheilung ausmachen. Die Epithelialisierung war bei allen Wunden durchweg abgeschlossen (Abb.6a).

Am deutlichsten waren die Ergebnisse bei dem Versuchstier, dessen Wunden mit Auflagen in vierfacher Stärke behandelt wurden. Hier ließen sich behandlungskorreliert deutliche Epithelialisierungsdefekte beobachten. War die Gruppe der Negativkontrolle nahezu durchweg epithelialisiert, konnten bei Anwendung von Matriderm[®] in vierfacher Stärke die Epitheldecken nur zu ca. 50% als geschlossen bezeichnet werden. Am schlechtesten heilten die Wunden, die mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke behandelt worden waren. Hier war nach sechs Wochen keine Wunde vollständig epithelialisiert (Abb. 6b). Bei dem Versuchstier, das mit einer einfachen Lage Kieselgelfasern sowie mit einer einfachen Lage Kieselgelfasern plus gesättigter Kieselgellösung behandelt wurde, waren bei den verschieden therapierten Wunden keine Unterschiede des Heilungserfolgs zu erkennen. Bei diesem Tier waren nach sechs Wochen alle Wunden oberflächlich geschlossen (Abb. 6c).



Abb. 6a: Heilungsergebnis nach sechswöchiger Behandlung. Die hier gezeigten Areale wurden entweder mit einer einfachen Lage des Kieselgelmaterials oder Matriderm[®] bzw. ohne resorbierbare Wundauflage behandelt. In allen Gruppen zeigt sich eine durchweg geschlossene Epitheldecke.



Abb. 6b: Heilungsergebnis nach sechswöchiger Behandlung. Die hier gezeigten Areale wurden mit vierfacher Stärke der Wundauflagen aus Kieselgelfasern, mit vierfacher Stärke der Wundauflagen Matriderm[®] bzw. ohne resorbierbare Wundauflage behandelt. Bei den überdosiert behandelten Wunden, insbesondere unter Anwendung der Kieselgelwundauflage in vierfacher Menge, ist gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich geringere Epithelialisierung zu beobachten.

		1
Kieselgel	Kieselgel plus gesättigte Lösung	Negativkontrolle

Abb. 6c: Heilungsergebnis nach sechswöchiger Behandlung. Die hier gezeigten Areale wurden mit Wundauflagen aus Kieselgelfasern in einfacher Stärke mit oder ohne Zugabe einer gesättigten wässrigen Kieselgellösung bzw. ohne resorbierbare Wundauflage behandelt. Maßgebliche Unterschiede zwischen den Behandlungsarten sind nicht zu erkennen.

3.3 Wundkontraktion

Bei einer Ausgangsgröße aller Wunden von 9 cm² waren zwischen den Vergleichsgruppen Unterschiede der Wundkontraktion zu erkennen.

Bei Verwendung der Wundauflagen in vierfacher Stärke traten deutliche Verzögerungen in der Wundflächenkontraktion zutage. Bei Behandlung mit der

Wundauflage aus Kieselgel in vierfacher Stärke ließen sich im Vergleich zur Negativkontrolle zwischen der ersten und vierten Woche teilweise hochsignifikante Verzögerungen feststellen (1. Woche p=0.01: 2. Woche p<0,001; 3. Woche p<0,01; 4. Woche p=0,02). Auch die mit Matriderm[®] in vierfacher Stärke behandelten Wunden zeigten im Verhältnis zur Negativkontrolle eine signifikant verzögerte Kontraktion (2. Woche p=0,01; 3. p=0,02). Im Endergebnis nach sechs Wochen waren die mit Wundauflagen in vierfacher Stäke behandelten Wunden und auch die Negativkontrolle vergleichbar auf ca. 40%-50% der ursprünglichen Wundfläche kontrahiert (Abb. 7a).

Die Werte der Wundkontraktion unterschieden sich bei den mit vierfacher Stärke Wundauflagematerial behandelten Wunden nicht nur von der Negativkontrolle, sondern auch voneinander: So war die Kontraktion bei den mit Kieselgel in vierfacher Stärke behandelten Arealen gegenüber den mit Matriderm[®] in vierfacher Stärke behandelten Arealen in der zweiten und dritten Woche signifikant verzögert (2. Woche p<0,001; 3. Woche p=0,01).



Abb. 7a: Zeitlicher Verlauf der abnehmenden Wundgröße. Bei Behandlung mit der vierfachen Menge der Wundauflagen sowohl aus Polyhydroxykieselsäureethylester als auch aus Matriderm[®] zeigte sich eine signifikante Verzögerung der Wundkontraktion.

Die gemessenen Werte der Wundflächen, die mit Wundauflagen in vierfacher Stärke behandelt wurden sowie der zugehörigen Kontrollen finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 2:	Auflistung	der gemessenen	Wu	ndflächen	in cm ²	unter	Behandlun	g mit	der
vierfachen	Menge de	r Wundauflagen	aus	Polyhydro	xykiese	elsäure	ethylester	bzw.	aus
Matriderm®	sowie der	Wunden aus der	Kon	trollgruppe	Э.				

	Kieselgel x 4						
Тад	7	14	21	28	35	42	
	8,12	9,16	9,06	8,62	3,13	3,12	
	9,00	7,77	6,87	6,09	5,01	4,58	
	8,81	8,89	8,57	7,68	6,42	5,60	
	8,73	8,88	6,58	5,20	4,23	3,50	
MW±SD	8,67±0,38	8,67±0,61	7,77±1,23	6,9±1,54	4,7±1,39	4,42±1,02	
			Matride	rm [®] x 4			
Тад	7	14	21	28	35	42	
	6,09	6,60	5,76	4,70	2,38	2,38	
	9,21	6,72	5,36	5,95	5,28	4,23	
	8,92	6,32	6,12	4,99	4,85	4,57	
	7,18	5,44	5,86	5,25	4,86	3,50	
MW±SD	7,85±1,48	6,27±0,58	5,78±0,32	5,21±0,54	4,34±1,32	3,67±0,97	
			Kontrollg	ruppe x 4			
Tag	7	14	21	28	35	42	
	6,20	4,63	3,52	2,87	3,02	2,85	
	7,68	5,58	5,23	4,95	3,47	3,36	
	8,30	5,53	5,38	5,13	4,46	4,78	
	6,83	5,10	4,12	5,01	4,64	2,88	
MW±SD	7,25±0,92	5,21±0,44	4,56±0,89	4,49±1,08	3,9±0,78	3,47±0,91	

Bei dem Versuchstier, dessen Wunden mit einer einfachen Lage der Wundauflagen aus Kieselgelfasern behandelt wurden, ließen sich geringere, aber ebenfalls nachweisbare Verzögerungen der Wundkontraktion darstellen. Diese Verzögerungen waren in der zweiten Woche signifikant (p=0,03). Unter zusätzlicher Applikation von Kieselgellösung beim selben Tier ließen sich keinerlei Effekte nachweisen (Abb. 7b).

Nach Abschluss der Wundheilung und fortgeschrittener Narbenbildung nach sechs Wochen waren alle Narben unabhängig von der vorherigen Behandlung in ihrer Fläche vergleichbar.



Abb. 7b: Zeitlicher Verlauf der abnehmenden Wundgröße. Die Behandlung mit Fasern aus Polyhydroxykieselsäureethylester zeigt an Tag 14 bei einfacher Stärke des Materials eine Verzögerung der Wundkontraktion. Die Wunden, bei denen zusätzlich eine gesättigte Lösung aus Polyhydroxykieselsäure-ethylester appliziert wurde, zeigen diesen Effekt nicht.

Die gemessenen Werte der Wundflächen, die mit einfacher Stärke der Kieselgelfasern und mit gesättigter Kieselgellösung behandelt wurden sowie der zugehörigen Kontrollen finden sich in Tabelle 3 auf der folgenden Seite.

Tabelle 3: Auflistung der gemessenen Wundflächen in cm² unter Behandlung mit Kieselgelfasern in einfacher Stärke ohne bzw. mit Zugabe einer gesättigten Kieselgellösung sowie der Wunden aus der Kontrollgruppe.

	Kieselgel						
Tag	7	14	21	28	35	42	
	7,96	5,34	3,87	2,85	1,77	1,88	
	7,36	5,55	4,12	3,1	1,93	2,4	
	7,61	5,14	3,42	3,29	2,39	1,9	
	5,10	3,02	2,61	2,22	1,4	2	
MW±SD	7,03±1,25	4,76±1,17	3,51±0,66	2,86±0,47	1,87±0,41	2,05±0,24	
			Kieselgel -	eges. Lösun	g		
Tag	7	14	21	28	35	42	
	6,43	3,47	2,7	1,25	1,77	1,76	
	9,11	5,08	3,72	3,32	1,89	1,67	
	7,91	4,92	3,12	3,24	2,25	1,79	
	6,94	3,81	3,41	2,82	2,46	2,68	
MW±SD	7,6±1,18	4,32±0,8	3,24±0,44	2,66±0,96	2,09±0,32	1,98±0,53	
			Kontro	ollgruppe			
Tag	7	14	21	28	35	42	
	6,52	3,03	2,54	1,91	1,39	1,37	
	5,52	3,99	3,08	3,07	1,83	2,17	
	7,52	3,17	3,5	1,91	1,56	2,28	
	7,98	4,58	3,58	3,22	2,24	1,79	
MW±SD	6,86±1,09	3,69±0,73	3,18±0,48	2,53±0,72	1,76±0,37	1,9±0,41	

3.4 Narbenstabilität

Bei keinem der drei Versuchstiere konnte eine signifikante Veränderung der Reißfestigkeit bei den unterschiedlich versorgten in Vernarbung begriffenen Wunden am Tag 42 beobachtet werden.

Die verwendeten exzidierten Streifen waren im ehemaligen Wundbereich gerötet und offensichtlich in ihrem narbigen Umbau noch nicht abschließend gefestigt (Abb. 8). Es zeigten sich starke interindividuelle Unterschiede bei den einzelnen Versuchstieren und bei den einzelnen Wunden.



Abb. 8: Streifenbiopsie zur Ermittlung der Narbenstabilität

Bei dem Versuchstier, das vergleichend mit der einfachen Stärke von Kieselgelfasern und Matriderm[®] behandelt wurde, betrug die Kraft, die zum Reißen des Gewebestreifens nötig war, zwischen 17 N und 78,5 N (Abb. 9a).



Abb. 9a: Narbenstabilität beim Vergleich der mit Wundauflagen in einfacher Stärke behandelten Wunden an Tag 42.

Dagegen waren bei dem Versuchstier, bei dem mit vierfacher Materialmenge behandelten wurde, Kräfte zwischen 12 N und 33 N zu verzeichnen (Abb. 9b).



Abb. 9b: Narbenstabilität beim Vergleich der mit Wundauflagen in vierfacher Stärke behandelten Wunden an Tag 42.

Beim dritten Versuchstier, das mit Kieselfasern in einfacher Stärke ohne bzw. mit Zugabe einer gesättigten Kieselgellösung behandelt wurde, lagen die Werte zwischen 7 N und 26 N (Abb. 9c).



Abb. 9c: Narbenstabilität beim Vergleich der mit Wundauflagen in einfacher Stärke behandelten Wunden ohne und mit Gabe von gesättigter Kieselgellösung an Tag 42.

Alle untersuchten Präparate zeigten neben den interindividuell auftretenden Unterschieden auch innerhalb der zu untersuchenden Gruppen mit jeweils vier Wunden (n=4) sehr hohe Abweichungen. So lag beispielsweise beim Tier mit der Vierfachbehandlung der Mittelwert der Kontrollgruppe bei 24 N bei einer Standardabweichung von 8,5 N. Beim Tier mit der einfachen Behandlung betrug die Kraft, die zum Reißen der mit Kieselsäuregelfasern behandelten Narbe erforderlich war im Mittel 50 N, die Standardabweichung betrug 32 N.

Alle ermittelten bzw. errechneten Werte zu den Kräften und der Narbenstabilität für alle drei Tiere finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Auflistung der gemessenen und errechneten Kräfte F in [N] zur Ermittlung der Narbenstabilität für alle Tiere (n=3)

Einfache	Kieselgel	Matriderm®	Kontrollgruppe
Dosierung			
	20	26	45,5
	25	71	17
	78,5	63	49,5
	77	70	46
MW ±SD	50,13±31,99	57,50±21,30	39,50±15,11
Vierfache Dosierung	Kieselgel x 4	Matriderm [®] x 4	Kontrollgruppe
	21	31	23
	24	22	30
	23	20	30
	33	24	12
MW ±SD	25,25±5,32	24,25±4,79	23,75±8,5
Einfache Dosierung + Lsg	Kieselgel	Kiesegel + ges. Lösung	Kontrollgruppe
	5	11	7
	20	14	26
	20	11	11
	14	15	20
MW ±SD	14,75±7,01	12,75±2,06	12,69±8,6

3.5 Histologisches Bild

In der mikroskopischen Betrachtung der mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittpräparate ließen sich deutliche Unterschiede im histologischen Bild der verschiedenen Wunden erkennen. Bei den mit Wundauflagen in einfacher Stärke behandelten Wunden waren im Zeitverlauf Befunde zu erheben, die mit denen der Negativkontrollen vergleichbar waren. An Tag 7 nach OP waren die Wunden durchsetzt mit Granulozyten und Makrophagen. In den behandelten Wunden kamen anfangs die resorbierbaren Wundauflagematerialien zur Darstellung.

Im Verlauf änderte sich das Bild zum Tag 14 erkennbar mit einer relativen Zunahme von Fibroblasten sowie einer anteiligen Abnahme der Immunzellen und des darstellbaren Fremdmaterials, bis zum Tag 28 typische mikroskopische Bilder frischer Narben vorlagen.

In den mit vierfacher Materialmenge behandelten Wunden fielen bei Betrachtung der Biopsien von Tag 7 die farblosen Bruchstücke des Kieselgelmaterials bzw. das filigranere von Hämatoxylin rötlich gefärbte Matriderm[®]-Material auf. Der sonstige histologische Eindruck mit der typischen Zellverteilung und der anfänglichen Häufung von Leukozyten war vergleichbar.

An Tag 28 war relativ zu den unbehandelten Wunden der Negativkontrollen eine auffallende Persistenz der Leukozyten und bei den mit Kieselgel behandelten Wunden eine Häufung von Fremdkörperriesenzellen zu verzeichnen (Abb. 10a, folgende Seite).



Abb. 10a: Histologische Situation bei Behandlung mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke an Tag 28: Kieselgelfasern im Abbau. Während in den oberflächennahen Schichten das Material stärker fragmentiert ist, persistieren in der Tiefe noch größere Bruchstücke.

Der im Zeitverlauf stattfindende Abbau der Kieselgelfasern war anders als bei den mit einer einfachen Lage der Wundauflage behandelten Wunden verzögert, beginnende Epithelialisierung war nur in zwei von vier aus dem Randgebiet der jeweiligen Wunde präparierten Biopsiepräparaten von Tag 28 zu erkennen (Abb. 10b).



Abb. 10b: Behandlung mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke an Tag 28: Es zeigen sich oberflächliche Nekrosen (A) und reduzierte Epithelialisierung (A+B). (Verdopplungsartefakte in B durch automatisierte Bilderstellung).

Während bei den mit vierfacher Dosis behandelten Wunden augenscheinlich granulomatöse Entzündungsherde und Fremdkörperreaktionen vorkamen, konnte in den unbehandelten Wunden der Kontrollgruppen ein deutlich homogeneres Bild der Narbenbildung beobachtet werden.

Im Verlauf der Wundheilung unter Behandlung mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke lässt sich das Material in jedem histologischen Präparat nachweisen. Ab der vierten Woche sind regelmäßig Riesenzellen in unmittelbarem Kontakt zu den Faserresten darstellbar (Abb. 11, folgende Seite).



Abb. 11: Zeitliche Veränderung im Gewebe beim Abbau der Kieselgelfasern (*) bei vierfacher Dosierung. Abbau mit Beteiligung mehrkerniger Riesenzellen, die im späteren Verlauf zu Schaumzellen aufgehen (Pfeile). Phagozytose und Inkorporation des Kieselgelmaterials ist anzunehmen.

An Tag 42, sechs Wochen nach der Wundpräparation, zeigte sich in den Präparaten der mit der vierfachen Menge Kieselgelfasern behandelten Wunden folgender Befund (Abb. 12):

In den Schnitten der Negativkontrolle, den unbehandelten Wunden, fand sich oberflächlich durchweg eine intakte Epidermis. Im Narbengewebe fanden sich fibroblastoide Zellen und wenige Immunzellen. In der Tiefe waren vereinzelt lymphozytäre Infiltrationen zu erkennen.

In den mit vier Lagen Matriderm[®] behandelten Wunden zeigte sich die Epidermis der histologischen Präparate intakt. Das Narbengewebe war weit ausgedehnt, durchsetzt von Gefäßen. Deutlich vermehrt waren hier Zeichen einer Fremdkörperreaktion in Form von lymphozytären und riesenzelligen Granulomen zu erkennen, die in den unteren Schichten der Narbe kumulierten.

Am deutlichsten fiel der Befund der histologischen Präparate jener

Wunden auf, die mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke behandelten wurden.

Die Epidermis war teilweise mit entzündlichen Infiltraten durchsetzt, vereinzelt fanden sich auch Nekrosen. Langstreckige Epidermisdefekte, lymphozytäre perivasale und disseminierte Zeichen einer chronischen Entzündung fanden sich in allen vier Wunden, die mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke behandelt wurden. In der Tiefe zeigten sich die kristalloiden Reste des Wundauflagematerials in vakuolenartigen, nicht angefärbten Räumen, einhergehend mit Fremdkörperreaktionen, die sich teils makrophagozytär, größtenteils aber riesenzellig darstellten.



Abb. 12: Biopsien an Tag 42 von dem Versuchstier, das mit Wundauflagen in vierfacher Stärke behandelt wurde (Färbung mit Hämatoxylin und Eosin). Auffällig ist der schon in der Übersicht deutliche Unterschied der mit Kieselgelfasern belegten Wunden zu den Vergleichsgruppen, mit einem aufgelockerten Bild, vielen kristallartigen Resten und vakuolenartigen Strukturen der tieferen Dermis. Das zweite Präparat von links zeigt eine reduzierte Epithelialisierung.

Bei den Versuchstieren, die mit der vorgesehenen, einfachen Dosierung des Kieselgels behandelt wurden, waren anfänglich Effekte der Fremdkörperreaktionen ebenfalls in Ansätzen zu beobachten.

Hier zeigte sich jedoch nach wenigen Wochen eine vollständige Resorption der Kieselgelfasern. An Tag 7 und Tag 14 ließen sich die kantigen, farblosen Bruchstücke der Kieselgelfasern noch mikroskopisch nachweisen. An Tag 28 waren nur noch vereinzelt abgerundete Reste des Materials zu erkennen und an Tag 42 fanden sich noch in Degeneration begriffene Riesenzellen. Das Kieselsäurematerial selbst kam dann nicht mehr zur Darstellung. Nekrosen oder ausgedehnte Epidermisdefekte zeigten (Abb. 13) sich nicht.



Abb. 13: Darstellung aller Untersuchungsabschnitte bei Verwendung der Wundauflagen in einfacher Stärke mit und ohne zusätzliche Gabe der gesättigten Kieselgellösung, hier in der Übersicht. Im Gegensatz zu den überdosiert behandelten Wunden sind keine augenscheinlichen Unterschiede der verschiedenen Untersuchungsgruppen zu erkennen.

3.6 Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2

Nach der RNA-Isolation, der cDNA-Synthese und in der Quantifizierung mittels PCR ließen sich vergleichbare Quotienten für die Expressionen der untersuchten Gene für TGF- β 1 und TGF- β 2 sowie 18s messen. Die Expressionen von TGF- β 1 und 18s finden sich in Tab. 5a (folgende Seite).

Tabelle 5a: Werte der Genexpression für TGF-β 1 und 18s. Angegeben sind alle drei gemessenen Konzentrationen der jeweils vier verwendeten Hautareale unter Behandlung mit Wundauflagen aus Kieselgel ohne und mit zusätzlicher Applikation gesättigter Kieselgellösung sowie deren Mittelwerte und Standardabweichungen (MW±SD). E-0x entspricht der Rechenoperation "•10^{-x}".

Kontrolle		
	TGF-β 1	18s
	6,90E-06	0,54
	3,10E-06	0,56
	3,49E-06	0,55
MW±SD	4,50E-06±2,09E-06	0,55±0,01
	6,21E-06	1,04
	5,88E-06	1,10
	6,32E-06	1,03
MW±SD	6,14E-06±2,29E-07	1,06±0,04
	1,28E-06	0,57
	1,73E-06	0,49
	1,60E-06	0,94
MW±SD	1,54E-06±2,32E-07	0,67±0,24
	1,22E-06	0,48
	1,30E-06	0,52
	1,23E-06	0,49
MW±SD	1,25E-06±4,34E-08	0,49±0,023
Kieselgel		
	TGF-β 1	18s
	1,40E-06	0,29
	1,11E-06	0,27
	1,09E-06	0,27
MW±SD	1,20E-06±1,73E-07	0,28±0,01
	1,40E-06	0,49
	1,26E-06	0,53
	1,30E-06	0,53
MW±SD	1,32E-06±7,21E-08	0,52±0,02
	2,47E-06	0,95
	2,55E-06	0,71
	2,36E-06	0,87
MW±SD	2,46E-06±9,54E-08	0,84±0,12

Kieselgel	Fortsetzung (Tab. 5a)	
	3,11E-06	0,54
	2,72E-06	0,5
	2,78E-06	0,54
MW±SD	2,87E-06±2,1E-07	0,53±0,02
Kieselgel		
+ Lsg.		
	TGF-β 1	18s
	4,95E-06	0,41
	6,68E-06	0,39
	5,72E-06	0,39
MW±SD	5,78E-06±8,67E-07	0,4±0,01
	1,39E-06	0,62
	1,13E-06	0,62
	1,01E-06	0,51
MW±SD	1,18E-06±1,94E-07	0,58±0,07
	3,13E-06	0,71
	3,68E-06	0,74
	3,56E-06	0,74
MW±SD	3,46E-06±2,89E-07	0,73±0,02
	3,05E-06	0,47
	3,06E-06	0,51
	3,19E-06	0,46
MW±SD	3,10E-06±7,81E-08	0,48±0,02

Signifikante Hinweise hinsichtlich einer gesteigerten oder verminderten Expression der untersuchten Gene für TGF- β 1 und 18s bei Veränderung der Therapie zeigten sich nicht (Tab. 5b, folgende Seite). Sowohl die Therapie mit Kieselgelfasern als auch die Therapie mit Kieselgelfasern + Lösung zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine Abweichung in ihren Mittelwerten (p=0,591 bzw. p=0,501; je n=4). Auch der Vergleich der Therapiegruppen erbrachte keinen Unterschied (p=0,33; n=4).

Tabelle 5b : Vergleich der Verhältnisse der Genexpression von TGF- β 1 und 18s. Die Quotienten aus TGF- β 1 / 18s werden aus den jeweiligen in Tab. 5a angegebenen Mittelwerten gebildet und mit Mittelwert und Standardfehler (MW±SEM) angegeben.

TGF-β 1 / 18s	Kontrolle	Kieselgelfasern	Kieselgelfasern +
			Lösung
	8,22E-06	4,31E-06	1,46E-05
	5,81E-06	2,55E-06	2,02E-06
	2,31E-06	2,92E-06	4,74E-06
	2,53E-06	5,46E-06	6,44E-06
MW±SEM	4,72E-06±1,42E-06	3,81E-06±6,66E-07	6,94E-06±2,70E-06

Die Genexpression für TGF- β 1 der mit Kieselgelfasern behandelten Wunden betrug im Verhältnis zu der Expression in der Kontrollgruppe 0,81 ± 0,14 SEM zu 1. Die Genexpression für TGF- β 1 bei den mit Kieselgelfasern plus gesättigter Lösung behandelten Wunden betrug im Verhältnis zu der Expression in der Kontrollgruppe 1,47 ± 0,57 SEM zu 1 (Abb. 14a).



Abb. 14a: Genexpression von TGF-β 1 in den mit Kieselgelfasern oder Kieselgelfasern plus gesättigter Kieselgellösung behandelten Wunden, normalisiert auf die verwendete Negativkontrolle

Die Expressionen von TGF- β 2 und 18s finden sich in Tab. 5c (folgende Seite).

Tabelle 5c: Werte der Genexpression für TGF- β 2 und 18s. Angegeben sind alle drei gemessenen Konzentrationen der jeweils vier verwendeten Hautareale unter Behandlung mit Wundauflagen aus Kieselgel in einfacher Stärke mit und ohne zusätzliche Applikation gesättigter Kieselgellösung sowie deren Mittelwerte und Standardabweichungen (MW±SD). E-0x entspricht der Rechenoperation "•10^{-x}".

Kontrolle		
	TGF-β 2	18s
	6,27E-06	0,54
	5,54E-06	0,55
	6,02E-06	0,55
MW±SD	5,94E-06±3,71E-07	0,55±0,01
	3,26E-05	1,04
	1,56E-05	1,10
	1,76E-05	1,03
MW±SD	2,19E-05±9,30E-06	1,06±0,04
	5,98E-06	0,57
	6,50E-06	0,49
	6,06E-06	0,94
MW±SD	6,18E-06±2,8E-07	0,67±0,24
	7,02E-06	0,48
	5,44E-06	0,52
	6,78E-10	0,49
MW±SD	4,15E-06±3,68E-06	0,49±0,023
Kieselgel		
	TGF-β 2	18s
	2,38E-06	0,29
	2,47E-06	0,27
	2,68E-06	0,27
MW±SD	2,51E-06±1,54E-07	0,28±0,01
	7,30E-06	0,49
	6,85E-06	0,53
	6,56E-06	0,53
MW±SD	6,90E-06±3,73E-07	0,52±0,02
	1,48E-05	0,95
	1,36E-05	0,71
	1,49E-05	0,87
MW±SD	1,44E-05±7,23E-07	0,84±0,12

Kieselgel	Fortsetzung (Tab. 5c)	
	1,37E-05	0,54
	1,57E-05	0,5
	1,51E-05	0,54
MW±SD	1,48E-05±1,03E-06	0,53±0,02
Kieselgel		
+ Lsg.		
	TGF- β 2	18s
	1,00E-05	0,41
	1,10E-05	0,39
	9,18E-06	0,39
MW±SD	1,01E-05±9,11E-07	0,4±0,01
	5,76E-06	0,62
	5,81E-06	0,62
	5,93E-06	0,51
MW±SD	5,83E-06±8,74E-08	0,58±0,07
	1,70E-05	0,71
	1,59E-05	0,74
	1,76E-05	0,74
MW±SD	1,68E-05±8,62E-07	0,73±0,02
	1,62E-05	0,47
	2,74E-05	0,51
	1,31E-05	0,46
MW±SD	1,89E-05±7,52E-06	0,48±0,02

Signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer gesteigerten oder verminderten Expression der untersuchten Gene TGF- β 2 und 18s in den verschiedenen Vergleichsgruppen zeigten sich nicht. Weder die Therapie mit Kieselgelfasern in einfacher Stärke noch die Therapie mit Kieselgelfasern in einfacher Stärke plus Zugabe einer Kieselgellösung (Tab. 5d) zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine Abweichung in ihren Mittelwerten (p=0,398 bzw. p=0,138; je n=4). Auch der Vergleich der Therapiegruppen erbrachte keinen Unterschied (p=0,347; n=4).

Tabelle 5d: Vergleich der Verhältnisse der Genexpression von TGF- β 2 und 18s. Die Quotienten aus TGF- β 2 / 18s werden aus den jeweiligen in Tab. 5c gegebenen Mittelwerten gebildet und mit Mittelwert und Standardfehler (MW±SEM) angegeben.

TGF-β 2 / 18s	Kontrolle	Kieselgelfasern	Kieselgelfasern +
			Lösung
	1,09E-05	9,01E-06	2,53E-05
	2,08E-05	1,33E-05	1,00E-05
	9,27E-06	1,71E-05	2,31E-05
	8,40E-06	2,82E-05	3,93E-05
MW±SEM	1,23E-05±2,86E-06	1,69E-05±4,11E-06	2,44E-05±6,00E-06

Die Genexpression für TGF- β 2 der mit Kieselgelfasern behandelten Wunden betrug im Verhältnis zu der Expression in der Kontrollgruppe 1,37 ± 0,33 SEM zu 1. Die Expression für TGF- β 2 bei den mit Kieselgelfasern plus gesättigter Lösung behandelten Wunden betrug im Verhältnis zu der Expression in der Kontrollgruppe 1,98 ± 0,49 SEM zu 1 (Abb. 14b).



Abb. 14b: Genexpression von TGF- β 2 in den mit Kieselgelfasern in einfacher Stärke oder Kieselgelfasern in einfacher Stärke plus gesättigter Kieselgellösung behandelten Wunden, normalisiert auf die verwendete Negativkontrolle.

3.7 Entzündungsreaktionen

Einige histologische Präparate, besonders die des mit vierfacher Stärke der Wundauflagen behandelten Versuchstiers ab Tag 14, zeigten bei den mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten einen hohen Anteil an Riesenzellen, die zwecks Zählung und Quantifizierung der Entzündungsaktivität immunhistochemisch markiert werden sollten. Die Markierungsversuche von Zellen der monozytären Linie mit den Antikörpern MAC 387 und Anti-CD 68 waren unter allen gewählten Ansätzen negativ. CD 68 (CD=Cluster of Differentiation) gilt als humanes Antigen, das als spezifischer Marker im Zyoplasma von Makrophagen vorkommt. Sowohl CD 68 als auch das auf dem Epitop von Granulozyten mit MAC 387 (MAC = Monoclonal Antibody Core) bindende Antigen (Goebeler et al. 1994) gelten beide als typische Strukturen von humanen Monozyten und Zellen derer Linie. Die industriell hergestellten und vertriebenen Antikörper werden nach den Herstellerangaben auch als kreuzreaktiv für porcine Zellen beschrieben, sie ergaben in dieser Studie aber keine Ergebnisse im Sinne positiv dargestellter Zellen.

In der hier durchgeführten Studie gelang die Markierung der antigenen Strukturen von Zellen der monzytären Linie nur mit Antikörpern gegen Cathepsin K (Abb. 15).



Abb. 15: Darstellung der Fremdkörperreaktion als mehrkernige Riesenzellen. Negative Befunde bei MAC 387 und Anti-CD 68, positive Darstellung durch Antikörper gegen Cathepsin K.

In der Streptavidinfärbung wurden diese Cathepsin K exprimierenden Zellen leuchtend grün angefärbt und ließen sich klar als Zellen der monozytären Zelllinie identifizieren (Abb. 16).



Abb. 16: Cathepsin K-positive dendritische Zelle.

Zur quantitativen Darstellung der Entzündungsreaktionen wurden im *Stratum reticulare* der histologischen Präparate nach sechswöchiger Heilungsphase je zwanzig Gesichtsfelder bewertet. Die Areale, in denen gehäuft die angefärbten Fremdkörpergranulome (Abb. 17, folgende Seite) zu finden waren, wurden als positiv gewertet.



Abb. 17: Fremdkörpergranulom *"Hotspot*": links mit Streptavidin gefärbte Cathepsin K-positive Zellen, rechts als HE-Präparat.

Es ließ sich mit dieser Methode eine Tendenz erkennen, aber bei hoher Standardabweichung nicht der statistische Nachweis erbringen, dass bei den mit Kieselgelfasern behandelten Wunden erhöhte Entzündungsaktivität stattfindet (Abb. 18).



Abb. 18: Prozentuale Verteilung der mit Anti Cathepsin K markierten Areale in der Narbe an Tag 42 bei dem Versuchstier, das mit einer einfachen Lage Kieselgelfasern mit und ohne zusätzliche Applikation einer gesättigten Kieselgellösung behandelt wurde. Tendenziell finden sich bei Behandlung mit Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester mehr Entzündungszellen im Gewebe.

So zeigten die Wunden, die mit Kieselgelfasern in einfacher Lage behandelt wurden, im Mittel 61 Cathepsin K-positive Gesichtsfelder bei einer Standardabweichung von 32. Die Wunden, die mit Kieselgelfasern in einfacher Lage und gesättigter Lösung behandelt wurden, zeigten im Durchschnitt 51 positive Gesichtsfelder bei einer Standardabweichung von 15. Bei den unbehandelten Wunden der Negativkontrolle fanden sich bei der oben beschriebenen Vorgehensweise 32 positive Gesichtsfelder bei einer Standardabweichung von 24 (Tab. 6).

Tabelle 6:ProzentualerAnteilderWundareale,diebeiBehandlungmitKieselgelfasernmitoderohnezusätzlichapplizierterKieselgellösungFremdkörpergranulomeenthalten.Ausgewertetwurdeunter40%igerVergrößerung.AngegebensinddiezuAbb.18gehörendenMesswertemitMittelwertundStandardabweichung (MW±SD).

%	Kieselgelfasern	Kieselgelfasern +	Kontrolle
		Lösung	
	80	10	15
	45	85	25
	25	35	60
	95	75	5
MW±SEM	61,25±31,98	51,25±34,97	32,81±23,94

4. Diskussion

4.1 Wundheilung

Zur Behandlung größerer Hautdefekte werden im klinischen Alltag neben chirurgischen Methoden Wundauflagen aus verschiedenen Materialien benutzt, die entweder resorbierbar in der Wunde verbleiben oder aber regelmäßig aus der Wunde entfernt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beleuchten einige wichtige Aspekte der Wundheilung unter Verwendung von resorbierbaren Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester, die für die entwickelnde Firma Bayer untersucht werden sollten.

Das untersuchte Material, Kieselgel, wurde zum Verbleib in der Wunde wasserlöslich und biologisch resorbierbar als Wundauflage vorgestellt. Bei Vollhautwunden am gesunden Minischwein konnten in dieser Arbeit Aspekte der Wundheilung unter Einsatz dieses Materials beobachtet werden, die es in Teilaspekten als genau so wirksam wie andere Materialien erscheinen lassen, es wurden aber auch unerwünschte Wirkungen beobachtet.

Bei Verwendung der vorgesehenen Mengen dieser Wundauflagen sind die Heilungsergebnisse vergleichbar mit anderen Maßnahmen, es entstehen keine messbaren oder darstellbaren Nebenwirkungen. Die Wundkontraktion, die sich bei Behandlung mit einfacher Lage des Kieselgelmaterials in den ersten zwei Wochen verzögert zeigt, hat keine Nachteile für das Endergebnis: die Narbengröße nach sechswöchiger Heilungsphase ist bei allen Arealen gleich groß. Bei der einfachen Lage der Wundauflagen sind die Wunden ebenso wie die Wunden Vergleichsgruppen gleichermaßen der verheilt. Diese Vergleichbarkeit der Heilungsergebnisse lässt das Kieselgel zunächst als geeignetes Therapeutikum für tiefere Hautwunden erscheinen. Diese Ergebnisse wurden bei der Heilung am jungen gesunden Schwein und unter Verwendung der vorgesehenen Menge des Materials beobachtet. Ob sich bei erkrankten Organismen, oder bei infizierten Wunden derartige Effekte erzielen lassen, wurde in dieser Studie nicht geprüft.

Eindeutig nachteilig sind die beobachteten Effekte bei gesteigerter Menge der Wundauflagen zu bewerten, die im Rahmen dieser Untersuchung im Vergleich zur vorgesehenen Menge vervierfacht wurde. Dieses Vorgehen wurde zum einen gewählt, um den bei der Präparation entstandenen Substanzdefekt auszugleichen, aber auch, um mögliche Nebenwirkungen zur Darstellung zu bringen.

Unter vierfacher Stärke, also unter einer 8 mm dicken Lage von Polyhydroxykieselsäureethylester, zeigen sich Wundheilungsstörungen in Form von defizitärer Epithelialisierung, mikroskopisch vereinzelt dargestellter Nekrosen und deutlich verzögerter Wundkontraktion. Diese Nebenwirkungen, insbesondere die ausbleibende Regeneration der Epidermis bei Anwendung des Materials in vierfacher Stärke, sind als Indikatoren einer gestörten Heilung anzusehen. Die Wunden unter Behandlung mit vierfacher Menge von Matriderm[®] zeigten ebenfalls Epithelialisierungsstörung, allerdings in geringerer Ausprägung.

Ebenfalls traten bei den Wunden, die mit vierfacher Stärke Kieselgel behandelt wurden, Nekrosen der Dermis auf. Analog zu diesen Nekrosen finden sich Hinweise in der Literatur aus Versuchen in der Zellkultur, bei denen im direkten Kontakt zu Polyhydroxykieselsäureethylesterfasern abgestorbene Fibroblasten vorkommen (Grotheer, 2012). Auch wurde in der Zellkulturstudie eine Reduktion der Keratinozytenproliferation beschrieben. Diese findet im Tierversuch ihre Entsprechung in der mangelhaften Epithelialisierung. Die *Invitro*-Untersuchungen bestätigen zumindest das Potenzial zur Entwicklung derartiger Nebenwirkungen bei Anwendung des Materials.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zwar bei einfacher Dosierung des Kieselgelfasermaterials keine objektivierbare Beeinträchtigung der Wundheilung feststellbar ist, eine echte Verbesserung der Heilungsergebnisse konnte aber in keinem Teil der Studie nachgewiesen werden. Bei einer Überdosierung lassen sich dagegen in dieser Studie erhebliche Nachteile in der Wundheilung provozieren.

Die Messung der Narbenstabilität muss insgesamt als Momentaufnahme betrachtet werden: Die Werte ließen sich möglicherweise im längerfristigen Heilungsverlauf klarer darstellen. Sechs Wochen nach Präparation der Wunden ist noch nicht mit einer abgeschlossenen Narbenbildung zu rechnen, sondern das untersuchte Gewebe entspricht eher einer oberflächlich verschlossenen Wunde mit weiteren konsolidierenden Vorgängen in der Tiefe. Bei einer längeren Heilungs- und Beobachtungsphase wäre eventuell ein deutlicheres Ergebnis möglich gewesen.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass aus Sicht der hier gewonnenen Ergebnisse die wichtigste Voraussetzung für eine ungestörte Wundheilung bei Behandlung mit Fasermaterial aus Polyhydroxykieselsäureethylester darin liegt, dass nicht zu viel von dem Material verwendet wird.

4.2 Tiermodell

Bislang stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, an denen sich die pathophysiologischen Zusammenhänge der Wundheilung nachvollziehen und für die Medizin erforschen lassen. Als eins der besten dieser Modelle wird das Schwein beschrieben (Greenhalgh et al., 2005; Meyer et al., 1978; Wang et al., 2001), daher wurde es auch für die Versuche in dieser Studie verwendet. Das Modell eignet sich hervorragend für die Erforschung von Wunden am gesunden Organismus. Die meisten Wunden, die in der Humanmedizin problematisch werden, sind jedoch chronische Wunden von erkrankten Patienten. Trotz aller entwickelten Methoden scheint aber noch kein geeignetes Tiermodell entwickelt worden zu sein, das die realistische Darstellung chronischer Wunden und deren Heilung in vollem Umfang ermöglicht. Daher wurden auch in dieser Arbeit keine chronischen Wunden mit Heilungsstörungen behandelt. Der Verlauf wurde an gesunden und zudem sehr jungen Tieren untersucht.

Eine denkbare Optimierung wäre es, lebensalte Versuchstiere zu untersuchen. Bei solchen Tieren könnte die Lokalisation der Wunden an den Extremitäten gewählt werden, die den typischen chronischen menschlichen Wunden nahe kämen. Auch Tiere, deren Stoffwechsel per Streptozotocingabe medikamentös verändert einem Diabetes mellitus entspricht, könnten weitere Ergebnisse liefern. Weil aber auch ein kurzzeitig herbeigeführter Diabetes mellitus nicht mit den typischen langfristigen Gefäßschäden einhergeht, die die Wundheilung häufig beim Menschen behindern. kann dieses auch Diabetesmodell chronische menschliche Wunden nicht authentisch simulieren, es ist allenfalls für die Herstellung gewisser Einzelfaktoren im Wundmilieu einer akuten Wunde geeignet.

Ein neuerer Ansatz eines Wundmodells für chronische Wunden könnte das Vorgehen sein, bei dem Wunden an Mäusen durch Infektion mit einem speziellen Biofilm infiziert und antioxidative Enzyme in der Wunde gehemmt werden (Dhall et al. 2014).

Zum besseren Verständnis der Heilungsvorgänge in Versuchsreihen und zur realistischen Darstellung von Wundheilungsstörungen bei chronischen Wunden wäre ein Modell hilfreich, das möglichst vielen der Faktoren entspricht, die einer menschlichen chronischen Wunde zu Grunde liegen. Die metabolischen Vorgänge im Organismus sollten hierbei ebenso Einfluss nehmen können wie die anderen möglichen Störfaktoren. Insbesondere die angiopathologischen Ursachen humanmedizinischer Problemwunden scheinen in den derzeit etablierten Modellen nicht in ausreichendem Maße vertreten zu sein.

4.3 Leukozytenmarkierung

Der Antikörper gegen Cathepsin K war in der Lage, gezielt Makrophagen und riesenzellige Zellkonglomerate zu markieren. Dies verbesserte die Darstellung und die Auswertung der Fremdkörperreaktionen. Bemerkenswert ist, dass die typischerweise zur Markierung von Makrophagen und anderen Zellen monozytärer Abstammung angewendeten und empfohlenen Antikörper MAC 387 und Anti-CD 68 gegen spezifische Zellstrukturen nicht die erwartete Darstellung der Zellen ermöglichten.

Die Fusion von Makrophagen zu Riesenzellen findet in der Regel statt, um großen Fremdkörpern mit einer erhöhten Lysekapazität zu begegnen. Die Neigung zur Fusion wird durch einen sauren pH-Wert begünstigt (Franklin, 1958). Cathepsin K ist eine Cystein-Proteinase, deren Bildung durch Osteoklasten am häufigsten genannt wird. Es ist in der Lage, in saurem Milieu zwei Substanzen des Knochens, Osteonektin und Kollagen, abzubauen (Garnero et al., 1998). Cathepsin K lässt sich darüber hinaus sowohl in Makrophagen als auch in Fremdkörperriesenzellen nachweisen, spezifische osteoklastische Aktivität ist nicht obligat (Konttinen et al., 2001).

In den histologischen Bildern der hier durchgeführten Studie konnte der direkte Kontakt von Cathepsin K exprimierenden Zellen zu den Fasern des Wundauflagematerials aus Polyhydroxykieselsäureethylester dargestellt werden.

Insgesamt kann aus den Eigenschaften von Cathepsin K und den histologischen Befunden die Vermutung abgeleitet werden, dass in den Fremdkörperriesenzellen auch der Abbau des Kieselsäurematerials stattfindet.

Warum in der Dermis der Göttinger Minischweine die Antigene von MAC 387 und Anti-CD 68 nicht zur Darstellung kamen, ist unklar. Die verwendeten Antikörper wurden von den Herstellern als kreuzreaktiv für porcine Makrophagen angegeben. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits an anderer Stelle beobachtet und beschrieben, aber noch nicht näher untersucht.

So wurden in einer Studie durch Markus Lauer 2006 bei Schweinen der Rasse Mini-LEWE zur Untersuchung von Knochenimplantaten mehrkernige Riesenzellen dargestellt. Die immunhistochemische Detektion von CD 68 und anderen Markern, die zur Darstellung von Monozyten und deren Abkömmlingen häufig verwendet werden, aber auch Antikörper gegen Calzitoninrezeptoren und gegen den Rezeptor $\alpha V\beta$ 3-Integrin führten nur zu "ausbleibenden und unspezifischen Signalen" (Lauer, 2006, S. 45). In der Studie von Lauer ließen sich Riesenzellen in Assoziation mit Fremdkörperreaktionen durch Antikörper gegen Cathepsin K spezifisch darstellen.

4.4 Einfluss auf die Wachstumsfaktoren

Aufgrund des spezifischen Einflusses von TGF-β auf die Kollagensynthese, das Bindegewebe und die Narbenbildung, ("Antiscarring Effects", Singer et al., 1999, S. 741) wurde hier exemplarisch die Expression dieses Wachstumsfaktors ermittelt.

Die Erwartung, dass unter den verschiedenen Wundbehandlungen eine nachweisbare Veränderung der TGF-β-Expression stattfindet - und sich somit ein indirekter Hinweis darauf ergibt, dass sich die unterschiedlichen Materialien auf den Heilungsverlauf, die Kollagensynthese, die Angiogenese, die Beeinflussung von Abwehrzellen oder anderweitig auswirken könnten - ließ sich nicht bestätigen.

Ein denkbarer Ansatz zur Erhöhung der Sensitivität der in dieser Studie durchgeführten Expressionsanalysen könnte die Untersuchung von isolierten Präparaten aus der Epidermis sein, da in den Keratinozyten die Expression von TGF- β generell höher ist. Neben TGF- β könnten auch andere Mediatoren, die bei der Wundheilung und Narbenbildung molekularbiologisch eine Rolle spielen, genetisch dargestellt und quantifiziert werden, um die veränderte Wundheilung zu bewerten. Hierzu zählen neben der TGF- β -Familie unter anderem der *Transforming Growth Factor Alpha* (TGF- α), der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), der *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Singer et al., 1999).

In Untersuchungen der Kieselgelfasern *in vitro* durch Vera Grotheer 2012 deuten einige Ergebnisse darauf hin, dass chronische Wunden durch die Behandlung mit Polyhydroxykieselsäureethylester positiv wie negativ beeinflusst werden können. So spricht die Steigerung der Expression von TNF- α in Keratinozyten und Endothelzellen zwar für eine begünstigte Angiogenese, aber auch für die erhöhte Wahrscheinlichkeit, bei einem chronischen Geschehen negative Eigenschaften zu entwickeln, da erhöhte Expressionen von TNF- α typischerweise bei Unterschenkelgeschwüren beobachtet werden (Grotheer, 2012).

4.5 Abbau des Kieselsäurematerials in vivo

Die dargestellte entzündliche Aktivität in Form einer nachweisbar erhöhten Anzahl von Fremdkörpergranulomen und monozytärer Infiltrate war mit den hier gewählten Methoden nicht statistisch nachweisbar gesteigert. Trotzdem zeigte die orientierende Betrachtung der histologischen Präparate mit Auszählung der die Cathepsin K-positiven Areale Tendenz zur Häufung von Fremdkörperriesenzellen und Fremdkörpergranulomen in den mit Kieselgelfasern in vierfacher Stärke behandelten Wunden. Auch die mit der Matriderm® Menge behandelten vierfachen Wunden zeigten viele Fremdkörpergranulome. Zur Entstehung dieser Konglomerate aus Leukozyten erscheint die Art des verwendeten Materials von geringerer Bedeutung zu sein als die bloße Tatsache, dass mit einer überhöhten Menge resorbierbarer Wundauflagen behandelt wurde. Das Kieselgelmaterial ist bei den mit vierfacher Stärke behandelten Wunden auch noch nach sechswöchiger Heilungsphase darstellbar. Besonders bei diesen Wunden ist die Nähe der Faserreste zu Fremdkörperriesenzellen offensichtlich.

Im Gegensatz dazu sind in den histologischen Präparaten der einfach behandelten Wunden die Faserreste nach zwei bis drei Wochen nicht mehr darstellbar und das Gewebe erscheint wie auch das der unbehandelten Wunden der Negativkontrollen wesentlich homogener.

In Anbetracht des histologischen Bildes und der oben beschriebenen Eigenschaften von Cathepsin K drängt sich die Vermutung auf, dass das Fasermaterial aus Polyhydroxykieselsäureethylester durch eben diese Fremdkörperriesenzellen abgebaut wird.

Auch die *in-vitro*-Untersuchungen von Vera Grotheer geben Hinweis auf den Abbau des Materials durch Monozyten, in denen besonders in aus Mäusemakrophagen abgeleiteten RAW-Zellen signifikante Mengen an Silizium nachgewiesen wurden (Grotheer, 2012).
4.6 Finanzierbarkeit

Angesichts der erhöhten Wahrscheinlichkeit von chronischen Wunden im fortgeschrittenen Alter und der momentanen demografischen Entwicklung in den Industrienationen wird die Optimierung der Wundbehandlung an Bedeutung gewinnen. Gleichzeitig haben sozioökonomische Faktoren weltweit einen entscheidenden Einfluss auf eine angemessene medizinische Versorgung breiter Bevölkerungsschichten.

Die Finanzierbarkeit einer erfolgversprechenden Therapie in Zeiten von globalen Wirtschaftskrisen und ständigen Veränderungen politischer Gesundheitssysteme ist ein Faktor, der bei der Bereitstellung von Medizinprodukten ernst genommen werden muss. Eine effektive, medizinisch und gleichzeitig kostengünstige Therapie hochwertige ist ein stets anzustrebendes Ideal. Dennoch können kostengünstige Behandlungsmethoden auch bei geringerem therapeutischen Nutzen einen Vorteil bedeuten, wenn auf kostenintensive Behandlungsmöglichkeiten nicht zugegriffen werden kann (Carter, 2010).

Ein denkbarer Vorteil des Kieselgelmaterials könnte eine Kostenreduzierung im Vergleich zu den bisher verfügbaren resorbierbaren Wundauflagen sein. Das Material besteht aus einer molekular relativ einfach aufgebauten anorganischen Siliziumverbindungen und lässt sich mit den entsprechenden Methoden aus günstigen Rohstoffen herstellen (Patent Glaubit et al., 1997, Patent Baecker et al., 2011). Die bisher etablierten resorbierbaren Wundauflagen dagegen, kollagenbasierte oder azelluläre Dermis, sind aus biologischen Komponenten gefertigt, die eine vergleichsweise aufwändige Herstellungsweise erfordern.

Eine genaue Bezifferung der Kosten für Kieselgelwundauflagen steht bei fehlendem Nachweis ihres Nutzens derzeit nicht an. Bei den häufig verwendeten resorbierbaren Wundauflagen sind Preise von deutlich über \in 3,pro Quadratzentimeter üblich (Suprathel[®] 5 Lagen 180 mm x 230 mm \in 1246,50 medizinfuchs.de 13.05.2013; 5 Lagen Matriderm[®] 148 x 105 mm x 2 mm \in 3.150,00 Korrespondenz Asklepios Medizintechnik 21.05.2013). Diese auch herstellungsbedingten Kosten könnten bei Verwendung simplerer Materialien aus anorganischen Siliziumverbindungen geringer ausfallen.

Falls sich keine weiteren negativen Ergebnisse in den bereits abgeschlossenen klinischen Studien oder anderen Versuchen mit Kieselgel als

Wundauflage zeigen, wäre es wünschenswert, dass der Hersteller diesen denkbaren Preisvorteil bei einer Vermarktung auch umsetzt.

4.7 Ausblick und klinischer Nutzen

Die Nebenwirkungen, die in der Studie mit Polyhydroxykieselsäureethylester beobachtet wurden, entstanden bei vierfach gesteigerter Materialmenge. Der wohldosierte Einsatz des Materials beim gesunden Schwein ist dagegen im Endergebnis mit der Verwendung anderer Wundauflagen vergleichbar. Somit stellt Kieselgel eine grundsätzlich mögliche Erweiterung der therapeutischen Mittel bei tiefen Hautdefekten dar. Ob mit diesem Material ein medizinischer Vorteil für Menschen erzielt werden kann, kann angesichts der hier dargestellten, durch Überdosierung provozierten, deutlichen Heilungsstörung nicht abgeleitet werden. Die Ergebnisse der klinischen Studien, die seit 2009 durchgeführt wurden, liegen noch nicht vor.

Zunächst erscheint es vom jetzigen Standpunkt aus sinnvoll, dieses Material nicht am Menschen sondern, wenn überhaupt, in weiteren Tierversuchen zu prüfen. Das Wundheilungsmodell des mit Streptozotocin behandelten diabetogenen Schweins, eventuell lebensälter und mit Extremitätenwunden. könnte weitere Erkenntnisse zu den Heilungseigenschaften bei Läsionen ermöglichen, die den menschlichen Problemwunden ähnlicher sind.

Insbesondere der Nutzen bei chronischen, infizierten und mangeldurchbluteten Wunden, der im Rahmen dieser Studie nicht dargestellt werden konnte, sollte weiter im Fokus bleiben. Ob die positiven Erwartungen des Herstellers für die Therapie an menschlichen und besonders den herausfordernden chronischen Wunden erfüllt werden, bleibt nach Auswertung in dieser Studie zweifelhaft.

5. Zusammenfassung

Im medizinischen Alltag sind Wunden für nahezu jedes Fachgebiet relevant. Tiefe oder großflächige, akute oder chronische Wunden stellen in der ambulanten sowie stationären Patientenversorgung eine immer wiederkehrende Herausforderung dar.

Für diese Studie stellte die Firma Bayer resorbierbare Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester, anorganischen Kieselgelfasern, zur Verfügung, deren Wirksamkeit untersucht werden sollte.

Dazu wurden bei drei Göttinger Miniaturschweinen jeweils zwölf Vollhautwunden operativ bis zur Tiefe der darunterliegenden Muskelfaszie präpariert. Die Wunden wurden vergleichend wie folgt therapiert: Behandlung mit einer Wundauflage aus Polyhydroxykieselsäureethylester in einfacher Stärke, mit und ohne topische Applikation einer gesättigten Kieselgellösung; Behandlung mit einer Wundauflage aus Kieselgelfasern in vierfacher Stärke; Behandlung mit einer Kollagen-Elastinmatrix (Matriderm[®]) in einfacher und vierfacher Stärke; Behandlung ohne resorbierbare Wundauflage als Negativkontrolle.

Bei allen Tieren wurden im Heilungsverlauf an den Tagen 7, 14, 28, und 42 nach Wundpräparation Vermessungen der Wundflächen und die Gewinnung histologischer Biopsien durchgeführt. Bei Versuchsende wurde die Narbenstabilität Es erfolgten gemessen. zudem histologische und immunhistochemische Untersuchungen sowie eine Zählung von Fremdkörpergranulomen mittels Darstellung von Zellen der monozytären Linie. Darüber hinaus wurde die Genexpression der Wachstumsfaktoren TGF-ß 1 und TGF-β 2 ermittelt, die die Kollagensynthese, die Fibroblastenproliferation und die Immunmodulation steuern.

Die mit Kieselgelfasern in einfacher Stärke behandelten Wunden zeigten in dieser Studie eine verzögerte Wundkontraktion und eine tendenzielle Häufung von Fremdkörpergranulomen. Wenn die Wundauflagen aus Kieselgel überdosiert in vierfacher Stärke aufgebracht wurden, war die Verzögerung der Wundkontraktion noch deutlicher ausgeprägt, und es ließen sich makroskopisch Wundheilungsstörungen darstellen. Mikroskopisch kamen beim vierfachen Einsatz des Kieselgelmaterials neben Epitheldefekten auch vereinzelte Nekrosen zur Darstellung. Bei den mit Kollagen und Elastin in vierfacher Stärke behandelten Wunden ließ sich in geringerem Ausmaß ebenfalls eine defizitäre Epithelialisierung darstellen. Bei den anderen gemessenen Kriterien. zeigten sich bei den untersuchten Wunden keine nachweisbaren Unterschiede. Statistisch signifikante Abweichungen ließen sich in dieser Studie bei der vom empfohlenen Hersteller Materialmenge nur als Verzögerung der Wundkontraktion nachweisen.

Der biologische Abbau des Kieselgelmaterials ließ sich in Assoziation zu Fremdkörperriesenzellen darstellen, die mit Antikörpern gegen Cathepsin K markiert werden konnten.

Die vorliegende Studie gibt Hinweise darauf, dass die Verwendung pro Wunde arößerer Mengen Kieselgel mit erhöhtem Risiko für Wundheilungsstörungen einhergeht. Ob diese Nebenwirkungen grundsätzlich bestehen, oder ob sie vermeidbar sind, kann gegebenenfalls in weiteren Untersuchungen dargestellt werden. Die Ergebnisse von abgeschlossenen klinischen Untersuchungen, die ebenfalls durch die Herstellerfirma initiiert wurden, liegen noch nicht vor. Dies und weitere Aspekte könnten sich im diabetischen Tiermodell bei hyperglykämischer Stoffwechselsituation zeigen. Auch Versuche mit alten Tieren, Tieren mit Durchblutungsstörungen und an Wundmodellen mit chronischen Wunden könnten weitere Hinweise bezüglich der Wirkung und der Nebenwirkungen ergeben.

Bei Verwendung der vorgesehenen Dosierung zeigte das untersuchte Material relativ zu handelsüblichen Materialien in der hier vorgelegten Studie eine vergleichbare therapeutische Wirksamkeit. Bei kostengünstiger Herstellung und entsprechend niedrigen Preisen im Verkauf könnten Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester gegebenenfalls für zur wirtschaftlichen Verordnungsweise angehaltene Ärzte und für wirtschaftlichen Zwängen unterliegende Patienten das therapeutische Spektrum erweitern. Zuvor muss aber der Nachweis gelingen, dass die in dieser Studie bei Überdosierung dargestellten Nachteile nicht auch unter anderen Bedingungen auftreten.

Medizinische Vorteile gegenüber den etablierten Materialien können hier nicht abgeleitet werden. Optimistische Erwartungen konnten mit dieser Studie nicht untermauert werden.

74

Abstract

<u>Background:</u> Nearly every medical subject requires daily work with wounds. Deep wounds, widespread lesions of the skin, and fresh or chronic wounds repeatedly challenge the therapeutically intended approach. A large variety of materials and methods exists to treat large or deep wounds; these means of therapy vary in effort, efficacy and price. One new approach to treat these more complicated lesions could be the use of wound dressings made of polyhydroxysilicaacidethylester. Effects of this inorganic biodegradable silica gel fiber wound dressing, which is beeing developed by the company Bayer, have been investigated in this study.

<u>Methods:</u> For this study, a total of 36 wounds were caused on 3 mini pigs. These wounds had the size of 3×3 cm and a depth to the first muscular fascia. The wounds were treated alternatively with silica gel with and without additional application of a saturated solution of the silica gel, with silica gel and dressings made of collagen and elastin (Matriderm[®]) in single and quad layer thickness, and without any direct wound dressing as a negative control. The results of the healing were compared clinically and with macroscopic, microscopic, physical and molecular methods on days 7, 14, 28, and 42 after the surgical approach. The contractions of the wounds were calculated, and the stability of the scar was measured. Also, the expressions of the growth hormones TGF- β 1 and TGF- β 2 were measured and compared. The histological slides were scanned thoroughly and evaluated, signs of inflammation were detected.

<u>Results:</u> The wounds that were treated with silica gel showed a delayed contraction during the period of healing. When treated with a dosage 4 times as high as recommended, the contraction was even more delayed and signs of insufficient healing appeared. The other measured criteria - stability of the scar and expression of growth factors – did not show any differences in the wounds treated with silica gel, the wounds treated with collagen, and the negative control. The only significant difference when using the silica gel dressings in the recommended dosage occurred in the delayed wound contraction. Thicker, quad layers of wound dressings showed similar, comparable side effects in both the silica gel and, less severe, in the collagen elastin wound dressings resulting

in a deficiency of the development of the epithelial cover, and microscopically scattered foreign body granuloma.

Foreign body giant cells in the scar tissue were marked with antibodies against Cathepsin K.

<u>Discussion</u>: At first sight, the silica gel wound dressing appears to be a usable tool for the therapy of deep wounds. An increased amount of this dressing material means more disturbance of the healing process. One clinical study in German hospitals has been terminated, results have not been published yet. The question remains whether the negative side effects observed under an overdose of the material will appear principle or if they can be avoided. Maybe more evidence could be derived from a different animal model. A model with older animals or animals with wounds on the limbs could provide further insights on the potential effect of silica gel as a wound dressing as a treatment for chronic wounds. A diabetic animal model could show effects in hyperglycemic wounds.

If silica gel as a wound dressing has any positive effects on the healing process and if silica gel can provide any medical advantages in healing human, particularly poorly vascularized, chronic wounds, such effects cannot be derived from this study.

6. Literatur

Altmeyer P, Paech V (2010). Enzyklopädie Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Abed S (2009). Die Hemmung von Transforming Growth Factor (TGF) aggraviert Mortalität und linksventrikuläre Dilatation nach Myokardinfarkt. Dissertation Würzburg

Adhirajan N, Shanmugasundaram N, Shanmuganathan S, Babu M (2009). Collagen-based wound dressing for doxycycline delivery: in-vivo evaluation in an infected excisional wound model in rats. J Pharm Pharmacol. 61(12):1617-1623

Bell RH jr, Hye RJ (1983). Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res. 35(5):433-460

Bowling FL, Salgami EV, Boulton AJ (2007). Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant Staphylococcus aureus from diabetic foot ulcers. Diabetes Care. 30(2):370–371

Carter MJ (2010). Cost-effectiveness research in wound care: definitions, approaches, and limitations. Ostomy Wound Manage. 56(11):48-59

Cigna E, Tarallo M, Bistoni G, Anniboletti T, Trignano E, Tortorelli G, Scuderi N (2009). Evaluation of polyurethane dressing with Ibuprofen in the management of split-thickness skin graft donor sites. In Vivo. 23(6):983-986

Clare MP, Fitzgibbons TC, McMullen ST, Stice RC, Hayes DF, Henkel L (2002). Experience with the vacuum assisted closure negative pressure technique in the treatment of nonhealing diabetic and dysvascular wounds. Foot Ankle Int. 23(10):896–901 Dhall S, Do D, Garcia M, Wijesinghe DS, Brandon A, Kim J, Sanchez A, Lyubovitsky J, Gallagher S, Nothnagel EA, Chalfant CE, Patel RP, Schiller N, Martins-Green M (2014). A novel model of chronic wounds: importance of redox imbalance and biofilm-forming bacteria for establishment of chronicity. PLoS One. 9(10):e109848. doi: 10.1371/journal.pone.0109848. eCollection 2014

Dissemond J¹, Witthoff M, Brauns TC, Haberer D, Goos M (2003). pH values in chronic wounds. Evaluation during modern wound therapy. Hautarzt. 54(10):959-65

Ettl J, Paepke S, Klein E, Paepke D, Niemeyer M, Kiechle M (2012). Einsatz porciner azellulärer Dermis (StratticeTM) als gewebeersetzendes und unterstützendes Interponat zur Implantatabdeckung bei problematischen Weichteilverhältnissen in der plastisch-rekonstruktiven Mammachirurgie. Senologie 9: A38-DOI

Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ (2008). Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad Dermatol. 58:185-206

Franklin RM (1958). The growth of fowl plague virus in tissue cultures of chicken macrophages and giant cells. Virology. 6(1):81-95

Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaissé JM (1998). The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. J Biolog Chem. 273(48):32347-32352

Gerry R, Kwei S, Bayer L, Breuing KH (2007). Silverimpregnated vacuum assisted closure in the treatment of recalcitrant venous stasis ulcers. Ann Plast Surg. 59(1):58-62

Goebeler M, Roth J, Teigelkamp S, Sorg C (1994). The monoclonal antibody MAC 387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP 14. J Leukocyte Biology. 55(2):259-260

Golinski P A, Zöller N, Kippenberger S, Menke H, Bereiter-Hahn J, Bernd A (2009). Entwicklung eines transplantierbaren Hautäquivalentes auf Basis von Matriderm[®] mit menschlichen Keratinozyten und Fibroblasten. Handchir Mikrochir Plast Chir. 41(6):327-332

Greenhalgh DG (2005). Models of wound healing. J Burn Care Rehabil. 26(4):293-305

Grotheer V (2012). In vitro Untersuchungen der biologischen Effekte von Kieselgel-Wundauflagen auf relevante physiologische Parameter der Wundheilung. Dissertation Düsseldorf

Hunt TK Hopf HW (1997). Wound healing and wound infection. What surgeons and anaesthesiologists can do. Surg Clin North Am. 77(3):587-606

Kim J, Park J, Lee S, Park N (2013) Split-Thickness Skin Grafting with Meshed Matriderm[®] in Burn Wound Management. J Korean Burn Soc 16(1):30-34

Konttinen YT¹, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainola M, Li TF, Virtanen I, Liljestrom M, Sakai H, Kobayashi Y, Sorsa T, Lappalainen R, Demulder A, Santavirta S (2001). Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. J Bone Miner Res. 16(10):1780-1786

Lauer M (2006). Untersuchungen zum Einfluss von thrombozytären Wachstumsfaktoren auf den zellvermittelten Abbau eines nanopartikulären Knochenersatzstoffes auf Hydroylapatitbasis. Dissertation Gießen

Marshall M (1979). Induktion of chronic diabetes by streptozotocin in the miniature pig In: Res Exp Med (Berl). 175(2):187-196

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

Moor N, Vachon DJ, Gould LJ (2009). Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. Wound Repair Regen. 17(6):832-839

Mostow EN (1994). Diagnosis and classification of chronic wounds. Clin Dermatol. 12(1):3-9

Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O (2006). Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis. Plast Reconstr Surg 117(7Suppl):35S-41S

Öztürk F, Ermertcan AT (2011). Wound healing: a new approach to the topical wound care. Cutan Ocul Toxicol. 30(2):92-99

Patent Glaubitt W, Thierauf A, Kursawe M (1997) Biologisch degradierbare und/oder biologisch resorbierbare (Endlos)Fasern, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Verstärkungsfasern. DE 19609551C1

Patent Baecker I, Suscheck C, Ulrich M, Boekema B (2011). Siliciumhaltiges, biologisch degradierbares Material zur pro-angiogenetischen Therapie. PCT/EP2011/052561

Pragnell J, Neilson J (2010). The social and psychological impact of hard-toheal wounds. Br J Nurs. 19(19):1248-1252

Probst J (2004). Amorphous silica gel fibers for tissue engineering of human cartilage cells. Conference Proceedings "Strategies in Tissue Engineering". Juni 17-19 2004 Würzburg, Deutschland

Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R (2005). Regulation of tumorangiogenesis by thrombospondin-1 Biochim and Biophys Acta 1775(2):178-188

Robson MC, Stenberg BD, Heggers JP (1990). Wound healing alterations caused by infection. Clin Plast Surg. 17(3), 485–492

Rüttermann M (2013). Lokaltherapie chronischer Wunden: Bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, chronisch-venöser Insuffizienz und Diabetes mellitus. Dtsch Arztebl Int 2013. 110(3):25-31

Schmidt M (2010). Der Einfluss des Apothekers auf die Therapie chronischer Wunden. Dissertation, Marburg

Schmierer B, Hill CS (2007). TGFß-SMAD signal transduction: molecular specify and functional flexibility. Nat Rev Mol Cel Biol. 8(12): 970-982

Sedlarik K Piatek S, Lippert H (1998). Wunde und Wundbehandlung Praxis der Chirurgie; Allgemein- und Viszeralchirurgie; Thieme Verlag Stuttgart

Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 341(10):738-746

Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P (2001). The pig as a model for human wound healing. Wound Repair Regen. 9(2):66-76

Tseliou E, Reich H, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Liu W, Marbán E (2014). Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and TGF- β signaling.Basic Res Cardiol.109(6):443.

Voggenreiter G, Dold C (2009). Wundtherapie. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart

Wang JF, Olson ME, Reno CR, Wright JB, Hart DA (2001). The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology and bacteriology of the healing process. Comp Med. 51(4):341-348

Webster J, Osborne S (2007). Preoperative bathing or showering with skin antiseptics to prevent surgical site infection. Cochrane Database Syst Rev. 18;(2):CD004985

7. Anhang

7.1 Danksagung

Für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit danke ich zutiefst Prof. Dr. med. Lars Steinsträßer. Seine Motivation, seine Unterstützung und sein unermüdlicher Einsatz für die Wissenschaft sind mir eine große Hilfe gewesen und bleiben für mich ein einmaliges Vorbild.

Ich danke ausdrücklich Dr. phil. nat. Frank Jacobsen, der mir mit intensiver Betreuung, tatkräftiger Hilfe und sehr effektiver und hilfreicher Kommunikation weit über das Thema hinaus die Unterstützung leistete, die letztlich zur Fertigstellung dieser Arbeit führte.

Herzlichst danke ich der Biologisch Technischen Assistentin Cand. med. Andrea Rittig. Sie unterstützte mich auf allen erdenklichen Ebenen, im Labor wies sie mich in die notwendigen Arbeitsschritte und in die Handhabung der Geräte ein, in Fragen der Organisation hat sie stets gewinnbringende Ideen, und in hektischen Situationen brachte sie die nötige Ruhe ein, um ein produktives Fortkommen zu ermöglichen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.-U. Steinau für die Gelegenheit, an der von ihm geleiteten Abteilung für Plastische Chirurgie und Schwerbrandverletzte im Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Für die entgegengebrachte kameradschaftliche Unterstützung sei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie und Wundheilung im Klinikum Bergmannsheil Bochum gedankt. Exemplarisch möchte ich namentlich nennen: Dr. rer. nat. Mustafa Becerikli, Dr. rer. nat. Matthias Schulte, Cand. med. Maximilian Kückelhaus und Cand. med. Ursula Kraneburg. Die freundschaftliche und konstruktive Arbeitsatmosphäre war mir eine große Hilfe, die es mir ermöglichte, die Arbeiten auch mit Freude durchzuführen.

Ich danke Tatijana Vrbančić aus der Abteilung Pathologie für das Anfertigen unendlich vieler histologischer Schnitte.

Ich danke Monika Wolf für die spontane Hilfe bei typographischen und orthographischen Schneidearbeiten.

Ich danke meinen Eltern, die mir mit moralischer, materieller und pädagogischer Unterstützung die notwendigen Grundlagen für die Arbeit verschafften. Ohne sie hätte ich es nicht geschafft. Auch meinen Schwiegereltern sei mein großer Dank für Unterstützungen in allen Lebenslagen ausgedrückt.

Besonders meinen guten Kindern spreche ich auch an dieser Stelle ausdrücklich meine Liebe und meine Anerkennung aus. Sie haben mit Geduld und Entbehrungen ihren Beitrag geleistet, sodass diese Arbeit gelingen konnte.

Vor allem danke ich meiner geliebten Frau Eva, die es immer wieder schafft, mich zu motivieren, mich voranzubringen und mit mir erfolgreich zu sein.

Vielen Dank Euch allen!

7.2 Erklärung

Diese Studie wurde initiiert und unterstützt von der Bayer AG. Persönlich habe ich keine Geld- oder Sachmittel erhalten. Die Materialien, die in dieser Studie verwendet wurden, wurden teilweise mit Mitteln der Firma Bayer finanziert. Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit "Untersuchungen zur Wundheilung unter Verwendung von Wundauflagen aus Polyhydroxykieselsäureethylester" selbstständig erstellt habe und mich anderer Hilfsmittel außer der in der Arbeit angegebenen nicht bedient habe. Insbesondere haben Entlehnungen aus Schriften nicht stattgefunden, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind.

7.3 Lebenslauf

Am 19.03.1973 in Dortmund geboren

1993, Juni:	Abitur an der Heinrich-Böll-Gesamtschule in Dortmund
1993, Juli:	Eintritt in die Bundeswehr
1994, Oktober:	Medizinstudium an der Gesamthochschule Essen
2000, Oktober:	Staatsexamen im Alfried-Krupp-Krankenhaus Essen
2000, November:	Arzt im Praktikum im Bundeswehrkrankenhaus Hamm in
	den Abteilungen Chirurgie und Innere
2003, März:	Truppenarzt, Fliegerarzt und Staffelchef in der
	Sanitätsstaffel Schortens
2005, März:	Facharzt f. Allgemeinmedizin, Ärztekammer Niedersachsen
2008, April:	Truppenarzt, Leiter Behandlung und Begutachtung im
	Sanitätszentrum Ahlen
2014, Juli	Hausarzt in Waltrop