Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Der Einfluss von Antibiotika und Antiseptika auf das *in vitro* Migrationsverhalten von humanen Fibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt von

> Lena Rossaint 2014

"Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf"

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Stoecklein Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Lögters

Zusammenfassung

Chronische Wunden sind vor allem in den westlichen Industrienationen mit großen medizinökonomischen Problemen verbunden. Einen wichtigen Beitrag zum Ablauf der Wundheilung wird von Fibroblasten geleistet.

Obwohl der routinemäßige Einsatz von Antibiotika in der Behandlung der meisten chronischen Wunden ohne Vorliegen einer akuten Infektion nicht unterstützt werden kann, erhalten mehr als die Hälfte aller Patienten mit chronischen Wunden diese Therapeutika.

Der Einfluss von Antibiotika auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten wurde bisher noch nicht untersucht. Mit der vorliegen Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und in wie weit die am häufigsten bei chronischen Wunden eingesetzten Antibiotika die Fibroblastenmigration beeinflussen. Als Migrationsmodell wurde hierfür der *Fence Assay* verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass Antibiotika die Fibroblastenmigration und -proliferation variabel beeinflussen. So kam es unter Penicillin/Streptomycin in einer 1,5- bzw. 10-fachen in vivo Serumspitzenkonzentration, unter Vancomycin und unter Ciprofloxacin zu einer statistisch signifikanten Hemmung des Fibroblastenverhalten (p<0,05). Während es unter Ampicillin/Sulbactam, Cefuroxim, Clindamycin und Metronidazol zu keiner signifikanten Beeinflussung des Fibroblastenverhaltens kam (p>0,05), zeigten die Fibroblasten unter Moxifloxacin sogar eine gesteigerte Migration und Proliferation (p<0,05). Neben Antibiotika wurden auch Antiseptika und nutritive Faktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Fibroblasten untersucht. Alle getesteten Antiseptika führten zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Fibroblastenmigration und -proliferation (p<0,05). Fehlten nutritive Faktoren analog der häufig bei Patienten mit chronischen Wunden vorkommenden negativen Stickstoffbilanz und des Serumproteinmangels in Form von fötalem Kälberserum (FCS) während des Fence-Assays, kam es zu einer starken Behinderung von Fibroblastenmotilität und -wachstum (p<0,05). Auch erhöhte Glukosekonzentrationen im Medium 4,5g/l vs. 1g/l Glukose), wie sie beispielsweise bei Diabetes mellitus in vivo vorkommen können, führten zu einer herabgesetzten Migration und Proliferation (p<0,05).

Die vorliegenden Daten weisen damit darauf hin, dass Antibiotika in der Therapie einer Wundheilungsstörung nicht unkritisch eingesetzt werden sollten, da die vorliegenden Daten nahelegen, dass einige Antibiotika einen negativen Effekt auf Motilität/Proliferation von Fibroblasten haben und damit direkt den Wundheilungsprozess stören könnten.

Inhaltsverzeichnis 1 Einleitung

1.1 Physiologie der Wundheilung und Pathophysiologie der chronischen Wunde	1
1.2 Therapie der chronischen Wunde	6
1.3 Übersicht über die häufigsten Migrationsmodelle	7
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	10

2 Material & Methoden

2.1 Zellkultur	11
2.1.1 Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten des Menschen aus	
kindlichem Vorhautgewebe	11
2.1.2 Passagieren von angezüchteten Fibroblasten	12
2.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten	13
2.1.4 Auftauen von Zellen	13
2.1.5 Bestimmung der Zellzahl	14
2.2 Fence Assay Migrationsversuch	14
2.2.1 Bestimmung der Zellrasen-Fläche	18
2.3 Statistische Methoden	19

3 Ergebnisse

3.1 Antibiotika	21
3.2 Antiseptika	26
3.3 Nutritive Faktoren	28
4 Diskussion	30
5 Zusammenfassung/Schlussfolgerung	41
6 Literaturverzeichnis	44

1. Einleitung

Chronische Wunden und ihre Therapien stellen ein enormes medizinökonomisches Problem dar. In den westlichen Industrienationen leidet ca. 1-2% der Bevölkerung an dieser Erkrankung. Die Inzidenz steigt jedoch mit zunehmendem Lebensalter weiter an, so dass sie in der Gruppe der über 80-jährigen bei 4-5% liegt [1-3]. In der Bundesrepublik Deutschland sind laut Erhebungen des statistischen Bundesamtes vom Dezember 2002 sogar 4,5-5 Millionen Menschen von chronischen Wunden betroffen. Die direkten Kosten für die medizinische Behandlung betragen in Deutschland etwa 4-4,5 Milliarden Euro pro Jahr [4]. Aufgrund der demografischen Entwicklung einer immer älter werdenden Bevölkerung kann davon ausgegangen werden, dass diese Zahlen aufgrund der mit dem Alter steigenden Morbidität noch erheblich ansteigen werden.

1.1 Physiologie der Wundheilung und Pathophysiologie der chronischen Wunde

Während einer physiologischen Wundheilung kommt es bei überlappend oder synchron verlaufender Entzündungs-, Proliferations- und Umbauphase zum Verschluss des Gewebedefektes (Abb.1) [5]. Im Falle einer Verletzung kommt es unmittelbar durch plasmatische und zelluläre Gerinnungskaskaden zur Hämostase. Es folgt eine Entzündungsreaktion mit Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Vor allem während der Proliferationsphase spielen die Fibroblasten eine wichtige Rolle: Sie migrieren vom umgebenden Gewebe zum Ort der Wunde, werden dort aktiviert und beginnen mit der Kollagenbildung. Hierdurch tragen diese Zellen wesentlich zur Bildung von Granulationsgewebe bei [6]. Ihre Signale erhalten die Fibroblasten durch von Blutplättchen und Makrophagen ausgeschütteten platelet-derived growth factor (PDGF) und epidermal growth factor (EGF). Fibroblasten, die sich bereits am Ort der Wunde befinden, verwandeln sich in Myofibroblasten, die für die Kontraktion der Wunde verantwortlich sind. Diese weisen eine geringere Proliferationsrate auf, als Fibroblasten, welche aus Gewebe, das die Wunde umgibt, rekrutiert werden [7]. Als Reaktion auf PDGF synthetisieren die Fibroblasten am Ort der Verletzung eine vorläufige Matrix bestehend aus Kollagen Typ III, Gylcosaminoglycanen und Fibronectin [8]. Die verstärkte Kollagensynthese, welche für mindestens 4-5 Wochen anhält, kommt zum einen durch die erhöhte Anzahl an Fibroblasten am Ort der Wunde und zum anderen durch eine erhöhte Syntheseleistung pro Zelle zu Stande [9, 10]. Des Weiteren kommt es während der Proliferationsphase zur Neubildung von Blutgefäßen und zur Epithelisierung. Während der Umbauphase, die bis zu einem Jahr andauern kann, wird das zunächst dünne und parallel zur Haut orientierte Kollagen wieder abgebaut und durch dickeres, verzweigtes Kollagen ersetzt [7].



Zeitpunkt der Verletzung

Abb. 1. Physiologie und zeitlicher Ablauf der Wundheilung: Sofort nach einer Verletzung kommt es in der Entzündungsphase während der nächsten 4-6 Tage zur Hämostase, Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Überlappend beginnt die Proliferationsphase, die bis ca. 14 Tage nach Verletzung andauert. Die Umbauphase, die ca. ab dem 8. Tag beginnt und als Ziel hat, den Ursprungszustand wiederherzustellen, kann bis zu einem Jahr andauern.

Die Komplexität der Wundheilung macht die Heilungsmechanismen anfällig für Störungen auf den unterschiedlichen Ebenen – Entzündung, Proliferation und Umbau. So können lokale oder systemische Faktoren die physiologische Antwortreaktionen oder Zellfunktionen während der Wundheilung beeinflussen (Abb. 2).

Zeitpunkt der Verletzung



Abb. 2. Lokale Faktoren, die die Wundheilung stören und ihre primären Angriffspunkte: Fremdkörper und erhöhter Druck verlängern insbesondere die Entzündungsphase. Sauerstoffmangel, ein erniedrigter pH- und Temperaturwert wirken sich vor allem negativ auf die Proliferationsphase aus. Sowohl eine zu niedrige als auch eine zu hohe Glukosekonzentration sind schlecht für die Proliferation. Infektionen behindern sowohl Entzündungs- als auch Proliferationsphase.

Die inflammatorische Phase kann durch lokale Infektionen und Fremdkörper verlängert nicht eindeutig geklärt ist, welche werden. Obwohl Rolle Bakterien bei der Wundheilungsstörung spielen [11], scheint nicht nur die Verlängerung der Entzündungsphase, sondern auch eine veränderte Epithelisierung, Wundkontraktion und Kollageneinlagerung verursacht durch bakterielle Kolonisation eine zusätzliche Störung der normalen Wundheilung zur Folge zu haben [6]. Endotoxine können die Phagozytose und die Freisetzung von Kollagenasen, welche den Abbau von Kollagen zur Folge haben, stimulieren. Zusammen mit einer Ischämie kann die Makrophagen-stimulierte Fibroblastenproliferation gehemmt werden [12]. Fremdkörper – wozu auch nekrotische Gewebe gehören - sind physikalische Hindernisse für die Wundheilung und können als Asyl für Bakterien dienen. Des Weiteren können die Wunden nicht regelrecht kontrahieren, rekapillarisieren und komplett epithelisieren. Wunden mit nekrotischem Gewebe werden nicht heilen, bis das gesamte nekrotische Gewebe entfernt ist [13].

Vor allem während der Proliferationsphase wird durch einen erhöhten Metabolismus eine große Menge an ATP gebraucht, die nur durch eine ausreichende Blutversorgung und damit Zufuhr von Sauerstoff und Glukose bereit gestellt werden kann. Kommt es zu Druck auf das verwundete Gewebe, so können Kapillaren durch die interstitielle Druckerhöhung komprimiert werden, was letztlich zur Hypoxie führen kann. Erhöhter Druck kann entweder von außen oder von innen – in Form von Ödemen – auf das Gewebe ausgeübt werden.

Sowohl Hypoxie, niedriger pH, niedrige Temperatur als auch eine herabgesetzte oder stark erhöhte Glukosekonzentration haben das Potential den Heilungsprozess zu verlangsamen oder zu stoppen [14, 15].

Zu den systemischen Faktoren, die sich negativ auf die Wundheilung auswirken, zählen Übergewicht, kardiovaskuläre Erkrankungen mit Beeinflussung der Gewebedurchblutung, respiratorische Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Blutoxygenierung, metabolische und endokrine Erkrankungen, Nieren – und Leberversagen [16].

Dabei beeinträchtigt Diabetes mellitus die Heilung gleichzeitig auf metabolische, vaskuläre und neuropathische Art und Weise. Traditionell wurden die Diabeteskomplikationen den mikrovaskulären, okklusiven Folgen der andauernden Hyperglykämie zugeschrieben. Neuere Studien konnten dies allerdings nicht unterstützen [17]. So akkumuliert Sorbitol, ein toxisches Nebenprodukt des Glukosemetabolismus, in Geweben und ist dort für viele Komplikationen verantwortlich [18]. Eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität der Haut kann der perikapillären Albuminablagerung zugeschrieben werden, die die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen behindert [17]. Auch die nichtenzymatische Glykosilierung beeinträchtigt die Funktion von strukturellen und enzymatischen Proteinen. So ist glykosiliertes Kollagen resistent gegenüber enzymatischem Abbau und schlechter löslich als das normale Proteinprodukt [18]. Experimentelle Studien an diabetischen Tiermodellen konnten eine herabgesetzte Granulation, einen verminderten Gehalt von Kollagen im Granulationsgewebe und Defekte in der Kollagenreifung zeigen [19]. Auch Studien an Menschen konnten die Ergebnisse stützen. So konnte eine langsame Wundreifung und eine herabgesetzte Anzahl an Fibroblasten beobachtet werden [18].

Kommt es während eines Wundheilungsprozesses zu den oben genannten, unterschiedlichen Störungen, so kann eine chronische, schlecht heilende Wunde entstehen [20]. Man versteht unter dem Begriff der chronischen Wunde eine mindestens 8 Wochen persistierende bzw. trotz intensiver Therapie nicht abheilende Wunde [21]. In mehr als 90% der Fälle liegt dabei eine systemische Grunderkrankung vor [20].

Die häufigsten Formen der chronischen Wunde sind das Ulcus cruris venosum, der Dekubitus und das diabetische Ulcus. Während eine Störung des venösen Abflusses zum Ulcus cruris venosum führt, kommt es durch eine erhöhte mechanische Belastung zum Dekubitus. Beim diabetischen Ulcus führen die bereits erwähnten vaskulären, nervalen und /oder metabolischen Gewebsschädigungen zur chronischen Wunde [20].

Zusätzlich sind chronische Wunden nahezu obligat mit fäkalen, oralen und dermalen Mikroorganismen besiedelt [22]. Man spricht hierbei von der sekundären Wundinfektion und grenzt diese damit von der primären Wundinfektion ab. Während im Falle der sekundären Wundinfektion eine bereits bestehende Wunde infiziert wird, sind traumatische Verletzungen, Bisswunden oder Stichverletzungen primär über die Abfolge Kontamination, Verschleppung der Erreger in die Tiefe und Infektion hochgradig infektionsgefährdet.

Auch ohne klinische Anzeichen findet man in der Mehrzahl der chronischen Ulzera mehr als eine Bakterienspezies [23]. Die am häufigsten isolierten Erreger aus chronischen Wunden sind Staphylococcus aureus und Koagulase-negative Staphylokokken, gefolgt von Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli [24, 25]. Des Weiteren kommen Enterocobacter cloacae, Klebsiellen-, Streptokokken-, Enterokokken- und Proteus-Spezies vor [26]. Die meisten Studien zeigen, dass häufig Mischinfektionen mit mehreren Keimen vorliegen [24, 27]. So liegt die durchschnittliche Anzahl an Bakterienspezies innerhalb einer Wunde zwischen 1,6-4,4 [28].

Das Vorhandensein von Bakterien in einer Wunde ist nicht gleich zu setzten mit einer Infektion der Wunde. Vielmehr unterscheidet man die Kontamination und die Kolonisation, welche die Wundheilung nicht stören sollen, von der kritische Kolonisation und der Infektion [29]. Während bei der Kontamination ausschließlich Bakterien vorliegen, die sich aber nicht vermehren, replizieren die Erreger im Falle einer Kolonisation. Liegt eine kritische Kolonisation der Wunde vor, so beginnt die Heilung - je nach zu Grunde liegender Wundpathogenese – beeinträchtig zu werden [29, 30]. Kommt es zur Infektion, d.h. neben der Kolonisation findet man eine purulente Sekretion oder das Vorhandensein von 2 oder mehr Entzündungszeichen (Erythem, Überwärmung, Schmerzen, Schwellung, eingeschränkte Funktion), führt dies zur Wundheilungsstörung [31, 32].

Allerdings geht man ab einer kritischen Bakterienbesiedlung von 10⁵ Bakterien pro Gramm Gewebe dennoch davon aus, dass es auch ohne Infektion zu einer Inhibierung der Wundheilung kommt [33, 34].

1.2 Therapie der chronischen Wunde

Die Therapie der chronischen Wunde greift zeitgleich an unterschiedlichen Punkten an. So ist neben der Wundreinigung, der Regulation des Feuchtigkeitsgleichgewichts und der Förderung der Reepithelisierung auch die Entzündungs- und Infektionskontrolle mittels systemischer Antibiotikagabe und ggf. Verwendung von lokalen Antiseptika ein häufig praktizierter, jedoch unzureichend Evidenz-basierter Therapieansatz [1, 35]. O'Maera et al. kommen in ihrem *Review* zu dem Ergebnis, dass der routinemäßige Einsatz von Antibiotika in der Behandlung vom Ulcus cruris und dem diabetischen Fußulkus ohne Vorliegen einer akuten Infektion nicht unterstützt werden kann [35]. Dennoch erhalten mehr als die Hälfte aller Patienten mit chronischen Wunden diese Therapeutika [11, 36].

Zahlreiche Empfehlungen zur Verwendung oder Vermeidung von Antibiotika in der Therapie der chronischen Wunde basieren auf Expertenmeinungen. Dabei spielt vor allem die Ätiologie des Ulkus eine entscheidende Rolle. Die Entscheidung zur Antibiotikatherapie beim diabetischen Fußulkus wird früh getroffen [37], da die Gefahr der Amputation besteht. Einige Experten empfehlen die Gabe sogar ohne Zeichen einer Infektion [38].

Bei Ulcus cruris venosum wird jedoch lediglich bei Infektsymptomen antibiotisch behandelt [32].

Kommt es ausgehend von der chronischen Wunde zu Komplikationen, wie einer Zellulitis, Lymphangitis oder Phlegmone, ist die systemische Antibiose unbedingt indiziert [39].

Da zum Zeitpunkt der initialen Antibiotikagabe zumeist noch keine genauen Angaben zum Erregerspektrum in der Wunde gemacht werden können, wird empirisch entsprechend der am häufigsten vorkommenden Pathogene behandelt. Als Breitbandantibiotika werden unter anderem Betalactamantibiotika wie Ampicillin/Sulbactam, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefuroxim und Vancomycin, Gyrasehemmer wie Moxifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin, Lincosamidantibiotika wie Clindamycin und Nitroimidazolantibiotika wie Metronidazol empfohlen [40].

Es ist bereits bekannt, dass viele desinfizierend wirkende Substanzen die Zellproliferation und damit die Resynthese von Ersatzgewebe hemmen [41-43]. Dies hat zur Folge, dass man Desinfizienzien zum einen erst nach Auswahl möglichst gering hemmender Substanzen und zum anderen zumindest vorrangig bei nur stark besiedelten Wunden verwenden sollte [1]. Damour et al. testeten 1992 die Zytotoxität von verschiedenen Antiseptika und Antibiotika. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass alle gestesteten Antiseptika bei therapeutischen Konzentrationen für Fibroblasten und Keratinozyten zytotoxisch waren. Die untersuchten Antibiotika jedoch zeigten unter therapeutischen Konzentrationen keine Zytotoxität [41].

Thomas et al. konnten 2009 mittels eines Proliferations- und Fibroblastenmigrationsmodells zeigen, wie unterschiedliche Antiseptika die Proliferation und Migration von Fibroblasten beeinflussen [43]. Thomas et al. verwendeten für ihre Analyse den *Scratch-Assay*, eine von mehreren möglichen Methoden zur Untersuchung der Fibroblastenmigration.

1.3 Übersicht der üblichen Migrationsmodelle

Spezialisierte Zellen, wie Leukozyten, Fibroblasten und Stammzellen, besitzen die Fähigkeit zur autonomen Migration und erfüllen damit physiologische Funktionen. Aber auch Tumorzellen haben die Fähigkeit zur selbstständigen Migration errungen, welches ein wichtiges pathologisches Prinzip dieser Zellen darstellt. Gerade mit diesem Hintergrund kam und kommt der Zellmigration eine besondere Aufmerksamkeit in der Forschung zu. So wurden zahlreiche Methoden zur Analyse der Zellmigration entwickelt. Sie reichen von *in vitro*, 2-dimensionalen Oberflächen- bis hin zu hoch spezialisierten 3-dimensionalen und intravitalen Modellen.

Am häufigsten werden jedoch auf Grund ihrer Komfortabilität bezüglich der hohen Zelldurchlaufrate die 2-dimensionalen Oberflächen-*Assays* verwendet, die damit eine hohe statistische Reliabilität aufweisen.

Dabei werden Zellen auf eine blanke oder mit einer Matrix beschichteten Glas- oder Plastikoberfläche aufgebracht (Abb.3, A). Häufig verwendete Matrixkomponenten sind dabei Kollagen Typ I oder IV, Fibronectin, Laminin oder Hyaluronsäure [44-46]. Die Migration kann dann als Zellbewegung von A nach B, oder als Surrogat-Parameter in Form von Zellpolarisation oder Ausbildung von Pseudopodien, beurteilt werden [47].

Ein modifiziertes 2D-Migrationsmodell stellt sowohl der *Scratch Assay*, welcher einem Wundheilungsmodell entspricht, als auch der *Fence Assay*, dar. Beim *Scratch Assay* werden konfluente Zelloberflächen auf Petri-Schalen oder Kulturflaschen "verletzt", indem mit einem Gegenstand, wie einer Pipettenspitze, einer Spritzennadel oder elektrischem Strom, die konfluente Oberfläche zerstört wird [48]. Abhängig vom Zelltyp, den äußeren Bedingungen und dem Ausmaß des "Kratzers" heilt die Wunde innerhalb der nächsten Stunden bis Tagen. Als Rate der Zellbewegung wird die Migration gewöhnlich durch Bestimmung der Annäherung der Wundkanten, des Rekolonisationsbereiches oder durch Auszählung der Zellen jenseits der Wundgrenzen ermittelt [49-52]. Um dieses Modell reproduzierbar zu machen und

quantitative Messungen vornehmen zu können, wurden unterschiedliche Aspekte, wie beispielsweise das Setzen der "Verletzung", automatisiert [48].

Das *Fence* oder Ring- Versuchssystem arbeitet mit wieder verwendbaren 16mm-Edelstahl-Silikon-Einsätzen (*'fences'*) für 24-well-Zellkulturplatten, die den eingesetzten Zellen erlauben, nur innerhalb eines umschriebenen Areals zu adhärieren. So steht bei Versuchsstart ein Zellrasen von definiertem Durchmesser zur Verfügung [53]. Die Fläche, die die Zellen nach Ablauf des Versuchs eingenommen haben, kann visuell vermessen und berechnet werden und nach Abzug der bei Versuchsstart eingenommen Fläche, erhält man Informationen über das Ausmaß der Fibroblastenmigration.

Eine weitere Möglichkeit Zellmigration zu untersuchen, stellen Filter-*Assays* dar. Hierbei müssen Zellen, die sich in einer oberen Kammer befinden, durch Poren mit definiertem Durchmesser einer Filtermembran, in eine untere Kammer migrieren (Abb.3, B). Die Porengröße muss dabei so klein gewählt werden, dass ein passives Durchtreten unmöglich ist. Die Migration wird entweder durch Auszählen der Zellen auf der Unterseite der Membran nach 3 Stunden oder durch Bestimmung der Zellzahl in der unteren Kammer nach 6 Stunden bestimmt [47].

Dieses Modell ist besonders für die Untersuchung und Diskriminierung zwischen Chemotaxis – Beeinflussung der Bewegungsrichtung durch einen Stoff - und Chemokinetik – Beeinflussung der Bewegungsgeschwindigkeit durch einen Stoff – geeignet [54].

Während 2D Modelle und Filter-*Assays* hauptsächlich für *Screenings* Anwendung finden, sind die dreidimensionalen *Assays* mit ihrem komplexen Versuchsaufbau zur Untersuchung solcher Hypothesen ungeeignet. Vielmehr spielen sie eine Rolle bei der Frage nach einer Migration per se. Prinzipiell werden bei 3D-Modellen die zur Frage stehenden Zellen in einer komplexen Matrix eingebettet und kontinuierlich mittels Zeitraffung-Videomikroskopie beobachtet (Abb.3, C).



Abb. 3. Migrationsassays; A: 2D-Oberflächen-Assay (inklusive Scratch- und Fence-Assay): Zellen migrieren ungerichtet auf einer blanken oder beschichteten Oberfläche; B: Filter-Assay: Zellen bewegen sich durch die Wirkung eines chemotaktischen Stoffes gerichtet von einer oberen Kammer durch eine poröse Membran in eine untere Kammer; C: 3D-Matrix-Assay: die Bewegung von Zellen, die in einer komplexen Matrix eingebettet sind, wird mittels Videomikroskopie beobachtet

Bevor eine Untersuchung zur Zellmigration beginnen kann, müssen die Vor- und Nachteile der einzelnen Modelle für die zu klärende Fragestellung abgewogen werden, um den passenden *Assay* auswählen zu können. Bei der Mehrheit der *Assays* wird nur der Start- und Endpunkt der Migration untersucht, aber nicht die Zwischenstadien. Deshalb muss vor Auswahl des richtigen *Assays* geklärt sein, ob das Verhalten während der Migration einen wichtigen Anteil an der Fragestellung beinhaltet oder ob – wie beispielsweise bei dem Zweck eines Screenings - Endpunkte ausreichend sind. Spielen Chemotaxis und Chemokinetik eine Rolle, so ist der Versuchsaufbau als Filter-*Assay* vor allem bei sich sehr langsam bewegenden Zellen mit einem höheren Grad an Komplexität verbunden [47].

Vor allem beim *Scratch-* und *Fence- Assay* muss darauf hingewiesen werden, dass nicht nur die Migration, sondern vielmehr die Kolonisations- oder Rekolonisationsfähigkeit beobachtet wird. Diese besteht neben der Migration auch aus der Komponente "Wachstum" und sollte bei Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden [55]. Zahm et al. konnten mit ihren Versuchen zu *in vitro* Wundheilungsmodellen an Respirationsepithel nachweisen, dass nach Setzen einer chemischen Wunde neben der die ersten 3 Tage konstant aufgetretenen Zellmigration, die mitotische Aktivität 48h nach Verletzung ihren Gipfel erreichte [55].

Wie zuvor angesprochen, bieten sich die 2-dimensionalen Oberflächen-*Assays* – in Form des *Scratch*- und *Fence Assays* - auf Grund ihrer hohen statistischen Reliabilität insbesondere für *Screenings* bei Migrationsuntersuchungen an.

Ein Vorteil des *Fence Assays* gegenüber dem *Scratch Assay* ist die bessere Reproduzierbarkeit und leichte digitale, standardisierte Auswertung. Als überlegene wissenschaftliche Methode wurde der *Fence Assay* daher für die hier zu untersuchende Fragestellung ausgewählt.

1.5 Fragestellung

Wie bereits erwähnt konnten Damour et al. für die von ihnen untersuchten Antibiotika keine Zytotoxität feststellen [41]. Allerdings beschäftigte sich diese Arbeitsgruppe nicht mit dem Einfluss der Antibiotika auf die Fibroblastenmigration. Thomas at al. wiederum zeigten für einen Teil der Antiseptika eine Hemmung der Fibroblastenmigration [43], analysierten jedoch ebenfalls nicht den Einfluss der Antibiotika auf die Fibroblastenmigration.

Bis heute fehlen systematische Untersuchungen, die klären ob und, wenn ja, in wieweit Antibiotika die Fibroblastenmigration und -proliferation und damit die Resynthese von Ersatzgewebe hemmen. Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher in einem reliablen und objektivem *in vitro* Fibroblastenmigrationsmodell – dem *Fence Assay* - untersucht werden, ob und in wie weit auch die am häufigsten bei chronischen Wunden eingesetzten systemischen Antibiotika die Fibroblastenmigration und -proliferation und damit einen wesentlichen Teil der Wundheilung beeinflussen.

2. Material und Methoden

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen zum Fibroblastenmigrations- und proliferationsverhalten in Abhängigkeit von den am häufigsten verwendeten Antibiotika bei chronischen Wunden wurde der Fence-Assay angewendet. Er ist besonders geeignet zum Screening, aber ungeeignet zur Beobachtung von Chemotaxis und -kinesis. Auch die Migration als solche, die vorzugsweise mittels 3D-Assays analysiert wird, steht bei der Fragestellung der antibiotikaabhängigen Migration nicht im Vordergrund. Das Fence Versuchsystem ist geeignet, um die Expansion von Zellmonolayern 'großer' Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten zu untersuchen. Durch relativ geringen Zell-, Raum- und Zeitaufwand ermöglicht es gleichzeitig viele parallele Versuchsansätze. Das System wird weltweit eingesetzt, um die Monolayerexpansion (Migration und/oder Proliferation) unter dem Einfluss von körpereigenen Substanzen und Pharmaka und/oder auf definierten Oberflächen zu untersuchen [56]. Es besteht die Möglichkeit zwischen Proliferation und Migration zu unterscheiden, indem die Zellen direkt nach Versuchsansatz mit 15-25 Gy (1500-2500 rad) bestrahlt werden, oder den Ansätzen ein Toxin (z.B. 10-20 µg/ml 5-Fluorouracil; laut Literatur bis zu 100 µg/ml) zugesetzt wird, um eine Proliferation zu unterbinden [56]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt, so dass hier nicht ausschließlich das Migrations-, sondern vielmehr das Kolonisationsverhalten untersucht wurde. Unter Zugabe von unterschiedlichen Antibiotika oder Antiseptika kann das Ausmaß der Migration und Proliferation nach Versuchende beobachtet werden, in dem die Zellen fixiert, gefärbt und im Anschluss visuell vermessen werden.

2.1 Zellkulturmethoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Thermo Sterilbank, Electron corporation Hera Safe, Heraeus).

Die Kultur erfolgte im Brutschrank (Hera cell, Heraeus) bei 37°C, unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.1.1 Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten des Menschen aus kindlichem Vorhautgewebe

Die verwendeten Fibroblasten wurden aus humanem Hautgewebe isoliert und kultiviert. Dazu wurden zunächst primäre Fibroblastenkulturen erzeugt, indem Fibroblasten aus Hautpräparaten ausgewachsen sind. Diese primären Kulturen haben ihren Ursprung nicht in einer einzelnen Fibroblastenzelle, sondern entstehen durch Proliferation mehrerer Zellen, die im Gegensatz zu Zelllinienfibroblasten einen normalen, diploiden Chromosomensatz aufweisen [57]. Für den *Fence-Assay* wurden aktiv proliferierende Zellen sekundärer Fibroblastenkulturen verwendet, die durch Expansion und Passagierung der primären Kulturen entstanden sind.

Zur Anzucht von Fibroblasten aus humanem Vorhautgewebe wurden Hautpräparate verwendet, die zuvor während urologischen Operationen als Restmaterial gewonnen werden konnten. Die erhaltenen Hautpräparate wurden weder für diagnostische noch andere klinische Zwecke verwendet und wären ansonsten verworfen worden. Gegen die Verwendung der Proben und das experimentelle Vorgehen gab es seitens der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf keine Bedenken.

Das Gewebe wurde spätestens 24 h nach Gewinnung zur Anzucht weiterverarbeitet. Bis dahin wurde es bei 4° C gelagert.

Für die Anzucht wurden die Hautstücke zunächst in Betaisodona (Mundipharma GmbH) und anschließend in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) gereinigt. Danach wurden die Präparate – falls nötig - mittels einer Schere entfettet. Es erfolgte ein weiterer Waschschritt in Betaisodona und PBS. Anschließend konnten die Präparate mittels Skalpell in 2x3mm große Stücke geschnitten werden.

Jeweils 3-4 Hautstücke wurden pro T-25- Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner Bio One) ausgelegt. Im Inkubator erfolgte die Adhäsion der Hautstücke an den Flaschenboden zunächst ohne Medium für ca. 12 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Präparate mit 3 ml Anzuchtmedium umspült. Das Anzuchtmedium bestand aus 500 ml DMEM+4,5g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvate (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 50ml FCS (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 50.000µg Streptomycin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 50.000 *units* Penicillin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe). Das FCS wurde bei 4°C aufgetaut und anschließend für ca. 30 min. bei ca. 56° im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Ein Mediumwechsel fand alle 3 Tage statt. Sobald ausreichend Fibroblasten gewachsen waren, wurden die Hautpräparate entfernt, die Zellkolonien trypsiniert und die Zellsuspension zu gleichen Teilen in 3 Zellkulturflaschen ausgesät.

2.1.2 Passagieren von angezüchteten Fibroblasten

Das Umsetzen und Teilen der Zellen einer konfluenten T-25 bzw. T-75- Zellkulturflasche erfolgte in mehreren Schritten. Nach Abpipettieren (mittels Pipetboy Acu, IBS, Integra Bioscience und Eppendorf-Pipetten) des alten Mediums und zweifachen Waschen mit PBS folgte eine 8 minütige Inkubation (37° C) mit 1 ml (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 4 ml (T-75-

Zellkulturflasche) Trypsin – EDTA (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe). Durch Zugabe von 2 bzw. 6 ml Anzuchtmedium pro Zellkulturflasche wurde das Trypsin neutralisiert und die Reaktion beendet. Nach Überführung der Suspension in ein 15 bzw. 50 ml *Falcon Tube* (Becton Dickinson Labware), erfolgte eine Zentrifugation (Zentrifuge Universal 30 RF, Hettich Zentrifugen) bei 1500 U/min für 10 min. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zentrifugat in 10 bzw. 30 ml Fibroblasten-Kulturmedium resuspendiert. Das Kulturmedium bestand aus 500ml RPMI+GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 50ml FCS, 50.000µg Streptomycin und 50.000 units Penicillin.

Die Zellsuspension konnte im Anschluss auf eine bzw. drei T-75- Zellkulturflaschen verteilt werden. Nach jeder Teilung oder Umsetzung stieg die Passage um eins an. Das Fibroblasten-Kulturmedium wurde im Anschluss alle 3 Tage gewechselt. Einmal pro Woche erfolgte eine Teilung der Zellen. Bei Erreichen von Passage 10 wurden die Fibroblasten-Kulturen nicht weiter verwendet.

2.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten

Nach Anzucht der Fibroblasten aus humanem Gewebe wurden überschüssige Fibroblasten zur Langzeitaufbewahrung eingefroren, um sie bei Bedarf für den *Fence-Assay* bereitzustellen. Als Kryoprotektivum wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurden die Zellen einer zuvor konfluenten T-75-Zellkulturflasche in 2 ml Einfriermedium (DMEM+4,5g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvate 10% FCS, 50.000µg Streptomycin, 50.000 units Penicillin und 10% DMSO) resuspendiert und auf 2 Cryoröhrchen verteilt. In Styroporbehältern verblieben die Röhrchen für ca. 12h im -80°C Gefrierapparat, um eine langsame Abkühlung von ca. 1°C/min zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Cryoröhrchen zügig in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt.

2.1.4 Auftauen von Zellen

Da nach Erreichen von Passage 10 die Fibroblasten-Zelllinien nicht weiter verwendet wurden, erfolgte regelmäßig ein Auftauen von Zellen mit geringer Passagenzahl.

Dazu wurde der Inhalt der Cryoröhrchen rasch im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und in einer Falcon-Tube mit ausreichend Fibroblasten-Kulturmedium vermischt.

Nach 4-minütiger Zentrifugation der Zellen bei 1500 Umdrehungen/Minute wurde der Überstand entfernt und das Zellsediment in 10 ml Fibroblasten-Anzuchtmedium resuspendiert.

Die Suspension wurde in eine T-75-Zellkulturflasche überführt, wobei die Passage um eins anstieg. 24 Stunden nach dem Auftauen erfolgt der erste Mediumwechsel, um das noch restlich vorhandene DMSO zu entfernen.

Für den *Fence-Assay* wurden ausschließlich Zellen verwendet, die nach dem Auftauen ausreichend Zeit hatten sich zu erholen und einen normalen Teilungsrhythmus aufwiesen.

2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl während der Durchführung der verschiedenen Arbeiten wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewendet. Hierzu wurden in einem Well einer 96-*Well*-Platte 10 μ l der jeweiligen Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau versetzt. In einer Neubauer Zählkammer (Blaubrand, 0,0025mm²) wurden anschließend unter dem Mikroskop (WILVOVER A, hundWETZLAR) die vitalen Zellen (Trypanblau negative) in 4 Eckquadranten ausgezählt und der Mittelwert daraus gebildet. Die Zellzahl pro ml errechnet sich wie folgt: Mittelwert x 10.000 = Zellen / ml

2.2 Fence Assay Migrationsversuch

Der *Fence-Assay* Migrationsversuch besteht grundsätzlich aus zwei Teilen. Zunächst erfolgt das Adhärierien der Zellen innerhalb der zentralen Bohrungen der *Fences* (Aix Scientifics[®] CRO, Aix (Aachen)) während 16-18h. Erst danach folgt der eigentliche Versuch. Nach Entfernung der *Fences* erhielten die Fibroblasten die Möglichkeit innerhalb der kommenden 100-104 Stunden unter Zugabe des jeweiligen Stimulations- bzw. Kontrollmediums zu migrieren. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Versuch beendet, indem die Zellen fixiert und gefärbt werden.

Die Hälfte aller Versuche wurde mit jeweils zwei 24-*Well*-Platten durchgeführt. Hierbei handelte es sich bei einer Platte um die Kontrolle, bei der anderen um die zu untersuchenden Substanz. Nach Anschaffung weiterer 48 *Fences*, erfolgte jeder Versuch mit vier 24-*Well*-Platten. Dabei wurde eine Platte als Kontrolle verwendet, die anderen 3 für die zu untersuchenden Substanzen genutzt.

Jeder Versuch wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Tag 1</u>

Die sterilisierten *Fences* (Abb. 4) wurden mit dem Silikonring nach unten auf eine mit Fibroblasten-Kulturmedium benetzte Zellkulturschale (Cellstar, Greiner Bio One) gesetzt. Dies

verbesserte die Haftung des Silikons am Boden der Wells. Von der Zellkulturschale aus wurden die *Fences* nun direkt in die 24-*Well*-Platten (24-Well-Platten, Collagen/Cellware, BIOCAT Cell environments, Becton Dickinson Labware) überführt. Die Einkerbung der einzelnen *Fences* zur Befüllung der äußeren Kammer wurde in eine einheitliche Richtung ausgerichtet. Des Weiteren wurden die *Fences* mit leicht gespreizter Pinzette kurz auf den Untergrund angedrückt, bevor sie innerhalb der *Well*-Platten für rund 30 Minuten in den Inkubator gesetzt wurden. Sowohl die leichte Benetzung des Silikons, das Andrücken der *Fences* auf den Untergrund als auch die Wärme im Inkubator verbesserte die Eigenschaft des Silikons am *Well*-Boden zu haften und so ein Übertritt der Zellen außerhalb der zentralen Bohrung zu verhindern.



a: Edelstahl → Gewicht, das das Silikon auf Untergrund drückt

b: Silikon → Begrenzung der inneren Kammer

c: Rinne → Zugang zur äußeren Kammer und Angriffspunkt mir Pinzette

Abb. 4: Foto und schematische Darstellung der Edelstahlfences mit Silikonring [56]

Während die *Well*-Platten für 30 Minuten in den Inkubator verbracht wurden, wurden drei konfluente T-75-Zellkulturflaschen trypsiniert. Nach Entfernung des alten Mediums erfolgte zunächst ein zweifaches Spülen mit PBS. Pro T-75-Zellkulturflasche wurden 4 ml Trypsin auf dem Flaschengrund verteilt. Nach anschließender Inkubation für 8 Minuten bei 37°C und Zugabe von 6 ml Medium pro Flasche wurde das Fibroblastenkulturmediumgemisch für 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 15 ml Fibroblasten-Zellkulturmedium resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest erfolgte eine weitere Verdünnung bzw. Zentrifugation mit Resuspension in geringerem Volumen, bis eine Zielzellzahl von 50 000 Zellen/ml erreicht wurde.

Die mit den *Fences* bestückten 24-*Well*-Platten konnten im Anschluss befüllt werden. Dazu wurde je 150µl der Zellsuspension in die zentralen Bohrungen pipettiert. Außerdem wurde sicherheitshalber je 650µl reines Fibroblasten-Kulturmedium in die äußeren Kammern gefüllt,

um ein Flüssigkeitsgefälle zwischen den beiden Kammern zu vermeiden (Abb. 5). Die Platten verblieben zur Adhäsion der Fibroblasten für die kommenden 16-18 Stunden im Inkubator.



Abbildung 5: Befüllen der äußeren Kammer mit Kulturmedium

Tag 2

Die *Fences* konnten nun vorsichtig mit einer Pinzette aus den *Wells* entfernt werden. Zügig wurde das Gemisch aus Zellsuspension und reinem Medium entfernt und jedes Well zweimalig mit PBS gespült.

Mit Zugabe des Stimulations- bzw. Kontrollmediums startete der Versuch erst im eigentlichen Sinne. Hierfür wurde jeweils 30ml DMEM mit 10% FCS mit dem zu untersuchendem Antibiotikum bzw. RNase freiem Wasser für die Kontrolle versetzt. (<u>Stimulationsmedium</u>: 500ml DMEM+4,5g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvate, 50ml FCS + pharmakologisch wirksame Subastanz X; <u>Kontrollmedium</u>: 500ml DMEM+4,5g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvate, 50ml FCS + RNase freies Wasser). Als Stimulationsmedien wurden acht verschiedene Antibiotika, drei Antiseptika und verschiedener Konzentrationen zweier nutritiver Faktoren ausgewählt.

Tabelle 1 zeigt die jeweiligen Konzentrationen der getesteten Stimulationsmedien, also der Antibiotika, Antiseptika und nutritiver Faktoren und deren circa Vielfaches der Serumkonzentration 1-2 Stunden nach einer therapeutischen Dosis.

Stimulationsmedium	Konzentration	Vielfaches der Serumkonzentration 1-2 Stunden nach einer therapeutischer Dosis [58]
Antibiotikum		
Ampicillin/Sulbactam	90mg/l	10
(Fresenius Kabi Deutschland GmbH)		
Cefuroxim	50mg/l	10
(1500 mg Pulver zur Herstellung einer		
Infusionslösung, Fresenius Kabi)		
Penicillin/Streptomycin	33.000units/ml	1,3
(GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe)	bzw. μg/ml	
Vancomycin	100mg/l	10
(Lederle, 500 mg, Riemser)		
Ciprofloxacin	25mg/l	10
(200 mg/100ml Infusionslösung,		
Fresenuis Kabi)		
Moxifloxacin	30mg/l	10
(Avalox 400 mg/250 ml Infusionslösung,		
Bayer)		
Clindamycin	35mg/l	10
(150 mg/m mjektionsiosung, Fresenius Kabi)		
Metronidazol	140mg/l	10
(500mg/100ml Infusionslösung	i tomb, i	10
Fresenius Kabi)		
Antiseptikum		
Betaisodona®	3,3%	
(Povidon-Iod,	(0.33% Povidon-Iod)	
Betaisodona® 10%ige Lösung, Mundipharma)	(0,00,00,00,00,00,00,00,00,00,00,00,00,0	
Lavanid®	1,66%	
(Polyhexanid-HCl,	(0,000332%	
Lavanid® 1, 0,02% in Ringerlösung)	Polyhexanid-HCl)	
Octenisept®	3,3%	
(Octenisept® Lösung, 0,1% Octenidin-	(0,0033%	
dihydrochlorid, Schuelke & Mayer Gmbh)	Octenidinhydrochlorid)	

Stimulationsmedium	Konzentration	Vielfaches der Serumkonzentration 1-2 Stunden nach einer therapeutischer Dosis [58]
Nutritive Faktoren		
Glukose (high)	4,5g/l	
(DMEM+4,5g/l Glukose, L-Glutamin,		
Pyruvate, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe)		
Glukose (low)	1g/l	
(DMEM+ 1g/l Glukose, L-Glutamin,		
Pyruvate, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe)		
FCS (high)	10%	
FCS	0 %	

 Tabelle 1: Konzentrationen der getesteten Stimulationsmedien und das Vielfache der Serumkonzentration 1-2

 Stunden nach einer therapeutischen Dosis

In jedes Well wurde jeweils 1 ml Stimulations- bzw. Kontrollmedium gegeben. Die Platten verblieben bis zum Mediumwechsel für 48-50 Stunden im Inkubator.

<u>Tag 4</u>

Nachdem die Fibroblasten bereits 2 Tage lang die Möglichkeit zur Migration hatten, erfolgte am 4. Tag ein Mediumwechsel mit identisch hergestelltem Stimulations- bzw. Kontrollmedium und eine erneute Inkubation für 52-54 Stunden.

<u>Tag 6</u>

Nach insgesamt 100-104 Stunden wurde der Versuch durch Fixierung und Färbung des Zellrasens beendet. Das Medium wurde entfernt und jedes *Well* zweimalig mit PBS gespült. Jeweils 1 ml einer 10% igen Formaldehydlösung sorgte innerhalb von 15 Minuten für die gewünschte Fixierung der Zellen.

Im Anschluss erfolgte die Färbung für 15 Minuten mit Mayer's Hämatoxylin und anschließender Nachbläuung im Leitungswasser für weitere 15 Minuten.

2.2.1 Bestimmung der Zellrasen-Fläche

Die von den Zellen eingenommene Fläche wurde visuell vermessen und anschließend berechnet. Dazu wurden die Platten auf einen *Scanner* (VersaDoc Imaging System Modell 400, BIO-RAD) gelegt und mittels der *Software QuantityOne* eingelesen. Hierfür wurde der Modus *X-Ray Film, Clear White TRANS, 1x Gain 1x1 Bin* verwendet (Abb. 6). Die Flächen wurden gegen die ursprüngliche Fläche des Zellrasens bei Versuchsbeginn normalisiert und graphisch dargestellt, bzw. statistisch ausgewertet.



Abb. 6: Ausmessung einer eingescannten 24-well-Platte nach Fixierung und Färbung der Zellrasen

2.3 Statistische Methoden

Die Flächenzunahme von Kontrolle und Verum wurde getrennt für die einzelnen Versuche mit Hilfe eines statistischen Tests verglichen. Hierzu wurde zunächst mit dem Shapiro-Wilk Test überprüft, ob die Daten von Kontrolle und Verum normalverteilt waren. Wurde die Normalverteilungsannahme nicht abgelehnt, so wurde der Vergleich mit dem t-Test vollzogen. Vor dem t-Test wurde ein F-Test auf Gleichheit der Varianzen der Daten von Kontrolle und Verum durchgeführt. Je nach Ergebnis wurde der t-Test für unabhängige Stichproben gleicher, bzw. ungleicher Varianz verwendet. Im Falle der Ablehnung der Normalverteilungsannahme kam der Mann-Whitney-U Test zur Anwendung. Alle Tests mit Ausnahme der Tests auf Normalverteilung und auf Varianzgleichheit wurden zweiseitig zum Niveau α =0.05 gerechnet (Shapiro-Wilk und F-Test: α =0.1).

Zur graphischen Darstellungen wurden so genannte *Boxplots* gewählt. *Boxplots* bestehen aus Rechtecken, die 50% der Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile beinhalten und Extensionslinien, welche die Minimal- und Maximalwerte darstellen. Die Mediane sind durch horizontale Balken innerhalb der Rechtecke angegeben. Extremwerte sind als Punkte eingetragen. (Abb. 7)



Abb. 7. Leseanleitung der *Boxplots*. Die Grenzen der Box bezeichnen die 25. und 75. Perzentile. Damit entspricht der Bereich der Box den mittleren 50 % der Daten. Der Querstrich gibt den Median, die Verlängerungen ("*Wisker"*) den minimalen und maximalen Messwert der Messreihe an. Punkte zeigen Ausreißer an.

3. Ergebnisse

3.1 Antibiotika

Unter Antibiotikabehandlung zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses auf die Fibroblastenmigration. So konnte sowohl eine Hemmung, ein fehlender Einfluss, als auch eine Förderung der Migration beobachtet werden. Alle Antibiotika – mit Ausnahme von Penicillin/Streptomycin - wurden in einer 10-fach höher liegenden Konzentration getestet, als sie in vivo 1-2 Stunden nach Gabe einer gewöhnlich verabreichten therapeutischen Dosis oral oder i.v. im Serum vorliegen.

Für die Antibiotika Penicillin/Streptomycin, Vancomycin und Ciprofloxacin konnte eine statistisch signifikante Hemmung der Fibroblastenmigration und -proliferation gezeigt werden (p<0,05) (Tabelle 2).

Im Mittel lag die Flächenzunahme bei Penicillin/Streptomycin unter einer Testkonzentration, die 1,3-fach höher lag, als die Serumspitzenkonzentration nach Gabe einer therapeutischen Dosis bzw. 10-fach höher lag, als die gewöhnliche Antibiotikakonzentration in Zellkulturen, 21,2mm² unter der Flächenzunahme der Kontrolle. Bei Vancomycin lag dieser Unterschied im Mittel bei 5,19 mm² (Abb.9), bei Ciprofloxacin bei 5,08 mm² (Abb.10). In der nachfolgenden Tabelle sind die deskriptiven Kenngrößen der Flächenzunahme zum Ende des Experiments getrennt für Kontrolle und Verum der einzelnen Versuche sowie die dazugehörigen p-Werte gelistet.

Substanz	N	Μ	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Kontrolle	55	55.46	16.82	-33.25	48.83	55.04	65.77	81.45	
Penicillin/Streptomycin (33.000units/ml bzw. µg/ml – entsprechend der 1,3-facher Serumspitzenkonzentration)	51	34.26	11.25	8.71	26.53	34.46	43.50	59.80	<0.001*
Kontrolle	20	66.55	6.16	56.88	62.08	67.39	69.48	83.18	
Vancomycin (100mg/l – entsprechend der ca. 10-facher Serumspitzenkonzentration)	63	61.36	6.86	39.29	56.85	62.55	65.97	74.43	0.004

Tabelle2: Deskription der Flächenzunahme getrennt für Kontrolle und Verum vonPenicillinStreptomycin, Vancomycin und Ciprofloxacin

Substanz	Ν	М	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Kontrolle	23	69.65	7.64	53.06	66.49	68.84	75.60	82.10	
Ciprofloxacin (25mg/l – entsprechend der ca. 10-facher Serumspitzenkonzentration)	64	64.57	8.04	51.01	59.48	63.34	67.34	90.47	0.003*

^SWenn nicht anders vermerkt, wird der p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben gleicher Varianz angegeben.

[§]p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz

*p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

N = Anzahl der Versuche, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimalwert, 25%-Perzent. = 25%-Perzentile, Md = Median, 75%-Perzent. = 75%-Perzentile; Max = Maximalwert



Abb. 8: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und -proliferation ausgelöste wird, mit und ohne Zugabe von Penicillin/Streptomycin (33.000units/ml bzw. µg/ml entsprechend der 1,3-fachen Serumspitzenkonzentration),

p < 0,001,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 9: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und -proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Vancomycin (100mg/l - entsprechend der ca. 10-fachen Serumspitzenkonzentration), p < 0,004.

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 10: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und –proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Ciprofloxacin (25mg/l – entsprechend der ca. 10-fachen Serumspitzenkonzentration), $\mathbf{p} < 0,003$, Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer

Ampicillin/Sulbactam (Abb.11), Cefuroxim (Abb.12), Clindamycin (Abb.13) und Metronidazol (Abb.14) beeinflussten die Fibroblastenmigration und –proliferation statistisch nicht signifikant (p>0,05) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Deskription der Flächenzunahme getrennt für Kontrolle und Verum beimAmpicillin/Sulbactam, Cefuroxim, Clindamycin und Metronidazol

Substanz	N	М	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Kontrolle	21	76.5	9.2	59.5	68.8	77.4	81.5	95.3	
Ampicillin/Sulbactam (90mg/l -									0.266§
Entsprechend der ca. 10-facher	68	79.0	6.6	63.9	74.8	79.1	84.3	92.8	0.200
Serumspitzenkonzentration)									
Kontrolle	53	55.9	9.5	41.8	48.1	55.3	62.2	83.5	
Cefuroxim (50mg/l –									0.0811
entsprechend der ca. 10-facher	59	58.9	8.2	43.7	54.2	57.3	66.2	75.7	0.0011
Serumspitzenkonzentration)									
Kontrolle	23	67.4	5.4	58.4	62.9	66.3	71.1	78.8	
Clindamycin(35mg/l -									0 333
entsprechend der ca. 10-facher	44	69.0	7.0	55.3	65.2	69.0	74.1	85.1	0.555
Serumspitzenkonzentration)									

Substanz	N	М	SD	Min	25 %-	Md	d 75 %- Max n-Wei	n-Wert ^{\$}	
					Perz.		Perz.		I
Kontrolle	19	53.2	5.2	44.5	50.6	53.4	55.4	67.1	
Metronidazol (140mg/l -									0.067
entsprechend der ca. 10-facher	53	55.9	5.5	44.2	51.4	55.3	60.0	68.0	0.007
Serumspitzenkonzentration)									

^sWenn nicht anders vermerkt, wird der p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben gleicher Varianz angegeben.

[§]p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz

*p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

N = Anzahl der Versuche, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimalwert, 25%-Perzent. = 25%-Perzentile, Md = Median, 75%-Perzent. = 75%-Perzentile; Max = Maximalwert



Abb. 11: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und –proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Ampicillin/Sulbactam (90mg/l – entsprechend der ca. 10-fachen Serumspitzenkonzentration),

p < 0,266,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte = Ausreißer



Abb. 12: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und –proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Cefuroxim (50mg/l – entsprechend der ca. 10-fachen Serumspitzenkonzentration), p < 0.0811, Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75.

Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 13: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Clindamycin (35mg/l – entsprechend der ca.10fachen Serumspitzenkonzentration), p < 0.333,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 14: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Metronidazol (140mg/l – entsprechend der ca. 10-fachen Serumspitzenkonzentration), $\mathbf{p} < 0,067$,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte = Ausreißer

Unter einer 10-fach über der Serumkonzentration gelegenen Moxifloxacinkonzentration zeigte sich hingegen sogar eine gesteigerte Fibroblastenmigration/ -proliferation (p<0,001) (Tab.4). So lag die Flächenzunahme unter Moxifloxacin 3,99 mm² höher als bei der Kontrolle (Abb.15)

Tabelle 4:	Deskription der	[.] Flächenzunahme	getrennt für	Kontrolle und '	Verum bei M	oxifloxacin
I ubene it	Deski iption dei	1 Inchemanne	Settemne fui	ixonti one unu	verum ber m	UAIIIUAaciii

Substanz	N	Μ	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Kontrolle	23	56.2	4.0	49.3	54.1	56.4	57.4	67.0	
Moxifloxacin (30mg/l –									<0.001*
entsprechend der ca. 10-facher	62	60.2	4.7	50.7	57.0	59.8	62.5	78.4	~0.001
Serumspitzenkonzentration)									

^{\$}Wenn nicht anders vermerkt, wird der p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben gleicher Varianz angegeben.

[§]p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz

*p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

N = Anzahl der Versuche, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimalwert, 25%-Perzent. = 25%-Perzentile, Md = Median, 75%-Perzent. = 75%-Perzentile; Max = Maximalwert



Abb. 15 : Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Moxifloxacin (30mg/l – entsprechend der ca. 10fachen Serumspitzenkonzentration), p < 0,001, Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median,

Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer

3.2 Antiseptika

Alle Antiseptika führten zu einer Hemmung der Fibroblastenmigration/-proliferation (p<0,001) (Tabelle 5). Unter Betaisodona lag die Flächenzunahme im Mittel 42,38mm² unter der Kontrolle (Abb.16). Lavanid führte bei einer Konzentration von 3,3% zu einer starken Zytotoxität, sodass Migration und Proliferation unter dieser Konzentration nicht bestimmt werden konnte. Bei einer Konzentration von 1,66% kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer im Mittel 15,94 mm² geringeren Flächenzunahme (Abb.17). Auch Octenisept zeigte eine starke Hemmung, die im Mittel 48,66mm² unter der Flächenzunahme im Vergleich zur Kontrolle lag (Abb.18).

Tabelle 5: Deskription der Flächenzunahme getrennt für Kontrolle und Verum Betaisadona, Lavanid und Octenisept

Substanz	N	М	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Kotrolle Betaisodona	55	50.3	6.7	38.6	45.1	48.9	54.9	69.4	< 0.001 [§]

Substanz	N	М	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Betaisodona (3,3%)	61	7.9	4.5	-2.0	5.5	7.9	10.5	20.0	
Kontrolle Lavanid	22	61.9	6.3	50.7	56.9	62.1	66.9	72.9	<0.001
Lavanid (1,66%)	43	46.0	7.6	33.4	40.9	46.3	51.0	61.6	
Kotrolle Octenisept	38	60.6	8.8	41.5	54.1	59.0	67.5	80.5	< 0.001 [§]
Octenisept (3,3%)	34	11.9	5.0	3.7	8.8	11.5	15.2	23.5	

⁸Wenn nicht anders vermerkt, wird der p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben gleicher Varianz angegeben.

[§]p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz

*p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

N = Anzahl der Versuche, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimalwert, 25%-Perzent. = 25%-Perzentile, Md = Median, 75%-Perzent. = 75%-Perzentile; Max = Maximalwert



Abb. 16 : Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Betaisodona (3,3%),

p < 0,001,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 17 : Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Lavanid (1,66%),

p < 0,001,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer



Abb. 18 : Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne Zugabe von Octenisept (3,3%), p < 0,001, Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte= Ausreißer

3.3 Nutritive Faktoren

Es wurden des Weiteren Versuche und mit viel und wenig Glukose und mit und ohne fötalem Kälberserum (FCS) durchgeführt. Bei einer hohen Glukosekonzentration kam es im Gegensatz Konzentration niedrigen einer einer signifikanten Migrationszu und zu Proliferationshemmung (p <0,001). So lag die Flächenzunahme bei hoher Glukosekonzentration im Mittel 8,26mm² unter der Zunahme als bei niedrigerer Konzentration (Abb.19).

Ohne fötales Kälberserum als Nährstofflieferant kam es zu signifikant geringeren Migration (p <0,001) (Tabelle 6). Die Flächenzunahme lag ohne FCS 63,15 mm² unter der Flächenzunahme als bei Zugabe von FCS (Abb.20).

Substanz	N	Μ	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Viel Glukose (4,5g/l)	18	68.4	4.0	57.8	66.9	69.5	71.3	72.7	<0.001*
Wenig Glukose (1,0g/l)	55	76.6	8.1	56.4	71.2	76.3	81.0	104.0	
Ohne FCS (0%)	58	1.8	5.8	-31.7	-0.6	2.4	4.3	14.2	<0.001*

Tabelle 6: Deskription der Flächenzunahme getrennt für Kontrolle und Verum bei Glucose und FCS

Substanz	N	M	SD	Min	25 %- Perz.	Md	75 %- Perz.	Max	p-Wert ^{\$}
Mit FCS (10%)	55	65.0	11.4	48.7	56.4	63.7	72.4	93.8	

^{\$}Wenn nicht anders vermerkt, wird der p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben gleicher Varianz angegeben.

[§]p-Wert des t-Tests für zwei unabhängige Stichproben ungleicher Varianz

*p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests



Abb. 19: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5g/l vs. 1,0g/l), p < 0,001,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte = Ausreißer



Abb. 20: Flächenzunahme während des Fence-Assays, die durch Fibroblastenmigration und – proliferation ausgelöst wird, mit und ohne fötalem Kälberserum (FCS),

p < 0,001,

Box = 50% der Werte, die zwischen der 25. und 75. Perzentilen liegen, Querbalken = Median, Extensionslinien = Minimal- und Maximalwerte, Punkte = Ausreißer

4. Diskussion

Die hier 2008 durchgeführte Untersuchung bezüglich des Einflusses von Antibiotika und Antiseptika auf des Migrations- und Proliferationsverhaltens von Fibroblasten wurde mittels einem Fence Assay untersucht. Dieses Migrationsmodell eignet sich insbesondere zum Screening von Monolayerexpansion unter dem Einfluss von Pharmaka [56]. Hierbei konnten die verwendeten Fibroblasten zunächst in einem festgelegten Bereich adhärieren und in einem zweiten Schritt unter Zugabe von Antibiotika/Antiseptika das bisher noch nicht zur Verfügung gestandene und damit zellfreie Areal kolonisieren. Kolonisation beschreibt hier die Kombination aus Migration und Proliferation. Die durchgeführten Untersuchungen mittels Fence Assay zeigen erstmalig, dass durch Antibiotika - in einer 10-fach höheren Konzentration, als der Serumkonzentration 1-2 Stunden nach Gabe einer therapeutischen Dosis entsprechend - die Fibroblastenmigration und -proliferation variabel beeinflusst werden kann. So führten unter den Betalactamantibiotika Penicillin/Streptomycin und Vancomycin zu einer herabgesetzten Fibroblastenkolonisation. Auch der Gyrasehemmer Ciprofloxacin wirkte sich negativ auf Migration und Proliferation aus. Während die weiteren Betalactamantibiotika Ampicillin/Sulbactam und Cefuroxim, das Lincosamidantibiotikum Clindamycin und das Nitroimidazolantibiotikum Metronidazol zu keiner Veränderung des Fibroblastenverhaltens geführt haben, kam es unter dem Gyrasehemmer Moxifloxacin sogar zu einem verstärkten Wachstum und einer verbesserten Beweglichkeit der Fibroblasten. Wie schon in einer Studie von Thomas et al. mittels Scratch-Assay untersucht und beschrieben [43], konnte für alle getesteten Antiseptika beim Fence-Assay ebenfalls eine herabgesetzte Migration der Zellen gezeigt werden. Darüber hinaus kam es ohne nutritive Faktoren in Form von fötalem Kälberserum zu einem sehr stark eingeschränkten Kolonisationsverhalten der Fibroblasten. Migration und Proliferation waren auch unter einer hohen Glukosekonzentration im Vergleich zu einer niedrigeren eingeschränkt.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass systemische Antibiotika in der Therapie einer Wundheilungsstörung – sei es beim Ulcus cruris, beim diabetischen Fußulcus oder beim Dekubitus – nicht unkritisch eingesetzt werden sollten. Dies sollte besonders im Kontext der Diskussion um eine fehlende Evidenz zur Verwendung von Antibiotika in der Therapie von chronischen Wunden überhaupt [35, 40] und vor dem Hintergrund des Problems der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen [11] kritisch betrachtet werden. Insbesondere da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Antibiotika auch einen Schaden herbeiführen können. Im Falle der topischen Antibiotikaanwendung bei chronischen Wunden wird zur Zeit allgemein angenommen, dass die negativen Effekte in der Anwendung die positiven übertreffen [59]. So können topische Antibiotika verzögerte Hypersenitivitätsreaktionen, Kontaktallergien und vor allem Superinfektionen durch resistent gewordenen Organismen provozieren. Aus diesem Grund wird die topische Antibiotikatherapie in Form von Wundauflagen oder Salben aktuell nicht mehr empfohlen [60].

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf in vivo Verhältnisse ist insofern limitiert, da nicht außer Acht gelassen werden kann, dass die in Wunden vorkommenden Antibiotika nicht den selben Effekt in vivo auslösen und sich andererseits auch die getesteten Konzentrationen von den in Wunden vorkommenden unterscheiden. Für den Fence Assay wurden Antibiotikakonzentrationen gewählt, die den 10fachen Serumkonzentrationen 1-2 Stunden nach oraler oder intravenöser Gabe einer gewöhnlich verwendeten therapeutischen Dosis entsprachen. In der Literatur findet meine eine Vielzahl von Studien bezüglich Penetrationsverhalten und Konzentration von Antibiotika in peripheren Geweben [61-67]. Die unterschiedlichen Autoren kommen je nach eingesetzter Methode und untersuchtem Antibiotikum zu sehr variablen Ergebnissen. So finden sich im Vergleich Serumspiegel sowohl herabgesetzte, als auch erhöhte zum Antibiotikakonzentrationen. Im Falle der Betalactam-Antibiotika die liegen in Gewebskonzentrationen beispielsweise den meisten Studien unterhalb der Serumkonzentration [64, 65], während Norfloxacin oder Tetracyclin Gewebekonzentrationen oberhalb der Serumlevel aufwiesen [66, 67]. Es ist bekannt, dass verschieden Eigenschaften eines Antibiotikums seine Penetration ins Gewebe beeinflussen. Molekülgröße, Ausmaß der Lipophilie und Plasmaproteinbindung, pH-Wert von Körperflüssigkeiten, Vorhandensein von aktiven Transportern und die Beschaffenheit von Gefäßwänden spielen hierbei eine große Rolle. Kleine Moleküle, wie z.B. Ciprofloxacin können leichter durch Membranen diffundieren als große Moleküle wie beispielsweise das Vancomycin [68]. Lipophile Antibiotika wie die Fluorochinolone (Ciprofloxacin, Moxifloxacin), Lincosamide (Clindamycin) und Nitroimidazole (Metronidazol) [69] passieren leichter die Zellmembran und reichern sich vor allem intrazellulär an. Hydrophile Antibiotika wie die Betalactame (Penicillin, Ampicillin, Cefuroxim) und Glycopeptide (Vancomycin) [69] hingegen verteilen sich schlechter und reichen sich vor allem extrazellulär im Interzellulärraum an [65]. Da nur der freie Anteil eines Antibiotikums diffundieren und seine Wirkung entfalten kann, behindert

eine starke Plasmaproteinbindung die Verteilung ins periphere Gewebe. Auch die Durchblutung ist entscheidend für die im Gewebe zustande kommende Konzentration.

Die im Vergleich zu *in vivo* Bedingungen eher hohen Konzentrationen wurden auch gewählt, um in einer ersten Analyse überhaupt bis dahin nicht bekannte Effekte sichtbar zu machen. Allerdings muss hierbei wiederum berücksichtigt werden, dass nicht eindeutig geklärt ist, wie hoch die Antibiotikakonzentration in den Wunden ist.

Unter pathologischen Bedingungen – wie Infektionen, Diabetes mellitus, pAVK – kann die Pharmakokinetik stark vom Verhalten der Antibiotika unter physiologischen Rahmenbedingungen abweichen [68].

Bei Infektionen der Haut und des Weichteilgewebes werden 2 – 3mal 500mg Ciprofloxacin täglich p.o. empfohlen. Ciprofloxacin wird nach oraler Gabe vorwiegend aus dem Dünndarm rasch und weitgehend resorbiert und erreicht nach 1 - 2 Stunden maximale Konzentrationen im Serum. Einzeldosen von 100 - 750 mg ergaben dosisabhängige Maximalkonzentrationen im Serum zwischen 0,56 und 3,7mg/l [58]. In der Literatur finden sich jedoch unterschiedliche Angaben, bezüglich der Ciprofloxacinkonzentration am Ort der Infektion. Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von Ciprofloxacin im entzündeten Gewebe signifikant unterhalb der Serumkonzentration liegt [70, 71]. Laut der Open Drug Library und der Fachinformation für Ciprofloxacin Fresenius Kabi ist Ciprofloxacin jedoch an den Orten der Infektion, nämlich in den Flüssigkeiten und Geweben des Körpers, in mehrfach höheren Konzentrationen enthalten als im Serum [72]. Somit stellt sich die Frage, in wie weit die hohe getestete Konzentration von tatsächlichen *in vivo* Bedingungen abweicht und ob unsere Ergebnisse so nicht schon auf *in vivo* Situationen übertragbar sind.

Vancomycin hemmt als Glykopeptidantibiotika die Transglykosylierungsreaktion, so dass die für die Quervernetzung des Mureins benötigten Vorstufen nicht mehr in die Bakterienzellwand eingebaut werden können und die Bakterien zu Grunde gehen (bakterizide Wirkung). Nach i.v. Infusion von 500mg Vancomycin über 60 Minuten betragen die durchschnittlichen Plasmakonzentrationen etwa 32mg/l am Ende der Infusion, nach 1 Stunde etwa 13mg/l und nach 4 Stunden etwa 5,7 mg/l [58]. Während fast alle Gram- positiven Erreger, damit auch Staphylokokken (inklusive MRSA), Streptokokken und Enterokokken, sensibel gegenüber Vancomycin sind, besitzen alle Gram-negativen Erreger (E.coli, Pseudomonas, Enterokokken, Proteus, Klebsiellen) eine natürliche Resistenz auf Grund der unterschiedlichen Zellwandphysiologie. Da Vancomycin in einer 10-fach höheren Serumkonzentration untersucht wurden und sich diese großen und nicht sehr lipophilen Antibiotikamoleküle schlecht im peripheren Gewebe anreichern [73], muss angenommen werden, dass die tatsächliche Konzentration *in vivo* in den Fibroblasten deutlich unter der getesteten Konzentration liegt. Daher müsste in weiterführenden Studien gezeigt werden, ob diese Hemmung sich auch unter geringeren Dosen bestätigt.

Im Falle von Penicillin/Streptomycin ist zu beachten, dass diese Antibiotikakombination normalerweise keine Behandlungsstrategie von infizierten Wunden darstellt, sondern die gebräuchlichste Antibiotikumsmischung zur Beseitigung und Prävention von bakteriellen Kontaminationen in der Zellkultur ist [74]. Auch bei den hier durchgeführten Kulturmethoden wurde eine Penicillin/Streptomycinkonzentration von 100*units*/ml bzw. µg/ml verwendet.

Penicillin ist ein nicht Betalaktamase-festes Betalaktam-Antibiotikum dessen bakterizide Wirkung durch Hemmung der bakteriellen Zellwandsynsthese erreicht wird. Nach oraler Gabe von 1 g Penicillin wurde eine mittlere Spitzenkonzentration von 15mg/l gemessen. Nach intramuskulärer Injektion von 1 I.E. (entsprechend 600 mg) Benzylpenicillin-Natrium wird nach 1 Stunde eine Plasmakonzentrationen von 12 mg/l gemessen. Nach 1-stündiger Kurzinfusion von 1 I.E. (entsprechend 600 mg) Benzylpenicillin-Natrium wird eine maximale Plasmakonzentrationen von ca. 15mg/l erreicht. Üblicherweise sind Streptokokken, Staphylokokken und Enterococcus faecalis sensibel gegenüber Penicillin. Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, und alle Enterobacteriaceae-Spezies (u.a. Enterobacter, Klebsiellen, E.coli und Proteus) sind resistent [75].

Streptomycin ist ein Aminoglykosidantibiotikum und wird *in vivo* vor allem als Tuberkulostatikum eingesetzt. Maximale Serumspiegel von 30 µg/ml werden nach i.m. Gabe von 0,5g Streptomycin erreicht [76].

Die hier getestete Antibiotikakombination wird *in vivo* nicht verwendet. Sie wurde zu Beginn der Versuchreihe im *Fence Assay* dennoch analysiert, um einen ersten Eindruck vom Antibiotikaeinfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Fibroblasten zu erhalten.

In weiteren Analysen müsste Penicillin getrennt von Streptomycin untersucht werden, um zu klären, ob Penicillin auch alleine einen hemmenden Einfluss auf die Fibroblastenmigration und –proliferation ausübt.

Die in der Therapie chronischer Wunden üblicherweise eingesetzten Antibiotika Clindamycin, Metronidazol, Cefuroxim und Ampicillin/Sulbactam führten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Fibroblastenmigration.

Clindamycin ist ein Lincosamid-Antibiotikum. Es hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und wirkt damit überwiegend bakteriostatisch. Nach oraler Einnahme von 150 bzw. 300 mg liegt die Serumkonzentrationen nach 1-2 Stunden bei 1,9 – 3,9 μ g/ml bzw. 2,8 – 3,4 μ g/ml [58], nach intravenöser Applikation von 300 mg sind die mittleren Serumkonzentrationen nach einer Stunde ca. 4 bis 6 mg/l [77]. Clindamycin ist wirksam gegenüber Staphylokokken (außer MRSA) und Streptokokken. Enterokokken, E.coli, Pseudomonas und Klebsiellen weisen eine natürlich Resistenz auf [75].

Im Gegensatz dazu ist Metronidazol ein Antibiotikum aus der Gruppe der Nitroimidazole, das seine bakterizide Wirkung unter anaeroben Bedingungen über Nitrose-Radikale, die Addukte mit DNS-Basenpaaren bilden und so zu Strangbrüchen in der DNS führen, entfaltet [78]. Nach i.v. Infusion von 500 mg Metronidazol werden Serumspiegel von 13-15 mg/l erreicht. Bei oraler Gabe liegt die empfohlene Tagesdosis bei 0,2 bis maximal 2 g; die mittlere Dosis beträgt 0,8 – 1 g und wird gewöhnlich auf 2-3 Einzeldosen verteilt. Nach Einnahme von 400 mg liegt die maximale Serumkonzentration bei 8 mg/l, bei Einnahme von 500 mg bei 12 mg/l, bei 2000 mg bei 40 mg/l [58]. Sensibel auf Metronidazol reagieren Anaerobiern wie Clostridien oder Bacteroides [75].

Beide Antibiotika, Clindamycin und Metronidazol, führten selbst unter den im Vergleich zu therapeutischen Serumspiegeln sehr hohen Konzentrationen zu keiner signifikanten Beeinflussung des Fibroblastenmigrations- und Proliferationsverhalten.

Da selbst unter diesen hohen Wirkstoffkonzentrationen keine Veränderung des Fibroblastenverhaltens auftrat ist, ist diese auch unter therapeutischen Dosen von Clindamycin und Metronidazol *in vivo* nicht zu erwarten.

Cefuroxim entfaltet als Cephalosporinantibiotikum seine bakterizide Wirkung durch Hemmung der Zellwandsynsthese mittels Blockade der Transpepdidasen und weiteren Penicillin-bindenen Proteinen [78]. Bei Infektionen der Haut oder des Weichteilgewebes wird die 2 x tägliche Einnahme von 250-500 mg Cefuroxim empfohlen. Maximale Serumspiegel treten ca. 2 - 3 Stunden nach Einnahme einer Dosis nach einer Mahlzeit auf und betragen 4 - 6 mg/l für eine 250 mg Dosis und 5 - 8 mg/l für eine 500 mg Dosis [58].

Sensibel auf Cefuroxim reagieren Staphylokokken – mit Ausnahme von MRSA -, Streptokokken, Enterobacter, E.coli, Klebsiellen und Proteus mirabilis. Natürliche Resistenzen weisen Enterokokken, MRSA, Pseudomonas und Proteus vulgaris auf [75].

Ampicillin ist ein Aminopenicillin, welches oft als Kombination mit dem Betalactamaseinhibtitor Sulbactam eingesetzt wird Wie Cefuroxim blockiert es die Transpeptidase und hindert damit die Bakterien am Zellwandaufbau Dabei schütz Sulbactam das Ampicillin vor seinem Abbau durch Betalactamasen [78]. Die empfohlene Dosis beträgt für Erwachsene 0,75 – 3g Ampicillin/Sulbactam i.v. oder i.m. alle 6 – 8 Stunden [75].

Bei i.v. Gabe von 0,5g Sulbactam + 1g Ampicillin beträgt die Serumkonzentration nach 1-2 Stunden für Sulbactam 4-9 mg/l und für Ampicillin 6-14 mg/l [58]. Enterokokken, Staphylokokken – mit Ausnahme von MRSA -, Streptokokken, Escherichia coli, Klebsiellen und Proteus sind sensibel gegenüber dieser Arzneimittelkombination. MRSA, Enterobacter und Pseudomonas hingegen weisen natürliche Resistenzen auf [75].

Weder Ampicillin/Sulbactam noch Cefuroxim zeigten unter den hohen Konzentrationen eine Hemmung oder Förderung der Fibroblastenmigration und –proliferation. Da davon auszugehen ist, dass das Gewebe und insbesondere die Fibroblasten durch eine fehlende Anreicherung der hydrophilen Substanzen innerhalb der Zellen einer geringeren Antibiotikakonzentration, als der für kurze Zeit aufrechtgehaltenen Serumspitzenkonzentration, ausgesetzt sind, kann angenommen werden, dass auch *in vivo* diese Antibiotika keinen Einfluss auf das Fibroblastenverhalten haben.

Für Moxifloxacin konnte gezeigt werden, dass die Konzentration im entzündeten Weichteilgewebe – vermutlich über eine entzündungsbedingte Hyperämie und gesteigerte Gefäßpermeabilität – die Gewebskonzentration der gesunden, kontralateralen Körperhälfte sogar übersteigt [79]. Moxifloxacin erreicht nach einer Infusion von 400 mg eine dem Ciprofloxacin ähnlich maximale Plasmaspitzenkonzentrationen von 4,1 mg/l [80], was einem Anstieg um etwa 26% gegenüber den Werten nach oraler Gabe (3,1 mg/l) entspricht [58]. Für beide Antibiotika aus der Gruppe der Chinolone, Ciprofloxacin und Moxifloxacin, gilt, dass die häufig in chronischen Wunden vorkommenden Bakterien E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus und Staphylococcus gegen beide Chinolone sensibel sind. Streptokokken und Pseudomonas sind dagegen jedoch wechselnd empfindlich und Enterokokken fast immer resistent [75]. Interessanterweise wirkte aber nur Ciprofloxacin fibroblastenmigrations- und proliferationshemmend. In einer vergleichbaren Konzentration förderte Moxifloxacin die

Migration und Proliferation, obwohl beide Substanzen ihre bakterizide Wirkung als Antibiotika der gleichen Gruppe über eine Hemmung der Topoisomerasen II und IV, die an der Replikation, Reparatur und Transkription der bakteriellen DNS beteiligt sind, entfalten [78].

Generell kann aus der vorliegenden Studie jedoch hinsichtlich der Ursache für den unterschiedlichen Antibiotikaeinfluss auf die Fibroblastenmigration und –proliferation keine Aussage gemacht werden. Interessanterweise gab es sogar zwischen den verschiedenen Antibiotika einer Antibiotikaklasse, nämlich Ciprofloxacin und Moxifloxacin, diskrepante Ergebnisse, obwohl beide Antibiotika die gleichen Wirkmechanismen haben.

Eine kürzlich veröffentlichter Artikel bezüglich topischer Antibiotikaanwendung bei chronischen Wunden stellt positive Eigenschaften der lokalen Anwendung im Gegensatz zum systemischen Einsatz zur Diskussion [81]. So kann laut den Autoren beispielsweise bei Verbrennungswunden oder chronischen Wunden ein systemisch appliziertes Antibiotikum nicht zur Wunde gelangen, da die transportierenden Gefäße zerstört sind. Das Antibiotikum hat also eine sehr schlechte Gewebspenetration. Bei topischer Applikation kann das Antibiotikum ein nicht intaktes Zirkulationssystem umgehen und so eine hohe Konzentration am Ort der Wunde gewährleisten. Jacobsen et al. untersuchten die antimirobielle Aktivität auf MRSA und Pseudomonas aeruginosa von topischem Moxifloxacin in Form eines Gels in einem Tiermodell (Schwein, Ratte) [81].

Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl Moxifloxacin als auch Gentamicin die Bakterienzahl – auch im Falle von MRSA - effizient reduzierten ohne Resistenzen zu begünstigen. Des Weiteren konnte interessanterweise histologisch gezeigt werden, dass Moxifloxacin auch in dieser Untersuchung die Wundheilung sogar begünstigte [81]. Die Autoren geben als mögliche Ursache dafür an, dass Moxifloxacin und andere Fluoroquinolone die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8, TNF- α , IL1- β von aktivierten Monocyten hemmen, bzw. die Akkumulation von Zytokinen in aktivierten Leukozyten reduzieren und dadurch die Entzündung reduzieren und Regeneration fördern [82, 83]. Diese Erklärung würde allerdings für die hier erbrachten Ergebnisse in einem Fibroblasten *in vitro* Modell in Abwesenheit von Monozyten und Leukozyten nicht ausreichen.

Es war allerdings nicht Ziel dieser Dissertationsschrift, den Pathomechanismus für eine Hemmung oder auch Förderung der Fibroblastenmigration und –proliferation aufzuklären.

Wie bereits durch Thomas et al. im *Scratch-Assay* gezeigt [43], kam es auch im *Fence-Assay* bei den hier getesteten Antiseptika (Lavanid®, Betaisodona® und Octenisept®) zu einer Hemmung der Fibroblastenmigration und –proliferation. Die im *Fence Assay* verwendeten

Konzentrationen lagen bei 3,3% Betaisodona® (10%), entsprechend 0,33% Povidon-Iod, 3,3% Octenisept® (0,1%) entsprechend 0,0033% Octenidinhydrochlorid und 1,66% Lavanid-II-Lösung® (0,04%), entsprechend 0,000664% Polyhexanid-HCl. Betont werden sollte hierbei, dass zunächst ein Versuch mit einer 3,3% Lavanid®-Lösung durchgeführt wurde. Da hier eine sehr starke Zytotoxität auftrat, wurde diese Konzentration halbiert und ein erneuter Versuch gestartet.

Da die untersuchten Antiseptika zur antiseptischen Wundbehandlung unverdünnt auf die zu behandelnden Stellen aufgetragen oder Spülungen im Rahmen der Wundbehandlung 1:2 -1:25 verdünnt durchgeführt werden, repräsentieren die hier untersuchten Konzentrationen durchaus Bedingungen, die so *in vivo* vorliegen können. Damit zeigen diese Ergebnisse, dass unsere Technik im Hinblick auf den Erhalt gleichartiger Ergebnisse valide war und sie unterstützen gleichzeitig bereits bekannten Befunde, die belegen, dass viele desinfizierend wirkende Substanzen die Zellproliferation und damit die Resynthese von Ersatzgewebe hemmen [41-43]. Aus diesem Grund werden Desinfizienzien zum einen erst nach Auswahl möglichst gering hemmender Substanzen und zum anderen zumindest vorrangig bei nur stark besiedelten Wunden verwendet [1].

Bereits bekannte Effekte zeigen auch die Ergebnisse des Fence Assays mit und ohne nutritive Faktoren in Form von fötalem Kälberserum (FCS). Fötales Kälberserum enthält eine Vielzahl von Proteinen, unter denen sich auch Wachstumsfaktoren befinden. Dadurch wird eine Umgebung geschaffen, die das Wachstum und die Teilung der Zellen innerhalb der Zellkultur erlaubt [74].

Während der physiologischen Wundheilung kommt es vor allem während der Proliferationsphase zu einem erhöhten Metabolismus, der nur durch eine ausreichende Blutversorgung und damit Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen aufrecht gehalten werden kann. Dem Wundpatient fehlen häufig bestimmte Nährstoffe, einerseits durch den Aufbau neuer Zellen, andererseits durch den Verlust von Nährstoffen über das Wundsekret. Häufig geraten diese Patienten in eine negative Stickstoffbilanz mit niedrigem Serumeiweiß und – albumin [6]. Fehlen Nährstoffe, weil zusätzlich Durchblutungsstörungen wie beispielsweise im Falle von Mikroangiopathie bei Diabetes mellitus vorliegen, führt dies – entsprechend der von uns gezeigten, fehlenden Fibroblastenmigration und –proliferation im *Fence Assay* bei Fehlen von FCS - zur Wundheilungsstörung und damit zum diabetischen Ulkus.

Die Wundheilungsstörung unter Diabetes mellitus ist gut untersucht. Es konnten mittlerweile zahlreiche Faktoren identifiziert werden, die an der Pathogenese des diabetischen Ulkus beteiligt sind. Diabetes mellitus behindert die Heilung gleichzeitig via metabolischer, vaskulärer und neuropathische Pfade [84]. Während ursprünglich Diabeteskomplikationen den mirkovaskulären, okklusiven Folgen der andauernden Hyperglykämie zugeschrieben wurden, konnten neuere Studien dies nicht mehr belegen [17]. Sorbitol, ein toxisches Beiprodukt des Glukosemetabolismus, das im Gewebe akkumuliert [18], eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität der Haut mit perikapillären Albuminablagerung und damit Behinderung der Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen [17] und die nichtenzymatische Glykosilierung von strukturellen und enzymatischen Proteinen, ist an der Entstehung des diabetischen Ulkus beteiligt.

Unser Ergebnis, dass eine höhere Glukosekonzentration 4.5g/l) (1g/l)VS. die Fibroblastenmigration und -proliferation verlangsamt, wird durch Arbeiten von Turner et al. [85], Hehenberger et al. [86] und Loots et al. [87] unterstützt. Diese konnten zeigen, dass die Proliferation bis zu einer bestimmten Grenzglukosekonzentration (18mmol/l oder ca.3,2g/l bzw.15,5 mmol/l oder 2,8g/l) ansteigt und bei weiterer Erhöhung inhibiert wird. Als Erklärung dafür kann möglicherweise die Störung der Bildung von Mikrotubuli, die eine entscheidende Rolle während der Mitose und damit bei der Zellteilung in der Zelle spielen, unter hohen Glukosekonzentrationen dienen [88]. In diesen Arbeiten wurden jedoch nur die Fibroblastenproliferation, jedoch nicht die Fibroblastenmigration analysiert. Lan et al. untersuchten unter hohen Glukosekonzentrationen die Migration von weiteren, bei der Wundheilung beteiligten Zellen - den Keratinozyten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Motilität der Keratinozyten unter hohen Glukosekonzentrationen eingeschränkt ist [89, 90]. Unserer Kenntnis nach wurde bisher aber noch nicht gezeigt, dass auch die Migration der Fibroblasten durch hohe Glukosekonzentrationen gestört wird.

Glucose wird in der Therapie von Wunden auch topisch eingesetzt. Zwar wird die Verwendung von zuckerhaltigen oder honigenthaltenden Wundauflagen weiterhin diskutiert, unbestritten ist aber, dass die Wirksamkeit einer hohen Glucosekonzentration hierbei primär in der osmotischen Komponente liegt [91]. Den Bakterien wird Wasser entzogen und es erfolgt die Zellzersetzung der Mikroorganismen. Für den medizinischen Honig kommt zusätzlich eine enzymatische Wirkkomponente hinzu. Es konnte jedoch in einer systematischen Untersuchung bei der Verwendung von medizinischem Honig bei der Therapie von chronischen Fußulcera keine Beschleunigung der Wundheilung festgestellt werden [92].

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle mit dem *Fence-Assay* durchgeführten Versuche ausschließlich Fibroblasten verwendet, die aus primären Fibroblastenkulturen gewonnen wurden. Im Gegensatz zu Fibroblasten, die aus Zelllinien stammen und durch chromosomale Aberrationen und Mutationen ein unbegrenztes Wachstum zeigen können [74], weisen diese einen normalen, diploiden Chromosomensatz auf und stellen damit ein gutes Modell für das *in vivo* Verhalten von Fibroblasten dar [57].

Da die Isolierung der Zellen nicht durch enzymatische Digestion, sondern durch spontanes Auswachsen der Fibroblasten aus humanem Hautgewebe statt gefunden hat, könnten durch diese Methode Fibroblasten mit einer höheren Motilität selektiert worden sein [57]. Auch nach einer Verletzung mit folgender Wundheilungsreaktion kommt zu einer erhöhten Aktivität der Fibroblasten. Allerdings wurde in vorausgegangenen Studien gefunden, dass Fibroblasten, die aus chronisch venösen oder diabetischen Ulzera isoliert wurden, eine geringere Proliferationskapazität aufwiesen, als Zellen aus akuten Wunden [93-96]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten aus chronisch venösen Ulzera langsamer migrieren als Fibroblasten aus gesundem Gewebe [97].

Daher muss diskutiert werden, welche Effekte die hier erzielten Ergebnisse *in vivo* bei bereits beeinträchtiger Fibroblastenproliferation und –migration auslösen könnten und ob diese dadurch möglicherweise sogar noch verstärkt werden.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Untersuchungen erstmalig, dass Antibiotika die Fibroblastenmigration und -proliferation variabel beeinflussen können. Während es unter Penicillin/Streptomycin, Vancomycin und Ciprofloxacin zu einer statistisch signifikanten Fibroblastenproliferation Hemmung der und -migration kam. konnte unter Ampicillin/Sulbactam, Cefuroxim, Clindamycin und Metronidazol keine signifikante Beeinflussung des Fibroblastenverhaltens beobachtet werden. So zeigten jedoch die Fibroblasten unter Moxifloxacin eine gesteigerte Migration und Proliferation. Da bisher die bei chronischen Wunden verwendeten Antibiotikakonzentrationen nach i.v. oder p.o. Gabe im Serum, aber nicht in allen Fällen für das Wundsekret bekannt sind, scheint es nach den hier erhaltenen Ergebnissen nunmehr sinnvoll, zunächst Konzentrationen aller bei chronischen Wunden verwendeten Antibiotika innerhalb der Wunden zu messen. In einem zweiten Schritt sollten dann bei zukünftigen Studien zum Einfluss von Antibiotika auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten Dosis-Wirkungsanalysen durchgeführt werden, die u.a. Konzentrationen beinhalten wie sie nach i.v. oder p.o. Gabe in Wundsekreten vorzufinden sind. Inwieweit Moxifloxacin auch im Hinblick auf die Untersuchungen von Jacobsen et al. in der Therapie

von Wundheilungsstörungen - sei es in topischer oder systemischer Applikationsform - besonders geeignet ist, sollte weiter untersucht werden.

5. Schlussfolgerung

Chronische Wunden sind vor allem in den westlichen Industrienationen mit großen medizinökonomischen Problemen verbunden. Sie entstehen häufig im Rahmen von systemischen Grunderkrankungen und sind Ausdruck einer pathologischen Wundheilung. Dabei kommt es zu einer Verlängerung der einzelnen Wundheilungsphasen - Entzündung, Proliferation und Umbau. Einen wichtigen Beitrag zum Ablauf dieser Phasen leisten die Fibroblasten, die vor allem für die Kollagensynthese und damit Wiederherstellung des Ausgangszustandes verantwortlich sind. Die Komplexität der physiologischen Heilungsstadien macht sie anfällig für Störungen. Diese können in Form von Durchblutungsstörungen und damit folgend einer Hypoxie, einem saueren Milieu und verminderten Nährstoffanlieferung, in Form von erhöhtem Druck oder als Infektion auftreten. Chronische Wunden sind nahezu obligat mit Mikroorganismen – vor allem Staphylococcus aureus, Koagulase-negative Staphylokokken, Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli [24, 25] - besiedelt [22]. Kommt es zur Infektion, d.h. neben der Kolonisation liegen Entzündungszeichen vor, führt dies zur Wundheilungsstörung.

Neben der Wundreinigung, der Regulation des Feuchtigkeitgleichgewichts und der Förderung der Reepithelisierung ist auch die Entzündungs- und Infektionskontrolle mittels systemischer Antibiotikagabe und ggf. Verwendung von lokalen Antiseptika ein häufig praktizierter, jedoch unzureichend Evidenz-basierter Therapieansatz [1, 35]. Obwohl der routinemäßige Einsatz von Antibiotika in der Behandlung der meisten chronischen Wunden ohne Vorliegen einer akuten Infektion nicht unterstützt werden kann [35], erhalten mehr als die Hälfte aller Patienten mit chronischen Wunden diese Therapeutika [11, 36].

Empirisch, entsprechend der am häufigsten vorkommenden Pathogene, wird vor allem mit Breitbandantibiotika wie Ampicillin/Sulbactam, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefuroxim, Vancomycin, Moxifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin, Clindamycin und Metronidazol behandelt [40].

Bisher konnte gezeigt werden, dass Antibiotika unter therapeutischen Konzentrationen keine Zytotoxität aufweisen [41], jedoch wurde der Einfluss von Antibiotika auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten noch nicht untersucht. Bis heute ist damit nicht bekannt, ob Antibiotika die Fibroblastenmigration und damit die Resynthese von Ersatzgewebe hemmen oder fördern. Mit der vorliegen Arbeit sollte daher in einem reliablen und objektiven Fibroblastenmigrationsmodell untersucht werden, ob und in wie weit die am häufigsten bei chronischen Wunden eingesetzten Antibiotika die Fibroblastenmigration beeinflussen.

Als Migrationsmodell wurde hierfür der Fence Assay verwendet. Dieser erlaubt Zellen in einem ersten Abschnitt das Adhärieren auf den Boden von 24-Well-Platten nur in einem begrenzten Areal, so dass bei Versuchstart ein Zellrasen von definiertem Durchmesser zur Verfügung steht. In einem zweiten Abschnitt des Versuches können die Zellen nun mit oder ohne Zugabe von den zu untersuchenden Adjuvanzien migrieren und das Ausmaß der Migration nach Fixierung der Zellen vermessen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Antibiotika die Fibroblastenmigration und -proliferation variabel beeinflussen. Die Antibiotika wurden mit Ausnahme von Penicillin/Streptomycin in einer ca. 10-fach höheren Konzentration als einer 1-2 Stunden nach Gabe einer therapeutischen Dosis im Serum vorzufindenen Konzentration getestet. So kam es unter Penicillin/Streptomycin in einer 1,5- bzw. 10-fachen in vivo Serumspitzenkonzentration, unter Vancomycin und unter Ciprofloxacin zu einer statistisch signifikanten Hemmung des Fibroblastenverhalten (p<0,05). Während es unter Ampicillin/Sulbactam, Cefuroxim, Clindamycin und Metronidazol zu keiner signifikanten Beeinflussung des Fibroblastenverhaltens kam (p>0,05), zeigten die Fibroblasten unter Moxifloxacin sogar eine gesteigerte Migration und Proliferation (p < 0.05).

Neben Antibiotika wurden auch Antiseptika und nutritive Faktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Fibroblasten untersucht. Wie schon zuvor - allerdings mittels einer wissenschaftlich dem Fence Assay unterlegenden Methode, nämlich dem Scratch-Assay - durch eine vorausgegangene Studie [43] gezeigt, führten alle getesteten Antiseptika zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Fibroblastenmigration und –proliferation (p<0,05).

Fehlten nutritive Faktoren analog der häufig bei Patienten mit chronischen Wunden vorkommenden negativen Stickstoffbilanz und des Serumproteinmangels in Form von fötalem Kälberserum (FCS) während des Fence-Assays, kam es zu einer starken Behinderung von Fibroblastenmotilität und -wachstum (p<0,05).

Auch erhöhte Glukosekonzentrationen im Medium 4,5g/l vs. 1g/l Glukose), wie sie beispielsweise bei Diabetes mellitus *in vivo* vorkommen können, führten zu einer herabgesetzten Migration und Proliferation (p<0,05).

Die vorliegenden Daten weisen damit darauf hin, dass Antibiotika in der Therapie einer Wundheilungsstörung nicht unkritisch eingesetzt werden sollten, insbesondere da nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht einige Antibiotika auch einen Schaden herbeiführen. Allerdings darf nicht darüber hinweggesehen werden, dass die in Wunden vorkommenden Antibiotika nicht den selben Effekt *in vivo* auslösen könnten und andererseits auch die getesteten Konzentrationen möglicherweise von den in Wunden vorkommenden differieren.

Die im Vergleich zu *in vivo* Bedingungen eher hohen Konzentrationen wurden gewählt, um in einer ersten Analyse überhaupt bis dahin nicht bekannte Effekte sichtbar zu machen. Nach den hier erhaltenen Ergebnissen scheint es nunmehr sinnvoll, einerseits in einem ersten Schritt alle in Wunden vorkommenden und bei chronischen Wunden eingesetzten Antibiotikakonzentration zu messen und andererseits bei künftigen diesbezüglichen Studien Dosis-Wirkungsanalysen durchzuführen.

6. Literatur

- 1. Gillitzer, R., Modernes Wundmanagment. Hausarzt, 2002. 53: p. 130-147.
- 2. Jannasch, O., et al., [*The difficult wound*]. Ther Umsch, **2007**. **64**(9): p. 485-94.
- 3. Mekkes, J.R., et al., *Causes, investigation and treatment of leg ulceration.* Br J Dermatol, **2003**. **148**(3): p. 388-401.
- 4. Linder, K., *Akute und chronische Wundbehandlung*. Gesundheitspolitischökonomische Aspekte bei chronischen Wunden, Bd 55 ed. K. HH. **1997**: Verl.für Med Publikationen.
- 5. Schilling, J.A., *Wound healing*. Surg Clin North Am, **1976**. **56**(4): p. 859-74.
- 6. Riedel, K., et al., [Pathogenesis of chronic wounds]. Chirurg, 2008. 79(6): p. 526-34.
- 7. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *Wound healing: an overview*. Plast Reconstr Surg, **2006**. **117**(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
- 8. Pierce, G.F., et al., *Role of platelet-derived growth factor in wound healing*. J Cell Biochem, **1991**. **45**(4): p. 319-26.
- 9. Diegelmann, R.F., *Analysis of collagen synthesis*. Methods Mol Med, **2003**. **78**: p. 349-58.
- 10. Madden, J.W. and H.C. Smith, *The rate of collagen synthesis and deposition in dehisced and resutured wounds*. Surg Gynecol Obstet, **1970**. **130**(3): p. 487-93.
- 11. Howell-Jones, R.S., et al., *A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds.* J Antimicrob Chemother, **2005**. **55**(2): p. 143-9.
- 12. Bankey, P., et al., *Hypoxia and endotoxin induce macrophage-mediated suppression of fibroblast proliferation*. J Trauma, **1989**. **29**(7): p. 972-9; discussion 979-80.
- 13. Steed, D.L., *Debridement*. Am J Surg, **2004**. **187**(5A): p. 71S-74S.
- 14. Kivisaari, J., et al., *Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments*. Ann Surg, **1975**. **181**(6): p. 823-8.
- 15. Allen, D.B., et al., *Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms*. Arch Surg, **1997**. **132**(9): p. 991-6.
- 16. Riou, J.P., J.R. Cohen, and H. Johnson, Jr., *Factors influencing wound dehiscence*. Am J Surg, **1992**. **163**(3): p. 324-30.
- 17. Bucalo, B., W.H. Eaglstein, and V. Falanga, *Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid*. Wound Repair Regen, **1993**. **1**(3): p. 181-6.
- 18. He, Z. and G.L. King, *Microvascular complications of diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, **2004**. **33**(1): p. 215-38, xi-xii.
- 19. Chow, L.W., et al., *The study of cytokine dynamics at the operation site after mastectomy*. Wound Repair Regen, **2003**. **11**(5): p. 326-30.
- 20. Eming, S., Modernes Wundmanagement. Hautarzt, 2007. 58: p. 939-944.
- 21. Dissemond, J., Wann ist eine Wunde chronisch? Hausarzt, 2006. 57(1): p. 55.
- 22. Bowler, P.G., B.I. Duerden, and D.G. Armstrong, *Wound microbiology and associated approaches to wound management*. Clin Microbiol Rev, **2001**. **14**(2): p. 244-69.
- 23. Hansson, C., et al., *The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique.* Acta Derm Venereol, **1995**. **75**(1): p. 24-30.
- 24. Dissemond, J., *Bakterielle Kolonisation chronischer Wunden*. Hautarzt 2004. 55: p. 280-288.
- 25. Bowler, P., *Wound pathophysiology, infection and therapeutic options*. Ann Med, **2002**. **34**: p. 419-427.
- 26. Ge, Y., et al., *Microbiological profile of infected diabetic foot ulcers*. Diabet Med, **2002**. **19**(12): p. 1032-4.

- 27. PG Bowler, B.D., *The microbiology of acute and chronic wounds*. Wounds, **1999**. **11**: p. 72-78.
- 28. Tentolouris, N., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an increasing problem in a diabetic foot clinic.* Diabet Med, **1999**. **16**(9): p. 767-71.
- 29. Schultz, G.S., et al., *Wound bed preparation: a systematic approach to wound management*. Wound Repair Regen, **2003**. **11 Suppl 1**: p. S1-28.
- 30. Schmidt, K., et al., *Bacterial population of chronic crural ulcers: is there a difference between the diabetic, the venous, and the arterial ulcer?* Vasa, **2000**. **29**(1): p. 62-70.
- Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. Diabetes Care, 1999. 22(8): p. 1354-60.
- 32. Douglas, W.S. and N.B. Simpson, Guidelines for the management of chronic venous leg ulceration. Report of a multidisciplinary workshop. British Association of Dermatologists and the Research Unit of the Royal College of Physicians. Br J Dermatol, 1995. 132(3): p. 446-52.
- 33. Bendy, R.H., Jr., et al., *Relationship of Quantitative Wound Bacterial Counts to Healing of Decubiti: Effect of Topical Gentamicin.* Antimicrob Agents Chemother (Bethesda), **1964**. **10**: p. 147-55.
- 34. Robson, M.C., *Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria.* Surg Clin North Am, **1997**. **77**(3): p. 637-50.
- 35. O'Meara S, Systemic review of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. Health Technol Assessment **2000**. **4**: p. 1-237.
- 36. Tammelin, A., C. Lindholm, and A. Hambraeus, *Chronic ulcers and antibiotic treatment*. J Wound Care, 1998. 7(9): p. 435-7.
- 37. Jeffcoate, W.J. and K.G. Harding, *Diabetic foot ulcers*. Lancet, **2003**. **361**(9368): p. 1545-51.
- 38. Edmonds, M.E., *Early use of antibiotics should not be ruled out*. Diabetic Foot **1999**. **2**: p. 135-8.
- 39. Hutchinson, A., McIntosh, A., Feder, G., et al., *Clinical Guidelines and Evidence Review for Type 2 Diabetes: Prevention and Management of Foot Problems.* 2. Royal College of General Practitioners, London, UK., **2000**.
- 40. Hernandez, R., *The use of systemic antibiotics in the treatment of chronic wounds*. Dermatol Ther, **2006**. **19**(6): p. 326-37.
- 41. Damour, O., et al., *Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes.* Burns, **1992**. **18**(6): p. 479-85.
- 42. Niedner, R., *Experimentelle Beeinflussung der Wundheilung durch lokale antimikrobielle Substanzen*. Zbl Haut Geschlechtskr, **1993**. **162**: p. 647-657.
- 43. Thomas, G.W., et al., *Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics*. J Trauma, **2009**. **66**(1): p. 82-90; discussion 90-1.
- 44. Newgreen, D.F., et al., *Ultrastructural and tissue-culture studies on the role of fibronectin, collagen and glycosaminoglycans in the migration of neural crest cells in the fowl embryo.* Cell Tissue Res, **1982**. **221**(3): p. 521-49.
- 45. Donaldson, D.J. and J.T. Mahan, *Epidermal cell migration on laminin-coated substrates. Comparison with other extracellular matrix and non-matrix proteins.* Cell Tissue Res, **1984**. **235**(2): p. 221-4.
- 46. Thomas, L., et al., *CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate.* J Cell Biol, **1992**. **118**(4): p. 971-7.
- 47. Entschladen, F., et al., *Analysis methods of human cell migration*. Exp Cell Res, 2005. 307(2): p. 418-26.

- 48. Keese, C.R., et al., *Electrical wound-healing assay for cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**. **101**(6): p. 1554-9.
- 49. Liao, G., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen, Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. J Cell Sci, 1995. 108 (Pt 11): p. 3473-83.
- 50. Kornyei, Z., et al., *Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury*. J Neurosci Res, **2000**. **61**(4): p. 421-9.
- 51. Fahmy, R.G. and L.M. Khachigian, *Antisense Egr-1 RNA driven by the CMV promoter is an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation and regrowth after injury.* J Cell Biochem, **2002. 84**(3): p. 575-82.
- 52. Watanabe, M., et al., *Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding*. Invest Ophthalmol Vis Sci, **2003**. **44**(8): p. 3332-8.
- Fischer, E.G., A. Stingl, and C.J. Kirkpatrick, *Migration assay for endothelial cells in multiwells. Application to studies on the effect of opioids.* J Immunol Methods, 1990. 128(2): p. 235-9.
- 54. Zigmond, S.H. and J.G. Hirsch, *Leukocyte locomotion and chemotaxis*. *New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor*. J Exp Med, **1973**. **137**(2): p. 387-410.
- 55. Zahm, J.M., et al., *Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium*. Cell Motil Cytoskeleton, **1997**. **37**(1): p. 33-43.
- 56. Aix Scientifics® CRO, A., B.R.Deutschland. 'fences' ein Zell-Migrations-Assay in 24well-Zellkulturplatten. 1997-2009 26.03.2009 [cited; Available from: http://aixscientifics.de/de/fences.html.
- 57. Rittie, L. and G.J. Fisher, *Isolation and culture of skin fibroblasts*. Methods Mol Med, **2005**. **117**: p. 83-98.
- 58. *Fachinformation der jeweiligen Antibiotika*, ROTE LISTE®
- 59. Siddiqui, A.R. and J.M. Bernstein, *Chronic wound infection: facts and controversies*. Clin Dermatol. **28**(5): p. 519-26.
- 60. Siddiqui, A.R. and J.M. Bernstein, *Chronic wound infection: facts and controversies*. Clin Dermatol, **2010**. **28**(5): p. 519-26.
- 61. Ryan, D.M., O. Cars, and B. Hoffstedt, *The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues.* Scand J Infect Dis, **1986**. **18**(5): p. 381-8.
- 62. Bergan, T., *Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics*. Rev Infect Dis, **1981**. **3**(1): p. 45-66.
- 63. Roberts, T.L., 3rd, J.W. Futrell, and M.A. Sande, *Antibiotic penetration into normal and inflamed tissues as reflected by peripheral lymph*. Ann Surg, **1979**. **189**(4): p. 395-403.
- 64. Wise, R., et al., *The influence of protein binding upon tissue fluid levels of six betalactam antibiotics.* J Infect Dis, **1980**. **142**(1): p. 77-82.
- 65. Ryan, D.M. and O. Cars, *A problem in the interpretation of beta-lactam antibiotic levels in tissues*. J Antimicrob Chemother, 1983. **12**(3): p. 281-4.
- 66. Blanchard, P., M. Rudhardt, and J. Fabre, *Behaviour of doxycycline in the tissues*. Chemotherapy, **1975**. **21 Suppl 1**: p. 8-18.
- 67. Cars, O. and S. Ogren, *Antibiotic tissue concentrations: methodological aspects and interpretation of results.* Scand J Infect Dis Suppl, **1985**. **44**: p. 7-15.
- 68. Sauermann R., M.M., Joukhadar C., *Penetration von Antibiotika in das schwer erreichbare Kompartiment*. Chemotherapie Journal, **2005**. **14. Jahrgang**: p. 74-78.
- 69. Roberts, J.A. and J. Lipman, *Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient*. Crit Care Med, **2009**. **37**(3): p. 840-51; quiz 859.

- 70. Brunner, M., et al., *Distribution and antimicrobial activity of ciprofloxacin in human soft tissues*. Antimicrob Agents Chemother, **1999**. **43**(5): p. 1307-9.
- 71. Muller, M., et al., *Penetration of ciprofloxacin into the interstitial space of inflamed foot lesions in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients*. Antimicrob Agents Chemother, **1999**. **43**(8): p. 2056-8.
- 72. Fresenius, K., Fachinformation Ciprofloxacin Infusionslösung. 2006, ROTE LISTE®
- 73. Stevens, D.L., *The role of vancomycin in the treatment paradigm*. Clin Infect Dis, **2006**. **42 Suppl 1**: p. S51-7.
- 74. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Vol. 2. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- 75. Daschner, Antibiotika am Krankenbett. Vol. 15: Springer Verlag.
- 76. Fatol, A., *Fachinformation Streptofatol*. **2007**, ROTE LISTE®.
- 77. Fresenius, K., Fachinformation Clindamycin Infusionslösung. 2008, ROTE LISTE®
- 78. Lüllmann, *Pharmakologie und Toxikologie*: Springer Verlag.
- 79. Joukhadar, C., et al., *Penetration of moxifloxacin into healthy and inflamed subcutaneous adipose tissues in humans*. Antimicrob Agents Chemother, **2003**. **47**(10): p. 3099-103.
- 80. Bayer, Fachinformation Avalox Infusionslösung. 2009, ROTE LISTE®
- 81. Jacobsen, F., et al., *Efficacy of topical delivered Moxifloxacin against MRSA and Pseudomonas aeruginosa wound infection*. Antimicrob Agents Chemother.
- 82. Weiss, T., et al., Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. Antimicrob Agents Chemother, **2004**. **48**(6): p. 1974-82.
- 83. Choi, J.H., et al., *Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells*. Antimicrob Agents Chemother, **2003**. **47**(12): p. 3704-7.
- 84. Chantelau, E., *[Pathogenesis of diabetic foot disease]*. Internist (Berl), **1999**. **40**(10): p. 994-1001.
- Turner, J.L. and E.L. Bierman, *Effects of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth-muscle cells*. Diabetes, 1978. 27(5): p. 583-8.
- 86. Hehenberger, K. and A. Hansson, *High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors.* Cell Biochem Funct, **1997**. **15**(3): p. 197-201.
- 87. Loots, M.A., et al., *Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation*. Arch Dermatol Res, **1999**. **291**(2-3): p. 93-9.
- 88. Pickard, M.R. and J.N. Hawthorne, *Does myo-inositol specifically interact with brain microtubules?* FEBS Lett, **1978**. **93**(1): p. 78-80.
- 89. Lan, C.C., et al., *Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes.* Br J Dermatol, **2009. 160**(6): p. 1206-14.
- 90. Lan, C.C., et al., *Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes.* Br J Dermatol, **2008. 159**(5): p. 1103-15.
- 91. Molan, P.C. and J.A. Betts, *Clinical usage of honey as a wound dressing: an update.* J Wound Care, **2004**. **13**(9): p. 353-6.
- 92. Jull, A.B., A. Rodgers, and N. Walker, *Honey as a topical treatment for wounds*. Cochrane Database Syst Rev, **2008**(4): p. CD005083.

- 93. Mendez, M.V., et al., *Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence.* J Vasc Surg, **1998**. **28**(5): p. 876-83.
- 94. Vasquez, R., et al., *Proliferative capacity of venous ulcer wound fibroblasts in the presence of platelet-derived growth factor*. Vasc Endovascular Surg, **2004**. **38**(4): p. 355-60.
- 95. Hehenberger, K., et al., Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of l-lactate. Wound Repair Regen, **1998**. **6**(2): p. 135-41.
- 96. Hehenberger, K., et al., *Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin.* J Dermatol Sci, **1998**. **16**(2): p. 144-51.
- 97. Raffetto, J.D., et al., *Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid.* J Vasc Surg, **2001**. **33**(6): p. 1233-41.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.