
Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Standardisierter Vergleich mehrerer Wundtherapeutika sowie
Etablierung eines semiquantitativen Verfahrens zur
Wundkeimzahlbestimmung im porcinen Großtiermodell der
infektionsbedingten Wundheilungsverzögerung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Nwaka Cynthia Gbenoba

2014

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

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Sascha Flohé

Korreferent: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Zusammenfassung

In der westlichen Welt leiden circa 1-1,5% der Bevölkerung an chronischen, nicht spontan heilenden Problemwunden. Die heute kaum mehr überschaubare Anzahl an Wundauflagen und der Mangel an einer vergleichenden Datenlage macht die effektive Versorgung dieser schlecht heilenden, zumeist infizierten Wunden für Ärztinnen und Ärzte nahezu aller Fachdisziplinen zu einer der zentralen Problematiken im klinischen Alltag. In dieser tierexperimentellen Studie wurde ein porcines Wundheilungsmodell entwickelt, um in dieser, aber auch in zukünftigen Studien, die spezifische Wirkung verschiedener Wundtherapeutika auf den Heilungsprozess hinsichtlich verschiedener Aspekte standardisiert vergleichen und objektiv bewerten zu können.

Auf den Rücken von insgesamt 14 Münchener Miniaturschweinen wurden *paraspinal* jeweils acht zirkuläre Vollhautwunden mit einem Durchmesser von je 4 cm gesetzt. Während eines Beobachtungszeitraums von 14 bzw. 24 Tagen wurde an jedem dritten bzw. vierten Tag ein Verbandswechsel durchgeführt und Proben zur Verlaufskontrolle gewonnen. Zur Beurteilung der dermalen Wundheilung wurde die Wundgröße planimetrisch mittels digitaler Fotografien berechnet und die Höhe des proliferierenden Granulationsgewebes anhand entnommener Biopsien histologisch ermittelt. Die bakterielle Besiedlung der Wunden wurde durch eine in dieser Großtierstudie neu etablierte, semiquantitative Methode erfasst. Für diese nicht invasive Keimzählerfassung werden sterile, unbeimpfte BD Sensi-Discs™ Testplättchen für 60 Sekunden auf den Wundgrund aufgebracht. Nach Durchführung einer Verdünnungsreihe und Kultivierung der Bakterien findet die Auszählung der *Colony Forming Units* (CFU) statt. Zudem wurde als Indikator für die Stickstoffmonoxidsynthese der Nitritgehalt im Wundsekret mit Hilfe des Griess'schen Reagenz bestimmt. Zur Einschätzung des Gesundheitszustandes und des Einflusses des operativen Eingriffs auf das Immunsystem der Tiere erfolgte die Erhebung der Leukozytenwerte im Blut.

Ein Modell der verzögerten Wundheilung wurde durch Beimpfung der Wunden mit 500 µl einer *Escherichia coli* Suspension (2×10^7 Keimen/ml) geschaffen. In einem weiteren Schritt wurden die Wundauflagen Mepilex® Ag, Tegaderm™ Alginate, Tegaderm™ Matrix und Tegaderm™ Alginate Ag hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit gegenüber des unbehandelten PU-Schaumverbands Mepilex® (Kontrollgruppe) in diesem porcinen Modell untersucht.

Alle in der Großtierstudie getesteten Wundauflagen, im Besonderen die Alginatverbände, führen zu einer signifikanten Verkleinerung der Wundfläche gegenüber der Kontrollgruppe. Tegaderm™ Alginate Ag hat den größten stimulierenden Effekt auf den Wundverschluss; die Wunden zeigen bis zum 14. Tag im Mittel eine Reduktion der Wundgröße auf 36,20% des Ausgangswerts im Vergleich zu 72,14% bei der Kontrollgruppe. Die deutlichste antimikrobielle Wirkung lässt sich bei Mepilex® Ag erkennen. Es entfaltet frühzeitig seine therapeutische Wirksamkeit, minimiert die bakterielle Besiedlung von Wunden signifikant und nachhaltig. Ein Einsatz dieser Auflagen bei infizierten oder infektionsgefährdeten Wunden ist sinnvoll.

In dieser Arbeit konnte ein porcines Wundheilungsmodell und ein valides Verfahren zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung etabliert werden. Detaillierte Kenntnisse über das Wirkungsprofil diverser Wundauflagen wurden erlangt. Um in Zukunft im klinischen Alltag eine effektive Wundbehandlung im Rahmen des Wundmanagements chronischer Wunden gewährleisten zu können, bedarf es weiterer Forschung und standardisierter Vergleiche der sich ständig weiterentwickelnden Wundtherapeutika.

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillata</i>	cm	Zentimeter
abs	Absorption	cm²	Quadratcentimeter
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>	d	Tag
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	g	Gramm
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	kg	Kilogramm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	l	Liter
HIV	humanes Immundefizienz-Virus	m	Meter
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase	m²	Quadratmeter
KG	Körpergewicht	mg	Milligramm
MMP	Matrix- Metalloproteinasen	min	Minute
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus	ml	Milliliter
NOS	Stickstoffmonoxid- Synthase	mm	Millimeter
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	mM	Millimolar
PHI	polyhydrierte Ionogene	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
PU	Polyurethan	nm	Nanometer
PVP	Polyvinylpyrrolidon	µl	Mikroliter
SEM	<i>standard error of the mean</i>	µm	Mikrometer
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>	µM	Mikromolar
TVA	Tierversuchsanlage	µmol	Mikromol
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken	Ag⁺	Silberion
WUTZ	Großtiermodell zur WUndheilung und infek Tionsbedingten HeilungsverZögerung	CO₂	Kohlenstoffdioxid
		H₃PO₄	Phosphorsäure
		N₂O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
		NaCL	Natriumchlorid
		NaNO₂	Natriumnitrit
		NO	Stickstoffmonoxid
		NO₂⁻	Nitrit
		NO₃⁻	Nitrat
		O₂	Sauerstoff

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wundheilung	2
1.1.1	Aufbau der Haut	2
1.1.2	Phasen der Wundheilung	3
1.1.3	Klassifikation von Wunden	4
1.2	Wundauflagen	6
1.2.1	Feuchte Wundbehandlung	6
1.2.2	Aufgabe des Wundverbandes	7
1.2.3	Kategorien von Wundtherapeutika	8
1.3	Tiermodell	11
1.3.1	Porcines Wundheilungsmodell	11
1.3.2	Modell der verzögerten Wundheilung	12
1.4	Keimzahlerfassung bakteriell besiedelter Wunden	16
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Verwendete Materialien	19
2.1.1	Wundauflagen	19
2.1.2	Materialliste der Operationen und Verbandswechsel	21
2.1.3	Laborverbrauchsmaterialien und -reagenzien	22
2.1.4	Geräte	23
2.1.5	Software	24
2.2	Studiendesign	25
2.2.1	Rahmenbedingungen	25
2.2.2	Versuchstiere	27
2.2.3	Versuchsgruppen	28
2.2.4	Versuchsaufbau	29
2.2.5	Beobachtungsparameter des Heilungsverlaufs	30
2.3	Wundheilungsmodell	32
2.3.1	Operation	32
2.3.2	Verbandswechsel	37
2.3.3	Euthanasie	39
2.4	Materialanalyse	40
2.4.1	Planimetrie	40
2.4.2	Mikrobiologie	40
2.4.3	Histologie	43
2.4.4	Nitritkonzentration im Wundsekret	44
2.4.5	Blutbild	46
2.5	Statistische Methoden	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Beurteilung der Wundgröße / Planimetrie	48
3.1.1	Einfluss der <i>E. coli</i> Suspension auf die Wundfläche	48
3.1.2	Wirkung der Wundauflagen auf die Wundgröße	50
3.2	Mikrobiologische Keimzahlbestimmung	55
3.2.1	Einfluss der <i>E. coli</i> Suspension auf die Keimzahl	55
3.2.2	Wirkung der Wundauflagen auf die Keimzahl	56
3.2.3	Keimspektrum	62
3.3	Dicke des Granulationsgewebes	63
3.3.1	Einfluss der <i>E. coli</i> Suspension auf die Granulation	63
3.3.2	Wirkung der Wundauflagen auf die Granulation	64
3.4	Nitrit	70

3.5	Leukozyten	71
4	Diskussion	73
4.1	Das porcine Wundheilungsmodell	73
4.2	Das Studiendesign	76
4.3	Die semiquantitative Keimzahlbestimmung	78
4.4	Der Einfluss einer vermehrten Keimbesiedlung	81
4.5	Die Wirkung der verschiedenen Wundauflagen.....	87
4.5.1	Mepilex® Ag	87
4.5.2	Tegaderm™ Alginate	88
4.5.3	Tegaderm™ Matrix.....	90
4.5.4	Tegaderm™ Alginate Ag	91
5	Schlussfolgerung	92
6	Literaturverzeichnis	94
7	Abbildungsverzeichnis	104



1 Einleitung

Die Wunde und ihre adäquate Versorgung gehört seit je her zu den zentralen Themen der Medizin. Ärztinnen und Ärzte nahezu aller Fachdisziplinen sehen sich während der alltäglichen Aufgaben sowohl im stationären als auch im ambulanten Bereich mit der Wundbehandlung konfrontiert.

Insbesondere schlecht heilende, oftmals infizierte Problemwunden führen bei Patienten weltweit zu enormen körperlichen Schmerzen, erheblichen Einschränkungen der Mobilität und der Lebensqualität. So leiden in der westlichen Welt in etwa 1-1,5% der Bevölkerung an chronischen, nicht spontan heilenden Wunden, in Deutschland sind es circa 2,5 Millionen Menschen [1]. Die Prävalenz ist in Gruppen bestimmter Grunderkrankungen (z. B. Diabetes mellitus) und im Alter erhöht. In Zukunft ist aufgrund der allgemeinen Bevölkerungsentwicklung mit einer steigenden Inzidenz zu rechnen [2]. Darüber hinaus wird eine optimale Wundtherapie auch aus gesundheitsökonomischer Sicht angestrebt, um die Behandlungskosten in diesem Sektor reduzieren zu können [3].

Die physiologischen Prozesse während der Wundheilung sind Gegenstand vieler aktueller und vergangener Forschungen. Besonders die Erkenntnisse und Fortschritte der letzten Jahrzehnte auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene führten zu einer ständigen Weiterentwicklung verschiedenster Wundtherapeutika [2, 4].

In der Praxis äußert sich dieser Fortschritt in einer kaum mehr überschaubaren Anzahl an Verbandsmaterialien [1]. Ein weiteres Problem ist das Fehlen von evidenzbasierten Leitlinien zur Behandlung von Wunden [5]. Somit werden die Wahl der passenden Wundaufgabe und die damit verbundene effektive Behandlung von Problemwunden im klinischen Alltag zu einer großen Herausforderung.

In dieser experimentellen Studie wird ein porcines Wundheilungsmodell entwickelt, um die therapeutischen Fähigkeiten verschiedener Wundaufgaben bezüglich mehrerer Aspekte standardisiert vergleichen und untersuchen zu können. Auf die mikrobiologische Thematik im Rahmen der Wundheilung wird in dieser Arbeit ein besonderer Fokus gelegt.

1.1 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer physiologischer Prozess zellulärer und biochemischer Ereignisse mit dem Ziel der Wiederherstellung der Integrität des Integuments [6, 7].

1.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut (*Integumentum commune*) ist mit einer Gesamtfläche von 1,6-2 m² das größte Organ des menschlichen Körpers [8]. Sie schützt den Körper vor mechanischen Schäden, vor Infektionen und Strahlung und übernimmt wichtige Aufgaben bei der Temperaturregulation und im Flüssigkeitshaushalt. Des Weiteren dient sie dem Menschen als Sinnesorgan und Energiespeicher [9]. Histologisch lassen sich drei Schichten unterscheiden (Abb. 1.1).

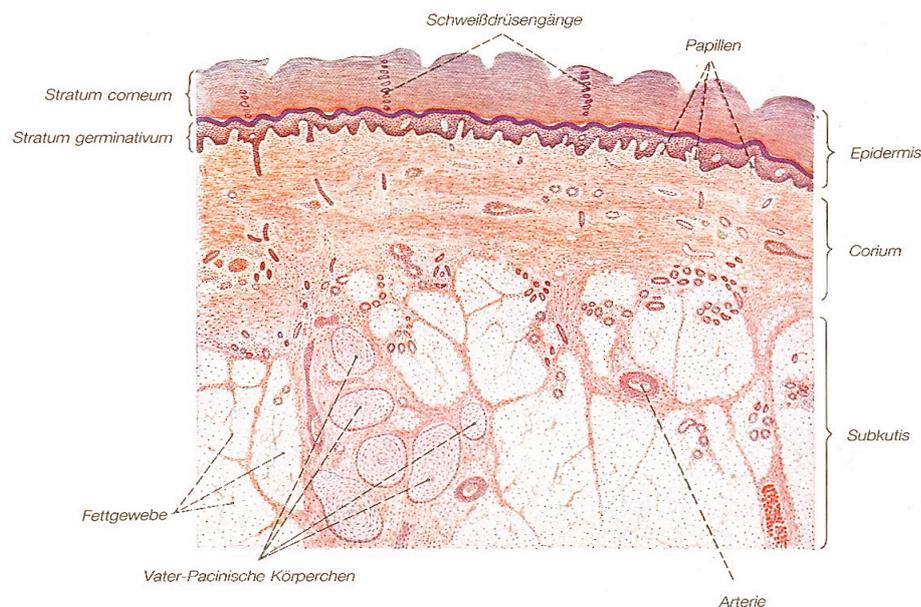


Abb. 1.1 Die drei Schichten der Haut [10]: Die *Epidermis* (Oberhaut) wird von einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel gebildet. Sie wird zusammen mit dem darunterliegenden *Korium* (Dermis, Lederhaut), einem faserreichen, zugfesten Bindegewebe, als *Kutis* (Haut im engeren Sinne) bezeichnet. Die *Subkutis* (Unterhaut) besteht aus Fettgewebe und stellt die Verbindung zur allgemeinen Körperfaszie her [8, 9]. (Hohlhand, Mensch; Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 18fache Vergrößerung)

Die Epidermis, die zu mehr als 90% aus Keratinozyten besteht, unterliegt einer dauernden Erneuerung und wird somit als Proliferationsgewebe bezeichnet [9,

11]. Mikroskopisch lassen sich fünf Schichten unterscheiden, die von den Keratinozyten im Differenzierungsprozess durchlaufen werden (Abb. 1.2).

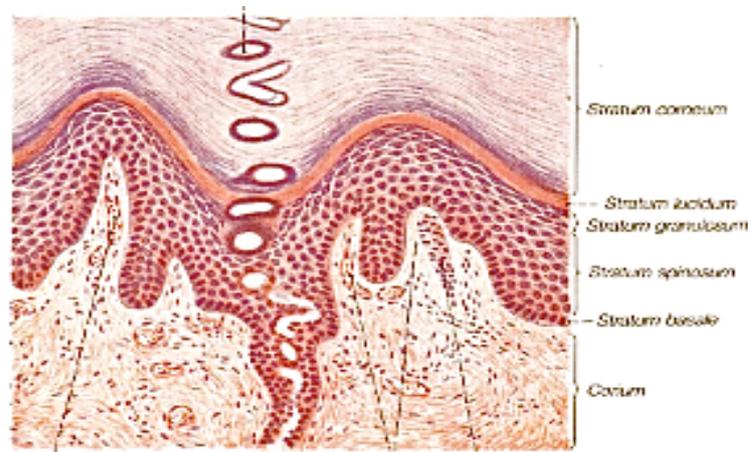


Abb. 1.2 Die Epidermis [10]: Das *Stratum basale* (Basalzellschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), *Stratum lucidum* (helle Schicht) und *Stratum corneum* (Hornschicht) bilden die fünf Schichten der Epidermis. Neben den Keratinozyten finden sich Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen), des Nervensystems (Merkel-Zellen) und pigmentbildende Zellen (Melanozyten). (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 170fache Vergrößerung)

Die fibroelastische Dermis, bestehend aus Fibroblasten, Kollagen- und elastischen Fasern eingebettet in eine dermale Matrix, kann in zwei Schichten unterteilt werden: das schmalere oberflächliche, zellreiche *Stratum papillare* und das basale, faserreiche *Stratum reticulare*.

1.1.2 Phasen der Wundheilung

Heilung wird als komplexer dynamischer Prozess beschrieben, dessen Resultat die Restauration der anatomischen Kontinuität und Funktion ist, wobei das Ergebnis meist weder ästhetisch noch funktionell perfekt ist [12, 13].

Diese Kaskade biologischer und immunologischer Interaktionen lässt sich je nach Schemata in drei [6, 14-19], vier [2, 20-22] oder fünf [23, 24] Phasen einteilen, die fließend ineinander übergehen und sich teilweise überlappen.

Besonders in neueren Publikationen des englischsprachigen Raumes wird die Wundheilung in drei Phasen eingeteilt: Die primäre *Entzündung (Inflammation)* geht über in die Phase der *Gewebsproliferation (Granulation tissue formation)*, gefolgt vom *Gewebsumbau (Tissue remodeling)* (Abb. 1.3) [15, 17, 18, 20].

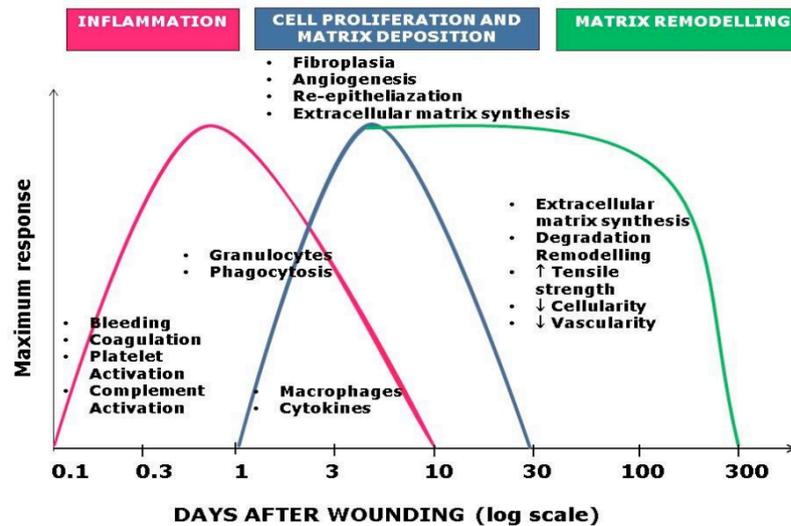


Abb. 1.3 Die drei Phasen der Wundheilung: Mit dem initialen Trauma beginnt die *inflammatorische Phase*, welche wenige Tage andauert. Das primäre Ziel, die Hämostase, wird durch die Aktivierung des Gerinnungssystems und die Invasion von Thrombozyten gewährleistet. Einwandernde neutrophile Leukozyten und Makrophagen übernehmen die Autolyse abgestorbenen Gewebes, die Phagozytose von Zelldebris und Bakterien. Während der *Phase der Gewebsproliferation* wird durch aktivierte Fibroblasten ein hoch vaskularisiertes Granulationsgewebe ausgebildet und der Prozess der Reepithelialisierung findet statt. In der finalen Phase, dem *Gewebsumbau*, kommt es über Monate bis Jahre zur Reorganisation der Kollagenbündel, zur Wundkontraktion und zur Zunahme der Reißfestigkeit des Narbengewebes [18].

Diese sensiblen biologischen Prozesse können nur unter physiologischen Bedingungen, in einem Milieu, in dem aktivierende und inhibierende Faktoren der Wundheilung in einem ausgeglichenen Verhältnis vorhanden sind, ablaufen. Störungen dieses Gleichgewichts, in dieser experimentellen Studie hervorgerufen durch eine vermehrte bakterielle Besiedlung, können zu pathologischen Wundheilungsverläufen führen und sich in überschießenden Reaktionen oder insuffizienten Heilungsergebnissen äußern [20, 25].

1.1.3 Klassifikation von Wunden

Die Wunde lässt sich als eine Durchtrennung der normalen anatomischen Struktur und Funktion definieren [12]. Nach Entstehungsmechanismus und Wundheilungsverlauf lassen sich Wunden in eine von zwei Kategorien einteilen: in die *akute* oder die *chronische Wunde* [12, 22].

Akute Wunden sind Gewebsverletzungen, die durch akute Traumata wie Schnitte, Stiche oder chirurgische Inzisionen hervorgerufen wurden. Es kommt zur *primären Wundheilung*, einem komplikationslosen Heilungsverlauf bei nicht infizierten Wunden mit gut adaptierten Wundrändern. Die beschriebenen

Phasen der Wundheilung (vgl. Kap. 1.1.2) werden innerhalb des erwarteten Zeitfensters nacheinander durchlaufen, die anatomische und funktionelle Integrität wird unter minimaler Bildung an neuem Gewebe wiederhergestellt und die Wunde heilt mit einer kleinen Narbe aus [2, 12, 20, 22, 26, 27].

Bei *chronischen Wunden* kommt es zu Abweichungen von diesem physiologischen Wundheilungsprozess. Sie folgen nicht dem geordneten Ablauf der Wundheilungsphasen, erreichen nicht das erwartete funktionelle und anatomische Restaurationsergebnis oder heilen einfach nicht innerhalb einer bestimmten Zeit. Dieser Zeitraum, der eine Wunde als chronisch klassifiziert, ist nicht definiert und abhängig von den pathologischen Gegebenheiten, dem Status des Patienten und den umgebenden Bedingungen [12, 14]. Je nach Autor werden Wunden, die innerhalb vier Wochen [26] bzw. 30 Tagen [2] keine Heilungstendenz zeigen oder länger als zwei Monate [14] offen bleiben, als chronisch bezeichnet. Neben dieser Heilungsverzögerung werden chronische Wunden von einer Reihe weiterer Charakteristika geprägt. So ist die Ursache chronischer Wunden meist auf systemische und lokale pathologische Verhältnisse zurückzuführen, die direkt oder indirekt die dermale Homöostase beeinflussen und den fein abgestimmten Heilungsprozess stören. Faktoren, wie die bakterielle Besiedlung, die Blutversorgung, die nervale Innervation, metabolische Erkrankungen und ein beeinträchtigt Immunsystem spielen dabei eine große Rolle [2, 14, 24, 28]. Es entwickelt sich die Situation der langwierigeren *sekundären Heilung*. Nachdem der Gewebsdefekt durch Granulationsgewebe ausgefüllt wurde, kann die Reepithelialisierung erfolgen. Es kommt zur großflächigen Narbenbildung [2, 20, 22, 26, 27].

Das größte Wissen, das wir heute über die Physiologie der Wundheilung haben, wurde durch die Forschung an akuten Wundheilungsmodellen erlangt [22]. Die Tatsache, dass die chronische Wunden das große Problem des klinischen Alltags darstellen, führt zur Entwicklung von Tiermodellen wie diesem, die möglichst den verzögerten Heilungsverlauf widerspiegeln sollen.

1.2 Wundauflagen

1.2.1 Feuchte Wundbehandlung

In den letzten Jahrhunderten war der trockene Verband, welcher aus einfachen Geweben wie Baumwollvlies oder Gaze bestand und dessen Aufgabe die Abdeckung der Wunde, die Aufnahme des Exsudats und die Trockenhaltung des Wundgebiets war, der Standard in der Wundversorgung [29-31].

Zu Beginn der 60er Jahre, begonnen mit den Untersuchungen George D. Winter [32] 1962, kam es zu revolutionierenden Erkenntnissen im Bereich der Wundbehandlung und dem optimalen Wundauflagenmaterial. So stellte er in einer porcinen Wundheilungsstudie fest, dass Wunden, die mit einem Polyethylenfilm bedeckt sind und somit feucht gehalten werden, doppelt so schnell epithelialisieren als Wunden, die unter trockenen Bedingungen heilen. Weitere Arbeiten von Winter bestätigten diese ersten Untersuchungen [33-35]. Hinman und Maibach machten 1963 ähnliche Beobachtungen an humaner Haut [36]. In den Folgejahren wurde in weiteren Studien die Effektivität der feuchten Wundbehandlung untersucht [30, 37]. Jüngere Forschungsergebnisse, darunter klinische Studien, Untersuchungen an humanen und porcinen, akuten und chronischen, oberflächlich dermalen und Vollhautwunden, unterstreichen die These einer begünstigten Wundheilung unter feuchten Bedingungen [38-41].

Nach dem aktuellen Stand der Forschung liegen die Vorteile einer Okklusion der Wundfläche und der damit verbundenen feuchten Wundbehandlung in einer beschleunigten Reepithelialisierung, einer signifikant schnelleren Reduktion der Wundfläche, einer Verhinderung der Wundschorfbildung, einer vermehrten Proliferation des Granulationsgewebes, einer Zunahme der Angiogenese und Fibrinolyse, einer Förderung des autolytischen Debridements nekrotischen Materials und einer Vermeidung der Mazeration des umgebenden Gewebes. Darüber hinaus kommt es zu einer Minderung des Wundschmerzes, ansehnlicheren kosmetischen Ergebnissen, einer geringeren Verbandswechsel- und Infektionsrate [18, 31, 41-46].

Dies ist auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene auf einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation, eine vereinfachte Migration der

Zellen, besonders der Keratinozyten, einer erhöhten Konzentration an Leukozyten, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Enzymen und einer Senkung des pH-Wertes im feuchten Wundgebiet zurückzuführen. Die Entzündungs- und Proliferationsphase sind verkürzt, eine schnellere Abnahme an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und ein früheres Auftreten der Fibroblasten und Endothelzellen sind zu verzeichnen. Eine vermehrte Revaskularisierung erfolgt. Es kommt zum frühzeitigeren Auftreten der Remodelingphase [38, 46-48].

Aufgrund dieser Erkenntnisse finden in dieser experimentellen Studie nur Wundauflagen Anwendung, die ein feuchtes Wundmilieu gewährleisten.

1.2.2 Aufgabe des Wundverbandes

Mit den Erkenntnissen der letzten Jahrzehnte begann ein neues Kapitel im Verständnis des Wundheilungsprozesses und des Einflusses der Wundauflagen auf diesen. Dies diente als Grundlage für die Entwicklung differenzierter moderner Wundauflagen und als Ausgangspunkt für die Suche nach einem idealen Wundverband, welche bis heute andauert [5, 49, 50].

Über die Jahre wurden immer neue Anforderungen an eine ideale Wundauflage gestellt. Diese Kriterien beinhalten: Gewährleistung einer hohen Feuchtigkeit im Wundgebiet bei gleichzeitiger Absorption überschüssigen Wundsekrets, Vermeidung von Mazeration und Austrocknung; Stillung von Blutungen; Undurchlässigkeit des Verbandes für Mikroorganismen und Schmutz bei zugleich infektionshemmendem Milieu auf der Wunde; Möglichkeit des Gasaustausches über die semipermeable Membran; Unterstützung beim Wunddebridement; mechanischer Schutz und thermische Isolierung gegen die Umwelt; keine toxischen oder allergenen Eigenschaften; atraumatischer Verbandswechsel; Möglichkeit des Wechsels nach mehrtägigen Intervallen; Linderung des Wundschmerzes, Geruchskontrolle und ein möglichst hoher Tragekomfort für den Patienten; einfache Handhabung der Produkte; gute Kosteneffektivität, Sterilisierbarkeit und eine Transparenz zur permanenten Begutachtung der Wunde wären wünschenswert [5, 18, 24, 29, 46-49, 51, 52]. Hier muss festgehalten werden, dass nicht die eine ideale Wundauflage für alle Wunden und jede Phase des Wundheilungsprozesses existiert. Kein Material zeigt die Intelligenz, die das optimale Mikromilieu für jede Situation schaffen

würde. Die Wundbehandlung muss sich nach den Wundverhältnissen, dem Zustand des Patienten und der aktuellen Heilungsphase richten, wobei das Konzept der feuchten Wundbehandlung überall mit einfließt [5, 47, 49].

1.2.3 Kategorien von Wundtherapeutika

Die Erkenntnisse der vergangenen Jahrzehnte mündeten in einem heute beachtlichen Spektrum an Wundverbänden (2004 waren von über 30 verschiedenen Firmen mehr als 300 unterschiedliche Produkte verfügbar [46]). Diverse Bücher [1, 3] und Fachartikel [5, 47, 53] bieten einen guten Überblick über Präparate, Indikationen und Anwenderhinweise zu Verbandsmaterialien.

Es existiert keine allgemein gültige Klassifikation der verschiedenen, aktuellen Wundauflagen [5]. Einordnungen können anhand der Funktion (z. B. absorbierend, antibakteriell), des Materials (z. B. Alginate, Hydropolymere) oder der physikalischen Form (z. B. Schaum, Gel) erfolgen [23].

1.2.3.1 Traditionelle Wundauflagen

Zu diesen Wundabdeckungen werden die konventionellen Gazen, Mull- und Vliesstoffkompressen gezählt. Sie werden auch als inaktive oder passive Wundauflagen bezeichnet, da sie keine idealfeuchte Wundheilung ermöglichen und somit nicht ein Wundheilung förderndes Mikromilieu schaffen [5, 23].

1.2.3.2 Moderne Wundauflagen

Die modernen Wundauflagen unterteilt man in *interaktive* Wundauflagen, die unter Bildung eines feuchten Milieus günstigere Bedingungen für eine schnelle Heilung schaffen, und *aktive* Wundauflagen, die durch Abgabe spezieller Wirkstoffe aktiv in die Vorgänge des Heilungsprozesses eingreifen [5].

Für diesen praxisorientierten Versuch fiel die Wahl auf unterschiedliche Produkte (vgl. Kap. 2.2.3) der folgenden Kategorien, die sich im klinischen Alltag bewährt haben.

Interaktive Verbände

Hydropolymere sind meist geschäumte Polyurethane, die dreischichtig aufgebaut sind: Die äußere hydrophobe, semipermeable Polyurethanfolie schützt die Wunde vor Nässe und Keimen, lässt jedoch Wasserdampf und Sauerstoff ungehindert durch. Die Kapillarität des zentralen

Polyurethanschaums sorgt für die hohe Absorptionsfähigkeit und die meist mit Polyacryl-Kleber versehene Wundkontaktfläche dient der Fixierung [5, 48].

Bei *Hydrokolloide* handelt es sich um quellfähige Partikel, wie Gelatine oder Cellulose, eingebettet in eine Matrix aus Elastomeren und adhäsiven Materialien. Diese Masse verflüssigt sich bei Kontakt mit dem Wundsekret zu einem viskösen Gel, welches die Wunde schützt. Der Wundabschluss wird auch hier von einer wasserabweisenden Polyurethanfolie gebildet [1].

Hydrogele bestehen aus hydrophilen Polymeren mit bis zu 96%igem Wasseranteil [48]. Sie können zur Rehydratisierung einer trockenen Wunde entsprechend Wasser abgeben und für ein idealfeuchtes Wundklima ohne Mazeration sorgen [1]. Darüber hinaus sind sie jedoch auch in der Lage Detritus und Sekret bis zu Mengen des doppelten Eigengewichts zu absorbieren [5].

Alginate werden aus dem Kalziumsalz der Alginsäure, der Grundsubstanz der Braunalgen, gewonnen. Dieses Polysaccharid kann aufgrund seiner mikrokapillären Faserstruktur und Hydrophilie große Mengen an Sekret aufnehmen [5, 23, 31]. Sobald sie in Kontakt mit natriumhaltigen Flüssigkeiten wie Blut oder Wundexsudat kommen, bilden die Fasern ein Gel, welches ein idealfeuchtes Milieu im Wundgebiet gewährleistet [1]. Hydrogele und Alginate benötigen einen Sekundärverband.

Semipermeable Folienverbände sind dünne (< 0,2 mm), elastische Plastikfilme aus Polyurethan mit einer adhäsiven Seite. Im Gegensatz zu den übrigen Wundauflagen sind sie nicht zur Sekretabsorption befähigt, machen jedoch aufgrund ihrer Transparenz eine Wundbeurteilung zu jeder Zeit möglich [48, 53]. Überschüssige Flüssigkeit kann in Form von Dampf nach außen abgeleitet und ein idealfeuchtes Milieu im Wundgebiet aufrecht erhalten werden [1, 48].

Fast alle zuvor aufgeführten Wundauflagen sind auch als mit Silber imprägnierte Produkte erhältlich [5]. Unter den modernen antiseptischen Wundtherapeutika sind die silberhaltigen die meistverbreiteten. Silberionen sind ein antimikrobielles Agens mit breitem Wirkspektrum und antiinflammatorischen Eigenschaften. Sie wirken auf eine Vielzahl von Pilzen und Bakterien einschließlich der Problemkeime Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistenter Enterokokken

(VRE) [54]. Über eine Hemmung von Enzymfunktionen wird die Atmungskette inhibiert, es kommt zu Schädigung der Zellwand und eine Denaturierung der Nukleinsäure führt zu Störungen bei der Zellteilung [54, 55]. Weitere Vorzüge wie die Hypoallergenität, die geringe Zytotoxizität und die fehlende Resistenzentwicklung erklären die Dominanz der silberhaltigen Produkte gegenüber der lokalen Antibiotikatherapie oder PVP-Jod freisetzenden Antiseptika [1, 5, 55].

Aktive Wundauflagen

Sie gehören zu den jüngsten Entwicklungen im Bereich des Wundmanagements. Die enthaltenen Wirkstoffe beeinflussen gezielt Komponenten des Heilungsprozesses und greifen aktiv in die physiologischen Vorgänge ein. Wachstumsfaktoren wirken zum Beispiel auf Vorgänge wie die Zellteilung, -migration und -differenzierung und beeinflussen somit die zelluläre Proliferation und Aktivität [23]. Eluierte Ascorbinsäure übernimmt wichtige Aufgaben bei der Kollagensynthese und der Immunabwehr [23]. Des Weiteren sind Produkte erhältlich, die Hyaluronsäure enthalten, welche Einfluss auf die Organisation der extrazellulären Matrix und die Phagozytenfähigkeit der Makrophagen hat [5]. Wundauflagen, die an der Regulation der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beteiligt sind, hemmen im Wundbereich die Synthese der MMP [5]. MMP sind matrixabbauende Enzyme, die eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Wundheilung haben, beim initialen Wunddebridement und kontinuierlichen Matrixumsatz während der Heilungsphasen. Ein Überschuss an MMP durch erhöhte oder verlängerte Expression oder ein Mangel an Inhibitoren scheint mit einer Verzögerung und Hemmung des normalen Heilungsprozesses zu korrelieren [6].

1.2.3.3 Lokaltherapeutika und Adjuvantien

Im Rahmen des Wundmanagements können sie die Wundheilung unterstützen. Zu den Lokaltherapeutika gehören unter anderem Wundantiseptika (z. B. Octenisept®-Lösung) und moderne Produkte wie Regranex® Gel, dessen Wirkstoff Becaplermin ein gentechnisch hergestellter Wachstumsfaktor ist (rekombinant human platelet-derived growth factor) und chemotaktisch auf Makrophagen und Fibroblasten wirkt [1, 5]. Adjuvantien wie Fixier- und Hautschutzprodukte verbessern die Effektivität der Primärverbände [3].

1.3 Tiermodell

1.3.1 Porcines Wundheilungsmodell

Dank der Forschung konnten immense Fortschritte beim Verständnis der normalen und verzögerten Wundheilung auf zellulärer und molekularer Ebene verzeichnet werden. Die Mehrheit, der im Zuge dessen entwickelten Wundaufgaben, wurde jedoch bis heute nicht in vergleichenden Studien analysiert [56]. Aufgrund des Mangels an prospektiven, randomisierten Untersuchungen auf diesem Gebiet muss sich der Arzt oder die Ärztin im klinischen Alltag auf die Herstellerangaben verlassen. Um diese Problematik zu lösen, werden in der medizinischen Forschung *in vitro* und *in vivo* Wundheilungsmodelle entwickelt.

Aufgrund der äußeren Gegebenheiten, wie Alter, Ernährungs- und Immunstatus, soziale Faktoren und allgemeiner Gesundheitszustand, kann die jeweilige Wirkung einer Wundbehandlung nur allein am Patienten gezeigt werden [57]. Klinischen Studien am Patienten sind jedoch nicht nur aufgrund ethischer Gesichtspunkte enge Grenzen gesetzt. Meist ist es schwierig eine ausreichende Anzahl an Patienten mit identischen oder ähnlichen Wunden zu rekrutieren. Bei vielen klinischen Studien handelt es sich um reine Anwendungsbeobachtungen. Die objektive Beurteilung ist limitiert, da zum Beispiel histologische Aspekte eine regelmäßige Biopsieentnahme verlangen [58].

In vitro Studien eignen sich besonders die Auswirkungen verschiedener Therapeutika auf einzelne Zellpopulationen isoliert zu betrachten [57]. Doch in keinem *in vitro* Modell lassen sich bis heute die in einem Wundmilieu vorliegende Komplexität und extensiven Interaktionen reproduzieren [59].

Diese Gründe führen zur Entwicklung von Tiermodellen, die der humanen Wundheilung möglichst ähneln und der Untersuchung der multifaktoriellen Prozesse der Wundheilung und dem Vergleich von Wundaufgaben untereinander dienen können. Die Eignung der Schweinehaut als Modell für die humane Wundheilung wurde schon früh untersucht (vgl. Kap. 4.1). Morphologische Gemeinsamkeiten wurden unter anderem in den Jahren 1955 von Hartwell und 1972 von Winter hervorgehoben [60], wohingegen Montagna

und Yun 1964 die Unterschiede zwischen dem porcinen und dermalen Integuments betonten [61]. Es folgten große Studien mit dem Schwein als Wundheilungsmodell. 2001 evaluierten Sullivan et al. 25 verschiedene Wundbehandlungen und zeigten, dass in Studien, welche mit humanen Studien verglichen werden konnten, die Ergebnisse porciner Wundheilungsmodelle eine höhere Übereinstimmung mit menschlichen Studien aufzeigten als die Resultate der Modelle der kleinen Säugetiere [58]. Heute gilt das Schwein aufgrund seiner vielen anatomischen und physiologischen Parallelen zum Menschen, besonders in Bezug auf die relative Dicke der Dermis und Epidermis, die Zellerneuerungsrate, die Anordnung der Bindegewebelemente und der kutanen Blutversorgung als Standardversuchsmodell für humane Wundheilung [56, 62, 63].

Hinzu kommt, dass das Schwein sich aufgrund seiner Größe gut für tierexperimentelle Studien eignet. So bietet der Rücken genug Platz für mehrere Wunden und die Entnahme multipler Proben (Biopsien, Körperflüssigkeiten) über einen längeren Zeitraum ist auch gewährleistet [62, 64]. Die Haltung in entsprechenden Einrichtungen ist gut zu realisieren, und die Kosten sind tragbar.

Bei der Suche nach dem idealen Modell muss bedacht werden, dass keines den Menschen und die Studie an diesem ersetzen kann. Das perfekte Modell existiert nicht, jedoch lassen sich aus porcinen Wundheilungsstudien aufgrund der unzähligen Parallelen wesentliche Elemente für die Wundtherapie am Menschen ableiten. Da wegen der ethischen und praktischen Bedenken viele Wundheilungsstudien am Menschen nicht durchführbar sind, müssen Tiermodelle, lebende Organismen, die dem menschlichen in vielen Aspekten ähneln, herangezogen werden.

Aufgrund dieser Überlegungen, dem großen Angebot unterschiedlicher Wundaufgaben und dem Mangel an einer evidenzbasierten Datenlage entschied sich die Arbeitsgruppe zur Durchführung einer prospektiven tierexperimentellen Studie.

1.3.2 Modell der verzögerten Wundheilung

Die Ursachen schlecht heilender Wunden sind vielfältig. Häufig sind sie auf systemische Grunderkrankungen wie die chronisch venöse Insuffizienz, die

zum Ulcus cruris führt, arterielle Durchblutungsstörungen oder den Diabetes mellitus zurückzuführen. Bei immobilen Patienten können sich Dekubitalulzera entwickeln. Nicht selten kommt es hier zur Entwicklung einer Wundinfektion.

Darüber hinaus kann jedoch auch aus einer akuten Wunde aufgrund von Wundheilungsstörungen eine chronische entstehen. Hier spielen systemische Risikofaktoren, wie das Alter, der Ernährungszustand (Adipositas, Hypoproteinämie), Begleiterkrankungen (Hyperbilirubinämie, Urämie) und das Immunsystem (HIV, Zytostatikatherapie) eine entscheidende Rolle. Doch auch lokale Faktoren wie eine inadäquate postoperative Wundversorgung können eine Wundheilungsstörung verursachen. Eine der Hauptursachen ist hier jedoch die Infektion [65].

1.3.2.1 Von der Kontamination zur Infektion

Eine jede Wunde ist unabhängig von Genese, Größe, Lokalisation und Wundversorgung kontaminiert. Ob sich nun eine manifeste Infektion entwickelt, hängt von der Menge, der Art und der Virulenz des Mikroorganismus, der lokalen Durchblutung sowie des allgemeinen Immunstatus des Patienten ab. So kann eine kontaminierte über eine kolonisierte Wunde in eine lokale oder systemische Infektion münden, welche auch letal enden kann (Abb. 1.4). Nach den fünf typischen Merkmale der Infektion nach Celsus lässt sich die Diagnose klinisch stellen: *Rubor*, *Calor*, *Dolor*, *Tumor* und *Functio laesa*. Diese können durch das Auftreten einer vermehrten Sekretion oder die Bildung eines abnormen Geruchs ergänzt werden und in ihrer Ausprägung stark variieren [2, 66].

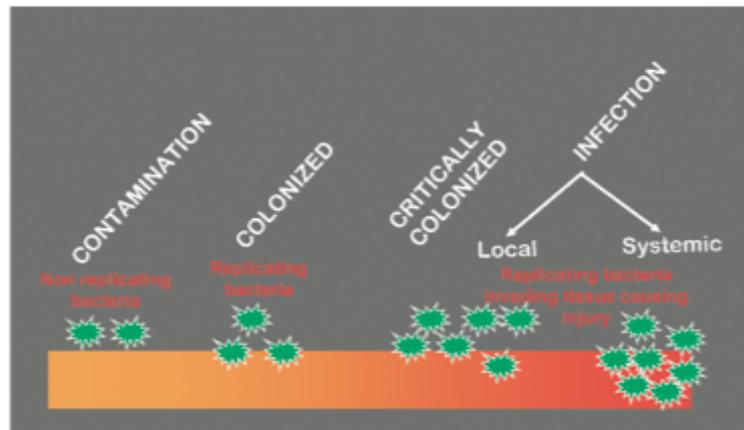


Abb. 1.4 Kontamination-Infektions Kontinuum [54]: Die Kontamination ist definiert als die Anwesenheit nicht-vermehrender Mikroorganismen in der Wunde. Befinden sich replizierende Keime in der Wunde, die jedoch dem Wirt keinen Schaden zufügen, spricht man von einer kolonisierten Wunde. Kolonisation allein verzögert nicht den Wundheilungsprozess. Bei einer lokalen Infektion, auch kritische Kolonisation genannt, scheint das Wundbett aufgrund eindringender Bakterien verändert. Meist fehlen die typischen klinischen Zeichen der Infektion, so dass allein die verzögerte Wundheilung auf diesen Status hindeutet. Eine systemische Infektion bezeichnet eine zunehmende Invasion der sich replizierenden Bakterien mit sich ausbreitendem Gewebsschaden und systemischen Folgen [67].

1.3.2.2 Wundheilung und Bakterien

Die Entzündung ist ein fester Bestandteil des Wundheilungsprozesses (vgl. Kap. 1.1.2 und Abb. 1.3) und Bakterien spielen während der inflammatorischen Phase eine wichtige Rolle. Dabei scheint die Anwesenheit weniger Keime die Wundheilung und die Granulationsgewebsbildung, über eine vermehrte Infiltration von Monozyten und Makrophagen und eine gesteigerte Kollagensynthese, zu beschleunigen [68]. Nimmt jedoch die mikrobielle Besiedlung zu und führt zu einer exzessiven inflammatorischen Reaktion, verlängert sich die inflammatorische Phase und der Wundheilungsprozess wird verzögert [69]. Eine persistente Gegenwart von Bakterien im Wundgebiet soll zu einer verlängerten Erhöhung proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α) führen. Dies mündet unter anderem in einem erhöhten Level an Matrix-Metalloproteinasen mit gleichzeitiger Minderung derer Inhibitoren und einer erniedrigten Produktion an Wachstumsfaktoren [67].

1.3.2.3 *Escherichia coli*

In diesem Tiermodell soll durch die vermehrte bakterielle Besiedlung der Wunden mit *Escherichia coli* (*E. coli*) ein Modell der verzögerten Wundheilung

geschaffen werden, um die klinische Problematik der chronischen Wundheilung aufzugreifen und die Forschung an chronischen Wundheilungsmodellen zu forcieren. *E. coli* ist ein gramnegatives, peritrich begeißeltes und bewegliches Stäbchen und gehört als klassischer Fäkalkeim zur physiologischen Darmflora des Menschen [70]. Bei Verschleppung des Keims in Wundgebiete kann *E. coli* neben anderen Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken Wundinfektionen hervorrufen [71].

1.3.2.4 Weitere Modelle der verzögerten Wundheilung

In der Literatur finden sich diverse Wundheilungsmodelle, wobei die meisten aktuell vorhandenen mehr den akuten Wundheilungsverlauf repräsentieren [72]. In unterschiedlichen Modellen der verzögerten Wundheilung, die ähnlich diesem entwickelt wurden, um Bedingungen zu schaffen, die möglichst die klinischen Konditionen chronischer Wunden wiedergeben, wurden die Wundzonen vor Setzung der Hautdefekte röntgenologisch bestrahlt [56, 72]. In einem weiteren Beispiel wurden Ulzera durch die intrakutane Injektion des Sklerosierungsmittels Natrium Tetradecyl Sulfat erzeugt [73]. Ein porcines Modell erhielt durch die Minderung der dermalen Durchblutung ischämisch hypoxische Bedingungen im Wundgebiet [74]. Bei anderen Modellen wurde durch eine intravenöse Gabe von Streptozotocin, einem auf die insulinbildenden Betazellen des Pankreas toxisch wirkenden Medikaments, eine diabetogene Stoffwechsellage initiiert [75]. Hirsch et al. kombinierten die erhöhten Glucosespiegel mit der Beimpfung der Wunden mit einer definierten *Staphylococcus aureus* Suspension [76]. Wright et al. benutzten eine Bakteriensuspension von *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium sp.* und koagulasenegativen Staphylokokken als Inokulum [77].

1.4 Keimzahlerfassung bakteriell besiedelter Wunden

Keine Wunde ist steril. Sie bieten einen ausgezeichneten Nährboden für Mikroorganismen [78]. Hohe Level an Bakterien in einer Wunde führen nicht nur zu einer Infektion, sondern können auch ohne die klinischen Zeichen einer Infektion zur verzögerten Wundheilung führen [67, 79], so zum Beispiel bei Patienten mit diabetischem Fußulcus und Vorliegen einer Polyneuropathie. Eine vermehrte bakterielle Besiedlung äußert sich in diesem Fall nur durch eine unerklärte Wundheilungsverzögerung [67, 80]. Hier kann eine mikrobiologische Probe vom Wundgrund zur Bestimmung der Keimzahl Aufschluss geben. Des Weiteren bietet eine effiziente Erhebung der bakteriellen Besiedlung eine Orientierung bei der Einschätzung der Wirksamkeit einer lokalen antiseptischen Behandlung und einer systemischen Antibiotikatherapie. Auch helfen Kenntnisse über die mikrobielle Besiedlung weiter, wenn der richtige Zeitpunkt zum Wiederverschluss einer infizierten Wunde oder für eine Hauttransplantation gefunden werden soll [81]. Zuletzt ist in der Praxis ein Verständnis des bakteriellen Wachstums einer Wunde wichtig für die Risikoeinschätzung eines Patienten für die Entwicklung einer Wundinfektion [82]. Vermehrte Keimzahlen sind hier ein entscheidender Prädiktor und können und sollten gemessen werden, um den Prozess hin zur Infektion frühzeitig aufzuhalten [83].

Auch in der Forschung spielt die effektive Erfassung der Keimzahl eine entscheidende Rolle. Die Behandlung kontaminierter Wunden wird noch heute kontrovers diskutiert [59]. Dies ist unter anderem auf einen Mangel an *in vivo* Studien, die die Wirksamkeit antiseptischer Behandlungen analysieren, zurückzuführen [84]. Antiseptische Wundauflagen übernehmen besonders bei lokal begrenzten Infektionen, antibiotikaresistenten Bakterien oder Patienten, bei denen die periphere Durchblutung kompromittiert und die damit verbundenen suffiziente Penetration des Antibiotikums nicht gewährleistet ist, eine entscheidende Funktion [82]. Die Wirkung der unterschiedlichen antimikrobiellen Wundauflagen sollte im Besonderen in Hinblick auf die Fähigkeit zur Reduktion der Keimzahl verglichen werden. Dazu wird ein standardisiertes Verfahren zur Erhebung der Keimmenge benötigt.

Für die mikrobiologische Analyse einer Wunde finden sich in der Literatur unzählige Probenentnahme-, Aufbereitungs- und Auswertungstechniken, inklusive quantitativer Kulturen von Gewebsbiopsien und semiquantitativer und qualitativer Kulturen von unterschiedlichen Materialien. Zur Probengewinnung eignen sich Wundabstriche, eine Dermabrasion, die Aspiration von Eiter oder Wundexsudat und auch die Anwendung absorbierender Polster [65, 80].

In mehreren Studien wurde eine Korrelation zwischen nicht invasiven, oberflächlichen Methoden zur kulturellen Bestimmung der Keimzahl und aus Gewebsbiopsien gewonnenen Kulturen aufgezeigt. So scheinen quantitative Analysen von oberflächlichen Geweben auch zur Einschätzung des Risikos, eine Wundinfektion zu entwickeln, herangezogen werden zu können [85]. Bei der Bestimmung der Konzentration an Mikroorganismen in einer Wunde stellte Thomson et al. (1990) zwischen semiquantitativen Abstrichen und quantitativen Biopsien eine lineare Relation fest [86]. Bouza et al. (2004) konnten in ihrem experimentellen Versuch eine gute Korrelation zwischen einer einfachen semiquantitativen kulturellen Technik zur Keimzahlbestimmung und der Diagnose der postoperativen Wundinfektion aufzeigen [87].

In dieser tierexperimentellen Studie fand ein neues Verfahren zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung dermalen Wunden Anwendung. In der Literatur war keine Methode vorhanden, die den Anforderungen dieses Versuchs gerecht wurde, so dass man sich für die Entwicklung eines neuen, möglichst wissenschaftlich valideren Verfahrens entschied. Dieses sollte in Klinik, humanen sowie tierexperimentellen Studien anwendbar sein. Dabei wurde berücksichtigt, dass Methoden zur Quantifizierung von Bakterien strikt standardisiert ablaufen müssen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können [88].

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

In den vergangenen Dekaden erlangte die Forschung im Bereich der dermalen Wundheilung viele neue Erkenntnisse. Trotz dessen und auch gerade wegen dieser immensen Entwicklungen blieb noch vieles ungeklärt. Die Entscheidung der optimalen Wundbehandlung im klinischen Alltag wird aufgrund des Fehlens einer evidenzbasierten Leitlinie und einer entsprechenden Datenlage meist auf Basis persönlicher Empirie getroffen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Schaffung eines Wundheilungsmodells, mit dessen Hilfe in dieser, aber auch in zukünftigen Studien Wundauflagen und deren spezifische Wirkung auf einen verzögerten Wundheilungsprozess reproduzierbar und standardisiert anhand unterschiedlicher Kriterien verglichen und objektiv bewertet werden können.

Da die unkontrollierte bakterielle Besiedlung einer Wunde zu einer der Hauptursachen der Wundheilungsstörungen, der Wundinfektion, führt und Wundauflagen in Forschung und Praxis mit einfachen Mitteln hinsichtlich ihrer bakteriziden Wirkung untersucht werden können sollten, war die Etablierung eines neuen Verfahrens zur nicht invasiven, semiquantitativen Keimzahlbestimmung ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

In einem ersten Schritt dieser tierexperimentellen Studie befasst man sich mit der Frage nach dem normalen Verlauf des porcinen Wundheilungsprozesses, um diesen als Vergleichsmöglichkeit zu haben. In weiteren Untersuchungen soll durch Applikation einer definierten Bakteriensuspension eine Verzögerung der Wundheilung aufgezeigt werden. Im Anschluss findet ein Vergleich verschiedener, etablierter Wundauflagen statt. Es wird sich mit der Frage auseinandergesetzt, inwieweit spezielle Wundauflagen Einfluss auf die Aspekte Wundgröße, Keimzahl, Höhe des Granulationsgewebes und Nitritgehalt des Wundsekrets nehmen und die Wundheilungsverzögerung rückgängig machen können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Wundauflagen

Im Folgenden wird ein Überblick über die in dieser experimentellen Studie verwendeten Wundauflagen gegeben.

2.1.1.1 Mepilex®

Mepilex® ist ein silikonbeschichteter Polyurethan-Schaumverband, der die Absorption des Exsudats übernimmt und für die Aufrechterhaltung eines feuchten Wundmilieus sorgt. Nach Herstellerangaben vermindert die Safetec® Technologie auf der Wundseite das Mazerationsrisiko und ermöglicht einen atraumatischen Verbandwechsel. Der oberflächliche, wasserabweisende Polyurethanfilm ist wasserdampf-durchlässig, bietet jedoch eine Barriere für Viren und Bakterien.

2.1.1.2 Mepilex® Ag

Mepilex® Ag enthält 1,2 mg/cm² Silber in Silbersulfatverbindungen. Es kombiniert somit die strukturellen Eigenschaften des Mepilex® mit der antimikrobiellen Wirkung der sich in Kontakt mit Wundexsudat freisetzenden Silberionen. Laut Hersteller wird ein weites Spektrum wundspezifischer Erreger innerhalb 30 Minuten und bis zu 7 Tagen inaktiviert. Es ist für die Behandlung kritisch kolonisierter Wunden geeignet.

2.1.1.3 Mepilex® Lite

Mepilex® Lite ist ein dünnerer silikonbeschichteter Polyurethanschaum, der Anwendung bei leicht exsudierenden Wunden findet. Die gleiche Beschaffenheit wie beim Mepilex® minimiert das Risiko der Mazeration des wundumgebenden Bereichs. Gleichzeitig kann es dem Schutz geschädigter Haut dienen.

Die oben aufgelisteten Mepilex® Verbände sind Produkte der Mölnlycke Healthcare GmbH, Erkrath.

2.1.1.4 Tegaderm™ Alginate

Tegaderm™ Alginate ist eine Kalziumalginat-Kompresse aus reinen schottischen Braunalgen. Es reagiert mit dem Wundexsudat zu einer gallertartigen Masse, die autolytisches Debridement fördert und ein feuchtes Milieu sicherstellt. Der Verband zeichnet sich durch seine Strukturfestigkeit aus und lässt sich laut Hersteller in einem Stück wieder entfernen. Aufgrund seiner hohen Absorptionsfähigkeit eignet es sich für die Anwendung bei mittelstark bis stark exsudierenden, granulierenden und infizierten Wunden.

2.1.1.5 Tegaderm™ Alginate Ag

Tegaderm™ Alginate Ag besteht aus sterilem Kalziumalginat, Carboxymethylcellulose und einem ionischen Silberkomplex (Silber-Natriumhydrogen-Zirkoniumphosphat). Zu der strukturellen Beschaffenheit des Tegaderm™ Alginate kommt hier die antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen. Nach Herstellerangaben bietet es eine effektive Barriere gegen mikrobielle Kontamination. Eine Indikation für die Silberionen freisetzende Wundauflage ist bei erhöhter Infektionsgefahr und infizierten Wunden gegeben.

2.1.1.6 Tegaderm™ Matrix

Bei Tegaderm™ Matrix handelt es sich um ein Gitternetz, das mit einer speziellen Mischung gepufferter Spurenelemente (polyhydrierte Ionogene = PHI™) beschichtet ist. Diese sollen effektiv ein gegebenenfalls vorhandenes Proteasenungleichgewicht und eine Mikromilieuverschiebung in der Wunde normalisieren, indem es die Produktion der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) reguliert. Somit soll die schnellere Heilung chronischer Wunden unterstützt und die Reepithelialisierung erleichtert werden.

2.1.1.7 Tegaderm™ Roll

Tegaderm™ Roll ist ein Transparenzverband, der sich je nach Bedarf zuschneiden lässt. Es bietet eine Barriere für Bakterien, ist zugleich wasserdicht und atmungsaktiv. Laut Hersteller eignet es sich hervorragend zur Fixierung von Primärverbänden.

Die im Rahmen moderner Wundversorgung entwickelten Tegaderm™ Wundtherapeutika sind Produkte der 3M Deutschland GmbH, Neuss.

2.1.2 Materialliste der Operationen und Verbandswechsel

5%ige Glucose Infusionslösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Atropin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Azaperon	Janssen Animal Health, Bad Homburg
BD Vacutainer® Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BIOPSY PUNCH	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Carprofen	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Diazepam	ratiopharm GmbH, Ulm
Einmalskalpell	Feather® Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Fleece-Hundedecke Cosy	Felix Bühler AG, Muhen, Schweiz
HiBiSCRUB®	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Unterfeldhaus
Insulinspritze Omnifix® Duo (1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München-Riem
Kanüle Sterican® G20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketamin	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Leukotape® classic	BSN medical GmbH, Hamburg
Meloxicam	Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim am Rhein
Monocryl® 6-0	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt
Octenisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Pentobarbital	Merial GmbH, Hallbergmoos
Piritramid	Janssen Animal Health, Bad Homburg
Prolene® 2-0	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt
Sprühpflasterspray	Sportymed, Herisau, Schweiz
Thiopental	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg am Breisgau
Vasofix® Braunüle® 20G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

2.1.3 Laborverbrauchsmaterialien und -reagenzien

0,45%ige NaCl Lösung	A. dest. mit NaCl der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4%ige Formaldehyd Lösung	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
96 Well PS Microplatte, U-Boden, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
A. dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BD Sensi-Disc™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Columbia Agar	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Cryo.s™ Röhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckglas (24x50 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Einbettungskassette	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Eosin Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
GIBCO® DPBS	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Grieß'sche Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HistoBond® Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Impföse	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MacConkey Agar	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
NaNO ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Peha Wattestäbchen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Petrischale	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Reagenzglas (5 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß (2 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
TipOne® Pipettenspitzen (1250 µl)	STARLAB GmbH, Ahrensburg
TipOne® Pipettenspitzen (200 µl)	STARLAB GmbH, Ahrensburg

XyloI AnalaR NORMAPUR®	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturröhrchen (12 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.4 Geräte

Achtkanalpipette (50-300 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454, USA
Bunsenbrenner Fireboy® eco	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Canon Digital IXUS 85IS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Densitometer DensiChek®	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Dispensor Dispensette®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
EKG cardiofax V	NIHON KOHDEN EUROPE GmbH, Rosbach v.d.H.
Finnpipette® (2-20 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454, USA
Finnpipette® (200-1000 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454, USA
Gram-Färbeautomat	Wescor, Inc., Logan, UT 84321, USA
Kleintierschermaschine Aesculap Favorita II	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen
Kühlschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikroskop Axioskop 20	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Mikrotom	pfm medical ag, Köln
Narkosebeatmungsgerät	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
Objektiv (1,25x)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Paraffinausgießstation Histocentre™ 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454, USA
Stanze	Hr. R. Macit, HAWE Hydraulik SE, München
Tissue-Tek® Eindeckautomat	Sakura Finetek Germany GmbH,

Tissue-Tek [®] VIP [®] Gewebsentwässerungsautomat	Staufen Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Vet abc [™]	scil animal care company, Gurnee, IL 60031, USA
Victor ^{3™} Spektrophotometer	PerkinElmer, Rodgau
Vierkanalpipette (5-50 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454, USA
VITEK [®] mit Smart Carrier Station [™]	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

2.1.5 Software

AxioVision Rel. 4.7	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Excel [™] 2008	Microsoft [®] Corporation, Redmond, WA 98052, USA
GraphPad Prism [®]	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA
JalomedWD	Jalomed GmbH, München
LEAN.pack Komplettlösung	LEAN GmbH, Düsseldorf
Sun Secure Global Desktop (SSGD)	Oracle Corporation, Redwood Shores, CA 94065, USA

2.2 Studiendesign

2.2.1 Rahmenbedingungen

Die Tierversuche wurden in der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter tierärztlicher Leitung von PD Dr. Martin Sager durchgeführt. Hier wurden uns neben den Räumlichkeiten auch diverse Materialien und Geräte zur Verfügung gestellt, die für die Durchführung des Versuchs und insbesondere für die Aufrechterhaltung der Narkose notwendig waren. Darüber hinaus fand dort die Bestimmung der Blutwerte statt.

Von dem zell- und molekularbiologischen Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf aus erfolgte das Gros der Planung und Organisation. Neben der Asservation der Proben fanden an diesem Ort die Analyse des Wundsekrets und die Arbeiten am Mikroskop, wie zum Beispiel die Bestimmung der Granulationshöhe, statt.

Die mikrobiologischen Aspekte dieses Projektes entstanden in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Labore und jegliche Materialien und Geräte für die Versuchsdurchführung wurden zur Verfügung gestellt. Prof. Dr. Colin R. MacKenzie wirkte entscheidend bei der Entwicklung der Idee der semiquantitativen Keimzahlbestimmung mit, betreute die Durchführung der Untersuchungen und übernahm die mikrobiologische Beratung während des gesamten Experiments.

Im Labor des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden die histologischen Schnitte angefertigt und gefärbt.

Das Projekt war eine Gemeinschaftsarbeit der Arbeitsgruppe „WUTZ“ (Großtiermodell zur Wundheilung und infektionsbedingten Heilungsverzögerung) der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Scholz. Dabei übernahm die gesamte Gruppe die Versuchsplanung. Neben Herrn Prof. Dr. med. Sascha Flohé, dem stellvertretenden Direktor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und Doktorvater meiner Arbeit, Herrn Prof. Dr. phil. nat. Martin Scholz, dem Forschungsleiter der Klinik, sowie Frau Dr. med. Ulla Stumpf, der Betreuerin dieser Dissertation, gehörten

Frau Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü, Frau Jutta Schneider und Frau Samira Seghrouchni, Mitarbeiterinnen des zell- und molekularbiologischen Labors der Klinik, zu der Arbeitsgruppe. Das Team setzte sich des Weiteren aus Herrn Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie, Oberarzt am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Herrn PD Dr. med. vet. Martin Sager und Frau Iris Schrey, Angehörige der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zusammen. Neben Frau Senay Macit und mir, den beiden humanmedizinischen Doktorandinnen, gehörte Frau Inga Grehn, Promovendin der Veterinärmedizin, zu den Mitgliedern. In diesem Rahmen wurden bei regelmäßigen Treffen besonders zu Beginn des Projektes die Durchführbarkeit und die Abläufe der einzelnen Arbeitsschritte interdisziplinär diskutiert und geplant.

In den Räumen der Tierversuchsanlage ist ein solches porcines Großtierprojekt nur möglich, wenn ein Team aus wenigen Personen, dessen Mitglieder optimalerweise an den Umgang mit Tieren und die Abläufe in einem Operationssaal gewöhnt sind, bei Versuchsdurchführung zusammenarbeitet. So wurden nach erfolgreicher Teilnahme an einem versuchstierkundlichen Kurs zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes und initialer Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Sascha Flohé die diversen Aufgaben zur Probengewinnung während der Operation und den Verbandswechseln von Frau Inga Grehn, Frau Senay Macit und mir unter Leitung von Frau Dr. med. Ulla Stumpf übernommen.

Im Kontext dieses Projektes sollten insgesamt zwei Dissertationen im humanmedizinischen und eine im veterinärmedizinischen Fachbereich entstehen, wobei jede Promovendin von Beginn an für die Fragestellung ihres Teilbereichs allein zuständig war. Die Bearbeitung und Untersuchungen der spezifischen Proben in den verschiedenen Laboren zur Gewinnung der mikrobiologischen beziehungsweise histopathologischen Ergebnisse, die Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten der jeweiligen Teilgebiete wurden allein vom Verfasser der einzelnen Arbeit individuell durchgeführt, so dass jeder eigenständig die Analyse seines eigenen Forschungsbereichs übernahm.

Ich führte Untersuchungen zur Wundheilung mit vornehmlich mikrobiologischem Fokus durch. Den Einfluss der vermehrten bakteriellen

Besiedlung einer Wunde und die spezifische Wirkung verschiedener Wundtherapeutika auf den Heilungsprozess erhob ich im porcinen Großtiermodell anhand der Parameter Wundgröße, Höhe des Granulationsgewebes, Nitritgehalt im Wundsekret und der Leukozytenwerte im Blut. Gleichzeitig konnte ich ein neues, nicht invasives Verfahren zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung einer Wunde etablieren und mit dieser Informationen über das mikrobiologische Wundmilieu gewinnen, die Daten auswerten und die Ergebnisse interpretieren.

Der Schwerpunkt der Arbeit von Frau Senay Macit lag auf dem histologischen Aspekt der Wundheilung. Zur Beurteilung der Kollagenproliferation, der Zellproliferation, der Inflammation und der Angiogenese wurden Gewebeschnitte mit Masson Trichrome und immunhistochemisch mit Ki-67, Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase und Alpha-Glattmuskel-Aktin gefärbt und ausgewertet.

Frau Inga Grehn beschäftigte sich im veterinärmedizinischen Kontext mit den Möglichkeiten und Grenzen tierexperimenteller Studien und der Etablierung eines reproduzierbaren Tiermodells. Dabei untersuchte sie die Eignung porciner Tierversuche und deren Modellfähigkeit für die dermale Wundheilung aufgrund anatomischer und physiologischer Parallelen und Unterschiede zur humanen Haut. Diese Promotion entsteht am veterinärmedizinischen Lehrstuhl der Justus-Liebig-Universität Gießen in Kooperation mit Herrn PD Dr. med. vet. Martin Sager.

Die Dissertationen von Frau Senay Macit und Frau Inga Grehn sind noch in Bearbeitung und bis zum heutigen Zeitpunkt nicht publiziert.

2.2.2 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde von der Bezirksregierung (LANUV, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt und unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08.294 geführt.

Als Versuchstiere wurden in dieser Studie 14 Münchener Miniaturschweine (Troll®) verwendet, 7 weibliche und 7 männliche. Diese Minipigs, eine Kreuzung aus dem Hanford-Miniaturschwein und dem Kolumbianischen Portionsschwein, werden in der TVA der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf speziell für

experimentelle Zwecke gezüchtet. Die Miniaturschweine werden in Gruppen von bis zu sechs Tieren gehalten. Von Geburt an sind sie durch retroaurikulär platzierte Mikrochips gekennzeichnet.

Das Gewicht der 14 bis 30 Monate alten Tiere lag zwischen 49 und 72 kg. Am Tag der Operation wurden die Minipigs isoliert und waren während des gesamten Beobachtungszeitraums in circa 2,5 x 2,5 m großen Einzelboxen in unmittelbarer Nähe zu den anderen Schweinen untergebracht.

In den klimatisierten Ställen herrschte eine Temperatur von 20 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Die künstliche Beleuchtung erfolgte in einem 12stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, wobei es zwischen 6 und 18 Uhr hell war. Die Tiere erhielten dreimal am Tag ein spezielles Pelletfuttermittel für Minipigs (Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) und gelegentlich Apfelstücke, Kauknochen und Stroh. Wasser stand ihnen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.3 Versuchsgruppen

Alle in dieses Projekt eingeschlossenen Tiere unterliefen vor, während und nach der Operation sowie den Verbandswechseln dem gleichen Prozedere. Nur aufgrund der unterschiedlichen Behandlung der Wunden ließen sich die Minipigs in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 2.1). Die Einteilung in diese Gruppen erfolgte randomisiert.

Zur Etablierung des Wundheilungsmodells dienten drei Schweine (S002, S003, S004). Die Wunden dieser Tiere wurden mit Mepilex®, einem Polyurethan-Schaumverband (PU-Schaumverband), abgedeckt.

Weitere drei Tiere (S005, S006, S007) wurden mit diesem PU-Schaumverband behandelt. Die Wunden erfuhren jedoch während der initialen Operation eine definierte Beimpfung mit *Escherichia coli* Bakterien. Mit Hilfe dieser Gruppe wurde das Modell der verzögerten Wundheilung etabliert. Die Standzeit dieser sechs Tiere betrug 24 Tage.

Bei den übrigen acht Tieren (S008, S009, S010, S011, S012, S013, S014, S015) wurden spezielle Wundtherapeutika im Modell der verzögerten Wundheilung getestet. Bei diesen lag der Beobachtungszeitraum bei nur 14 Tagen. Alle Wunden wurden zu Beginn mit definierten *E. coli* Suspension beimpft. Die Wunden des S008 wurden nun anstelle des normalen Mepilex® mit

Mepilex[®] Ag behandelt. Des Weiteren wurden die Wundflächen des S010 mit Tegaderm[™] Alginate, des S012 mit Tegaderm[™] Matrix und des S013 mit Tegaderm[™] Alginate Ag versehen.

Die Untersuchungen an den weiteren vier Tieren wurden im Rahmen unserer Versuchsreihe durchgeführt, sind jedoch mit Rücksicht auf Übersichtlichkeit und Umfang nicht Gegenstand dieser Arbeit. Den Wunden des Minipigs S009 wurden für eine Dosisfindung verschiedene Konzentrationen an Ascorbinsäure appliziert und Schwein S011 wurde zur Testung eines porcinen PDGF (*platelet-derived growth factor*) und Regranex[®] 0,01% Gel (rekombinantes humanes PDGF) verwendet. Die Wunden des S014 erhielten eine Ascorbinsäure und die des S015 eine Glyzerinsäure eluierende Wundauflage.

Schwein	Beimpfung mit <i>E. coli</i>	Wundauflage	Standzeit	Geschlecht	Gewicht	Alter
S002	-	Mepilex [®]	24 Tage	♂	57kg	447 Tage
S003	-	Mepilex [®]	24 Tage	♀	61kg	484 Tage
S004	-	Mepilex [®]	24 Tage	♂	58kg	490 Tage
S005	✓	Mepilex [®]	24 Tage	♀	49kg	508 Tage
S006	✓	Mepilex [®]	24 Tage	♂	55kg	514 Tage
S007	✓	Mepilex [®]	24 Tage	♀	69kg	850 Tage
S008	✓	Mepilex [®] Ag	14 Tage	♂	66kg	850 Tage
S009	✓	Dosisfindung Ascorbinsäure	14 Tage	♂	71kg	840 Tage
S010	✓	Tegaderm [™] Alginate	14 Tage	♀	72kg	851 Tage
S011	✓	porcines PDGF, Regranex [®]	14 Tage	♀	60kg	587 Tage
S012	✓	Tegaderm [™] Matrix	14 Tage	♀	69kg	582 Tage
S013	✓	Tegaderm [™] Alginate Ag	14 Tage	♂	66kg	582 Tage
S014	✓	Ascorbinsäure	14 Tage	♂	56kg	592 Tage
S015	✓	Glyzerinsäure	14 Tage	♀	58kg	599 Tage

Tabelle 2.1 Übersicht der Versuchstiere: Angaben zu Gewicht und Alter beziehen sich auf den Tag der Operation

2.2.4 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein Tiermodell zur Wundheilung etabliert. Bis auf die einmalige Applikation der *E. coli* Suspension am Operationstag und der Gebrauch von speziellen Wundauflagen bei manchen Tieren war der Ablauf während des gesamten Versuches bei jedem der gleiche.

Während eines operativen Eingriffs wurden den Minipigs an Tag 0 *paraspinal* acht Vollhautwunden mit einem Durchmesser von jeweils 4 cm gesetzt (Abb. 2.1).

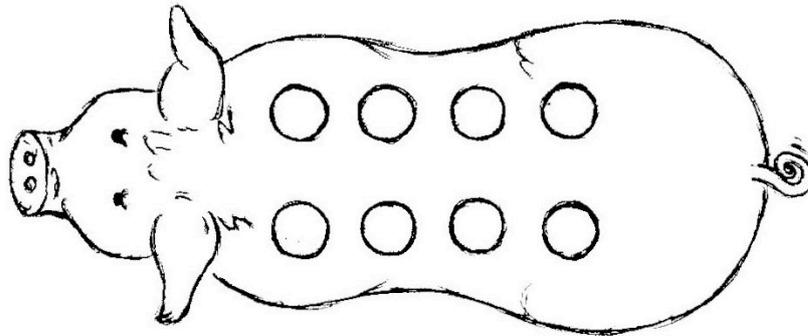


Abb. 2.1 Schweineskizze: *Paraspinale* Anordnung der acht Vollhautwunden

In dem darauffolgenden Beobachtungszeitraum wurden alle drei bis vier Tage die Verbände gewechselt. Diese Verbandswechsel gaben die Möglichkeit, den Heilungsprozess im Verlauf zu beobachten, zu beurteilen und zu dokumentieren.

Nach einer Behandlungsdauer von 14 bzw. 24 Tagen wurden die Tiere schmerzlos euthanisiert.

2.2.5 Beobachtungsparameter des Heilungsverlaufs

In diesem porcinen Wundheilungsmodell wurden in einem standardisierten Vorgehen am Tag der Operation sowie an jedem darauffolgenden Verbandswechsel verschiedene Parameter zur Beobachtung des Wundheilungsverlaufs erhoben, um ein umfassendes Bild dieses komplexen Prozesses zu erhalten.

So wurde an diesen Tagen dem Tier Blut aus einer Ohrvene entnommen und zur Überwachung des allgemeinen Gesundheitszustandes und des systemischen Einflusses des Eingriffs auf das Versuchstier das Blutbild, insbesondere die Leukozytenwerte, kontrolliert. Die Wunden wurden makroskopisch beurteilt, Besonderheiten festgehalten und über die digitale Fotodokumentation einer jeden Wunde wurde die Wundgröße vermessen.

Neben dem semiquantitativen Verfahren zur Erfassung und Auswertung der mikrobiologischen Keimbefestigung der einzelnen Wunden fand nach Gewebeprobeentnahme und Anfertigung histologischer Schnitte die Messung der Höhe des neu gebildeten Granulationsgewebes statt. Des Weiteren wurde im Wundsekret der Gehalt an Nitrit (NO_2^-) ermittelt. NO_2^- gilt als Indikator für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem wichtigen Mediator bei inflammatorischen Prozessen.

2.3 Wundheilungsmodell

2.3.1 Operation

2.3.1.1 Narkoseeinleitung

Am Morgen der Operation wurden die Minipigs aus ihren Boxen geholt, um im Vorraum der Ställe durch zwei intramuskuläre, retroaurikuläre Injektionen sediert zu werden. Sie erhielten Stresnil® (Azaperon, 5 mg/kg KG), ein Neuroleptikum für Schweine, zusammen mit dem Anticholinergikum Atropin (0,5mg) und separat in einer weiteren Spritze das Anästhetikum Ketamin (10mg/kg KG). Nach Wirkungseintritt und Transport der Tiere auf einem Rollwagen zum Operationstrakt wurde in der Einleitung der intravenöse Zugang in eine Ohrvene oder gegebenenfalls in eine Beinvene gelegt und zunächst zwei EDTA- und zwei Serum-Röhrchen Blut entnommen. Im Anschluss wurde eine Glukose-Infusion (5%, 500 ml) zur Volumensubstitution während der Operation angehängt und die Narkose mit dem Hypnotikum Trapanal® (Thiopental, 3-5 mg/kg KG) eingeleitet. Es folgte die endotracheale Intubation in Rückenlage mit anschließender Tubuskontrolle und Fixierung des Tubus und des Beißeils mit Mullbinden. Nachdem das Schwein in Bauchlage gebracht wurde, wurde der Rücken großzügig geschoren und die Operationsfläche mit HiBiSCRUB® und feuchten Kompressen gründlich abgewaschen.

2.3.1.2 Anästhesie

Im Operationssaal wurden die Minipigs in Bauchlage auf dem Operationstisch gelagert und das Narkosegerät konnektiert. Die Klammerelektroden des EKGs wurden zur perioperativen Überwachung angeschlossen und die Pfoten der Tiere mittels Mull fixiert.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde eine Inhalationsanästhesie durchgeführt. Über das Beatmungsgerät wurde den Tieren ein Gasgemisch aus Lachgas (N₂O) und Sauerstoff (O₂) im Verhältnis 2:1 verabreicht. Der Verdampfer des volatilen Anästhetikums Isofluran wurde zu Beginn auf 2% eingestellt. Im Verlauf wurde die inspiratorische Dampfkonzentration dann langsam auf die Erhaltungsdosis von 1% reduziert. Bei einem Atemhubvolumen von 300 bis 500 ml wurde eine Atemfrequenz von 10-15/min eingestellt und die

suffiziente Beatmung mittels Kapnographie über den endexpiratorischen Kohlendioxid (CO₂) Gehalt kontrolliert, wobei die Grenzen bei 36 und 44 mmHg lagen. Zur ausreichenden Analgesie wurde zusätzlich das Opioidanalgetikum Dipidolor (Piritramid, 3,75 mg) intravenös appliziert.

2.3.1.3 Operativer Eingriff

Unter sterilen Bedingungen wurde nun die geschorene Fläche mit in Octenisept[®] getränkten Tupfern desinfiziert. Nach einem Handschuhwechsel wurde das Operationsfeld mit sterilen Tüchern und Klemmen abgedeckt.

Durch Abmessen wurden die Mittelpunkte der acht Wunden bestimmt und durch eine Einmalkanüle markiert. Von einer gedachten Linie zwischen den beiden *Spinae scapulae* wurde in der Medianebene 5 cm nach kaudal gemessen. Von diesem Punkt wurde nun bilateral in einem Abstand von jeweils 6 cm zu den *Processi spinosi* das Zentrum abgesteckt. Die Mittelpunkte der anderen Wunden fanden sich jeweils im Abstand von 10 cm zu den kranialen Markierungen, 6 cm von der Wirbelsäule entfernt.

Das Setzen der Wunden geschah mit Hilfe einer eigens für diese Versuchsreihe angefertigten Stanze, deren Radius 2 cm betrug und welche nach jedem Gebrauch im Dampfautoklaven sterilisiert wurde (Abb. 2.2).



Abb. 2.2 Stanze: Eigens für die Versuchsreihe angefertigtes Operationsinstrument zum Setzen der Vollhautwunden am Schwein

Nach Entfernen der Kanüle wurde die Stanze mit leichtem Druck und Drehbewegungen aufgesetzt. Der circa 1 cm tiefe Gewebekonus konnte nun

mit einem sterilen Einmalskalpell und einer anatomischen Pinzette herausgetrennt werden.

Aus diesem dermalen Gewebe wurde eine im Durchmesser 5 mm messende Probiopsie mittels BIOPSY PUNCH Hautstanze, der zuvor gebrauchten anatomischen Pinzette und dem Einmalskalpell gewonnen. Diese wurde für den Transport und die spätere Aufbewahrung in ein beschriftetes, steriles Kryoröhrchen gebracht.

Nachdem die erste Wunde gesetzt war und die Blutstillung durch Kompression und Ligatur der subkutanen Gefäße mit resorbierbarem Nahtmaterial stattgefunden hatte, wurde mittels einer Digitalkamera eine Fotografie der dermalen Läsion mit danebenliegendem Maßband angefertigt. Besonderheiten, wie zum Beispiel eine stärkere Blutung aus einem beschädigten Gefäß, wurden notiert.

2.3.1.4 Mikrobiologie

Zur Vorbereitung der semiquantitativen Keimzahlbestimmung wurden vor Operationsbeginn im Labor des mikrobiologischen Institutes die SafeSeal Reagiergefäße mit Rundboden beschriftet und befüllt. Es wurden jeweils drei unbeimpfte BD Sensi-Discs™ Testplättchen abgezählt und dazu 500 µl der DPBS Lösung pipettiert.

Nun wurde an der gerade gesetzten Wunde zum Nachweis initialer Keimfreiheit die erste semiquantitative Keimzahlbestimmung durchgeführt. Dazu wurden die Plättchen nacheinander mit einer sterilen chirurgischen Pinzette aus dem Behältnis geholt und in gleichmäßigem Abstand auf den Wundgrund gelegt (Abb. 2.3). Nach einer Einwirkzeit von 60 Sekunden wurden sie wieder aufgenommen und zurück in die Lösung in den Röhrchen gegeben. Im mikrobiologischen Labor erfolgte nach Abschluss der Operation die Auswertung der Proben.



Abb. 2.3 Mikrobiologische Probengewinnung: Drei BD Sensi-Discs™ Testplättchen liegen für 60 Sekunden der Wundfläche auf

Bei den Schweinen S005 bis S015 folgte nun die Beimpfung der Wundkammern mit einer Bakteriensuspension. Dieser Schritt entfiel bei der nicht beimpften Gruppe (S002, S003, S004) im Operationsverlauf. Der Keim, *Escherichia coli* des Serotyps O157, war zuvor aus einem Nasenabstrich eines Münchener Miniaturschweins (Troll®) der TVA gewonnen und isoliert worden. Er wurde im Kühlraum des mikrobiologischen Institutes auf MacConkey Agar gelagert. Die benötigten Einzelkolonien wurden jeweils am Vortag der Operation durch einen 3-Ösen-Ausstrich, eine Methode zur fraktionierten Ausstreichung, gewonnen. Diese frisch beimpften MacConkey Platten wurden 24 Stunden bei 37 °C bebrühtet. Zum Anlegen der Bakteriensuspension wurden kurz vor der Operation ein bis zwei *Colony Forming Units* (CFU) des *E. coli* mit einem Wattetupfer von der Agarplatte entnommen und in ein mit 2 ml 0,45%igen NaCl Lösung gefülltes Reagenzglas gebracht. Unter Kontrolle eines Trübungsmessgerätes DensiChek® musste ein McFarland Standard (Trübungsstandard, Maß für Trübung einer Bakteriensuspension) von 1 erreicht werden, damit die Konzentration in der Suspension 10^8 Keimen/ml entsprach. Dann wurde mit reiner 0,45%igen NaCl Lösung auf 10 ml aufgefüllt, so dass sich eine Verdünnung von 2×10^7 Keimen/ml ergab. In einem sterilen Zellkulturröhrchen erfolgte der schnelle und sonnengeschützte Transport in die TVA, in der es im Kühlschrank bei 3 bis 4 °C bis zur Operation gelagert wurde. Zur Beimpfung der Wunde wurde mit Hilfe einer Kanüle 500 µl der *E. coli* Suspension in eine Insulinspritze aufgezogen und homogen auf der Wundfläche verteilt.

Nachdem 60 Sekunden abgewartet wurden, wurde erneut eine semiquantitative Keimzahlbestimmung nach gleichem Schema wie zuvor durchgeführt, um bei den frisch beimpften Wunden den Ausgangswert für den Keimzahlverlauf zu erhalten.

2.3.1.5 Wundverband und Abschluss der Operation

Die PU-Schaumverbände wurden unter sterilen Bedingungen passformgenau zurecht geschnitten und jeweils in zwei Lagen der Anleitung entsprechend mit der leicht haftenden Seite nach unten in die Wunde hinein gelegt. Bei den Versuchstieren, die eine Wundbehandlung mit speziellen Therapeutika bekamen, wurde wie folgt verfahren: Die Wunden des Schweins S008 wurden anstelle des Mepilex[®] mit zwei Schichten Mepilex[®] Ag versehen. Bei Schwein S010 und S013 wurde die untere Schicht des PU-Schaumverband gegen ein diagonal halbiertes Tegaderm[™] Alginate bzw. ein Tegaderm[™] Alginate Ag ersetzt. Das Tegaderm[™] Matrix bei Schwein S012 wurde ebenfalls zurechtgeschnitten und unter zwei Lagen des PU-Schaumes direkt auf den Wundgrund gelegt. Die Lösungen, Gels und eluierenden Wundauflagen wurden in die Wunde eingebracht und ebenfalls mit zwei Schichten Mepilex[®] bedeckt. Um ein Nichtverrutschen aller Verbände zu gewährleisten, wurde die oberste Auflage mit jeweils vier Einzelknopfnähten am Wundrand fixiert.

Sobald nun eine Wunde verschlossen war, wurde mit dem Setzen der nächsten begonnen. Es wurde mit genau dem gleichen Prozedere wie bei der Wunde zuvor verfahren, jedoch kamen immer neue sterile Instrumente zum Einsatz.

Nachdem alle acht Wunden gesetzt und mit den jeweiligen Wundauflagen versehen worden waren, wurde jedes Wundgebiet zum Schutz der Wundkammer und Umgebung jeweils mit einem halben Mepilex[®] Lite abgedeckt. Damit diese besser hafteten, wurde zuvor im Gebiet um jede Wunde Sprühpflaster aufgetragen. Zuletzt wurde das gesamte Operationsgebiet mit Tegaderm[™] Roll, einem zuvor von uns autoklavierten Transparentverband, überzogen. Dieser wurde mit Leukotape[®] zusätzlich abgeklebt. Um ein Manipulieren der Tiere an dem Wundverband zu verhindern und einen ausreichenden Schutz der Wunden sicher zu stellen, wurde den Minipigs eine Fleece-Hundedecke übergezogen.

Nach Ausleitung der Narkose und Extubation erfolgte der Rücktransport in die Einzelbox. Dort diente eine Rotlichtwärmelampe zur Vermeidung des postoperativen Shiverings (Abb. 2.4). Nach dem Wachwerden befanden sich alle Tiere weiter unter ständiger Aufsicht durch das TVA Personal.



Abb. 2.4 Nach der Operation: Minipig in Fleeceweste liegt unter der Rotlichtlampe in der Einzelbox

Zur postoperativen Analgesie diente das unmittelbar nach der Operation subkutan injizierte nichtsteroidale Antiphlogistikum Rimadyl[®] (Carprofen, 4,4mg/kg KG). Ab dem Folgetag erhielten die Schweine als Dauermedikation Metacam[®] (Meloxicam, 0,1mg/kg KG) *per os* alle 24 Stunden mit der Nahrung.

2.3.2 Verbandswechsel

An jedem dritten bzw. vierten Tag wurde zur Verlaufskontrolle der dermalen Wundheilung ein Verbandswechsel durchgeführt. Neben dem Anlegen neuer Verbände, der bloßen makroskopischen Beurteilung und Dokumentation durch digitale Fotografien wurden auch Proben, ähnlich wie am Operationstag, entnommen.

Das Ablegen der Tiere erfolgte wie am Tag der Operation, wobei jedoch auf eine Intubation verzichtet werden konnte. Im Vorraum des Operationssaals wurden jeweils zwei EDTA- und zwei Serum-Röhrchen Blut entnommen und eine 5%ige Glucose-Lösung angehängt. Zur adäquaten Analgosedierung

während des Verbandwechsels wurde je nach Bedarf Trapanal[®] (Thiopental), Ketamin und Valium[®] (Diazepam) intravenös titriert.

Die Fleecewesten wurden abgenommen und der Verband bis auf die eingenähten PU-Schäume vorsichtig entfernt. Gegebenenfalls musste das Gebiet um die Wunden erneut geschoren werden. Dann wurde der Rücken mit HiBiSCRUB[®] abgewaschen, wobei darauf geachtet werden musste, dass nichts an die Wundkammern gelangte.

Im Saal wurde der Bereich um die acht Wunden mit Octenisept[®] gesäubert. Nach einem Handschuhwechsel wurden die Schweine mit sterilen Operationstüchern abgedeckt (Abb. 2.5).



Abb. 2.5 Operationsfeld: Übersicht der acht Wunden mit dem eingenähtem PU-Schaumverband kurz vor Beginn des Verbandwechsels

Nun wurden mit dem Lösen der ersten Nähte und Entfernen der Wundauflagen begonnen. Diese wurden zur Asservierung für eventuelle spätere Untersuchungen in ein Zentrifugenröhrchen gesteckt.

Falls Wundsekret vorhanden war, wurde es mit Insulinspritzen aufgezogen und in sterile Kryoröhrchen abgegeben.

Es folgte eine makroskopische Beurteilung der Wunde und die Dokumentation mittels Fotografien.

Im Anschluss fand die mikrobiologische Analyse der Wunden statt. Die von der Projektgruppe „WUTZ“ etablierte Methode zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung wurde wie am Tag der Operation durchgeführt (vgl. Kap.

2.3.1.4). Die Analyse der Proben erfolgte wenig später im benachbarten mikrobiologischen Institut.

Zur Entnahme der Biopsien wurde die Hautstanze beim ersten Verbandswechsel bei 12 Uhr angesetzt. An den darauffolgenden Untersuchungstagen wurden die Proben jeweils bei 3, 6 und 9 Uhr entnommen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Bei den längeren Standzeiten wurde dann wieder von neuem begonnen.

Eventuell wurde zuletzt noch ein wenig Debridement vorgenommen, um dann die Wunden mit denselben Wundauflagen wie bei der Operation zu verschließen. Zu späteren Zeitpunkten war es auf Grund der geringen Wundtiefe und Exsudatmenge möglich, die Wunden nur mit einer anstatt der zwei Lagen zu versehen.

Es wurde eine Wunde nach der anderen behandelt, so dass erst nach Verschluss der einen Wunde und dem kompletten Wechsel der sterilen Instrumente zur nächsten übergegangen werden durfte. Die Behandlung jeder Wunde bei allen Verbandswechseln und jedem Tier erfolgte standardisiert nach diesem Schema. Die Unterschiede ergaben sich nur durch die Beimpfung mit der *E. coli* Suspension am Tag der Operation und der Anwendung verschiedener Wundtherapeutika.

Nachdem alle Wunden behandelt und der Schutzverband über den gesamten Rücken wie bei der Operation angelegt worden war, bekamen die Schweine ihre Westen angezogen und wurden zum schonenden Erwachen zurück in ihre Boxen mit Rotlicht gebracht.

Die Betreuung und Dauermedikation wurde wie zuvor fortgesetzt.

2.3.3 Euthanasie

Am letzten Tag des Beobachtungszeitraums (Tag 24 bzw. 14) wurde der Verbandswechsel mit allen Probenentnahmen wie an den anderen Tagen durchgeführt.

Die Münchener Miniaturschweine wurden durch eine Überdosis des Barbiturats Narcoren[®] (Pentobarbital, 3,2 g) euthanisiert.

2.4 Materialanalyse

In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie die Auswertung der Proben erfolgte, die während der Operationen und Verbandswechsel gewonnen worden waren.

2.4.1 Planimetrie

Um den Wundgrößenverlauf im Heilungsprozess zu verfolgen, wurden mit der Digitalkamera Canon Digital IXUS 85IS von jeder Wunde an jedem Beobachtungstag eine digitale Aufnahme mit daneben liegendem Maßband angefertigt. Nachdem diese Aufnahmen auf einem Sun Secure Global Desktop (SSGD) Server gespeichert worden waren, konnte man mittels der Arbeitsoberfläche des SSGD im Rahmen der lean.pack Komplettlösung von jedem beliebigen Ort aus mit einem Passwort auf diese Daten zugreifen. Über diesen virtuellen Desktop wurden die Fotos in die Wundmanagement Software JalomedWD aufgenommen, um dann vermessen zu werden. Dazu wurde die Wundfläche mit dem Cursor umfahren. Die Daten aller errechneten Flächen in cm^2 wurden nach Excel™ exportiert, um sie abschließend mit GraphPad Prism® statistisch auszuwerten. Somit konnte die Reduktion der Wundgröße über den Beobachtungszeitraum hinweg beobachtet werden.

2.4.2 Mikrobiologie

2.4.2.1 Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Zur Auswertung der mikrobiologischen Proben wurden Verdünnungsreihen erstellt. Dazu wurde jede der 8 x 12 Vertiefungen einer 96 Well Mikrotiterplatte mittels einer Mehrkanalpipette mit jeweils 90 μl DPBS gefüllt.

Nachdem die SafeSeal Reagiergefäße mit den drei BD Sensi-Discs™ Testplättchen in den 500 μl DPBS Lösung mittels Vortex gründlich durchmischt worden waren, wurde 10 μl einer jeden Probe mit einer Mikroliterpipette aufgenommen und in jeweils ein oberstes Well pipettiert. Die homogene Verteilung der 10 μl in den 90 μl DPBS wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Lösung in der Pipette sichergestellt. Nach einem Wechsel der Pipettenspitze, wurden folgende Schritte durchgeführt:

- a) Mit der Pipette wurden 10 µl aus den 100 µl des ersten *Wells* entnommen und in das darunterliegende *Well* zu den 90 µl reinem DPBS gegeben.
- b) Eine homogene Verteilung der Bakterien in den nun 100 µl DPBS des zweiten *Wells* wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit der Pipette sichergestellt.
- c) Die Pipettenspitze wurde abgeworfen und eine neue sterile wurde aufgesetzt.

Die Schritte a) bis c) wurden so oft jeweils in das darunterliegende *Well* wiederholt, bis sich in der achten und untersten *Well* eine 10⁸-fach verdünnte Lösung befand. Zur Anzucht der Bakterien und anschließenden Zählung der *Colony Forming Units* (CFU) wurden sowohl Columbia als auch MacConkey Nährböden mit den Verdünnungsreihen beimpft. Die Columbia Blutagarplatten wurden zur späteren Quantifizierung der CFUs aller Bakterien herangezogen. Die MacConkey Selektivnährböden halfen bei der Beurteilung der gramnegativen Keime und verhalfen stets zum Überblick über das in der Wunde vorhandene Keimspektrum.

Die Petrischale mit Nährmedium wurde von außen beschriftet und durch einen Strich in zwei Hälften geteilt. Mit einer Vierkanalpipette wurden jeweils 10 µl der ersten vier Verdünnungen aus den *Wells* aufgenommen und nebeneinander auf eine Hälfte der Agarplatte aufgebracht und durch Schwenken zur Mitte hin verteilt. Es ergaben sich somit vier Reihen der unterschiedlich verdünnten Bakterienlösungen. Auf der anderen Hälfte der Agarplatte wurden die letzten vier Verdünnungen in gleicher Weise aufgetragen. Dieses Vorgehen ermöglichte die getrennte Anzucht der Bakterien der unterschiedlichen Verdünnungen (Abb. 2.6). Jede neue Probenentnahme erforderte einen Wechsel der Pipettenspitzen. Alle beimpften Platten wurden über Nacht bei 36 ±1 °C bebrütet, wobei die Columbia Platten in einem Brutschrank mit einem Kohlenstoffdioxidgehalt (CO₂) von 5 - 6% gelagert wurden. Nach 24 Stunden wurden die Petrischalen herausgenommen und beurteilt (Abb. 2.6). Fremde Keime, sei es auf den Columbia oder MacConkey Platten, wurden isoliert und in einem weiteren Verfahren bestimmt. Die CFUs auf den Columbia Platten wurden gezählt. Bei den beiden höchsten Verdünnungen, bei denen noch

Bakterien nachweisbar waren, wurden die CFUs notiert und auf das Volumen der ursprünglich 500 µl hochgerechnet. Diese semiquantitative Keimzahlbestimmung machte eine Beobachtung der Bakterienbesiedlung der Wunden im Verlauf und im Vergleich möglich.

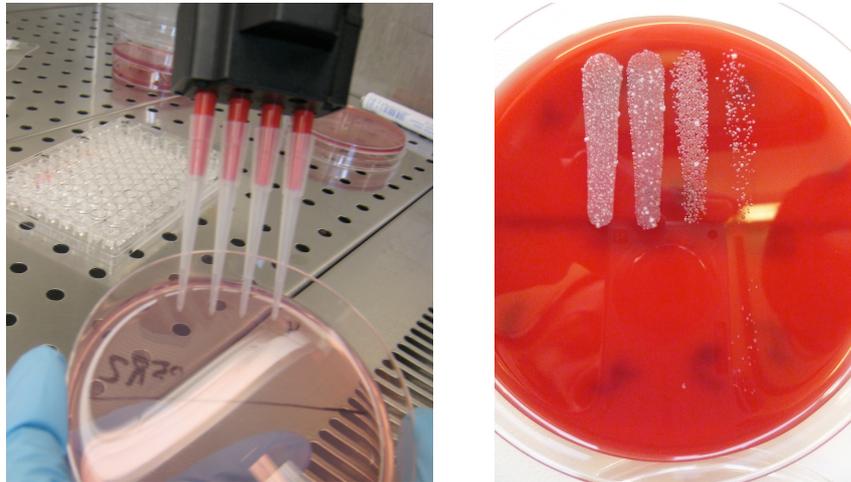


Abb. 2.6 Mikrobiologische Auswertung: Auftragen der Bakteriensuspensionen aus der Verdünnungsreihe auf MacConkey Nährboden (links) und Ergebnis nach 24stündiger Kultivierung einer Columbia Blutagarplatte (rechts)

2.4.2.2 Identifikation der Bakterien

Um einen Überblick über das Keimspektrum der Wunden zu erhalten, wurde regelmäßig eine mikrobiologische Identifikation einzelner noch fremder Kolonien durchgeführt. Dazu wurde das zu identifizierende Bakterium von der Agarplatte der Verdünnungsreihe entnommen und mittels eines 3-Ösen-Ausstrichs isoliert.

Nach einer erneuten Bebrütung über 24 Stunden wurden einzelne reine Kolonien dieses Keims vom Nährmedium entnommen und im Reagenzglas in 3 ml 0,45%igen NaCl gelöst bis im Densitometer ein McFarland Standard zwischen 0,57 und 0,62 angezeigt wurde.

Um nun die biochemische Klassifizierung im Vitek[®]-Gerät durchzuführen, wurden die Keimsuspensionen auf einem Reiter der Smart Carrier Station[™] zugeführt, um jede Probe mit einer Identifikationsnummer und eventuell weiteren Details zu verknüpfen. Anschließend wurde der Reiter im Vitek[®] platziert und die automatisierte Keimbestimmung begann. Wenig später konnten die Ergebnisse am Bildschirm abgelesen werden.

In manchen Fällen genügte zur Überprüfung der Bakterienidentität auch die Betrachtung unter einem Mikroskop. Dazu wurden wenige Kolonien mit einem Wattestäbchen auf einen Objektträger gebracht und hitzefixiert. Nach Gram-Färbung im Färbeautomaten konnte dann die Beurteilung unter dem Mikroskop stattfinden.

2.4.3 Histologie

Die Präparation und Färbung der histologischen Schnitte erfolgte nach der in dem Laborhandbuch Romeis Mikroskopische Technik [89] beschriebenen Methodik.

2.4.3.1 Gewebefixierung und Paraffineinbettung

Die durch die Hautstanzen gewonnenen Gewebeproben in den Kryoröhrchen wurden zur Fixierung in eine 4%ige Formaldehyd-Lösung gebracht und in eine beschriftete Plastikkassette gelegt. Nachdem das Fixierungsmittel ausgewaschen worden war, wurden die Biopsien in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Durch Xylol wurde der Alkohol aus den Proben entfernt. Das Gewebe wurde anschließend mit heißem Paraffinwachs durchtränkt und zu Paraffinblöcken verarbeitet.

Zum Schneiden der Präparate wurden die Blöcke einem Schlittenmikrotom zugeführt. Die 5 µm dicken Schnitte wurden auf beschriftete Objektträger gelegt und getrocknet.

2.4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Höhe des Granulationsgewebes beurteilen zu können, wurde bei den histologischen Proben die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin durchgeführt. In dieser Routine-Standard-Färbung erscheinen die Zellkerne durchs Hämalaun blau und das Zytoplasma durchs Eosin rötlich. Für den Färbevorgang wurden die Schnittpräparate in Xylol entparaffiniert und durch die absteigende Ethanolreihe rehydriert und somit wieder in ein wässriges Milieu überführt. Nachdem sie mit A. dest. gründlich gespült worden waren, wurden sie in Mayers Hämalaunlösung 5-10 Minuten gefärbt und anschließende 10-15 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgte die Zytoplasmafärbung in 0,1%ige Eosinlösung für 1-5 Minuten. Die Präparate

wurden kurz in A. dest. abgespült und in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Xylol aufgehellt und das Ethanol vollständig entfernt, bevor sie mit einem Deckglas abgedeckt wurden.

2.4.3.3 Auswertung der histologischen Schnitte

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeproben auf den beschrifteten Objektträgern wurden unter einem Lichtmikroskop angeschaut. Dazu wurde ein Objektiv mit 1,25facher Vergrößerung verwendet. Die Visualisierung, Messung und Dokumentation erfolgte mit der Mikroskop-Software AxioVision von Zeiss. Um die Grenze zwischen Granulationsgewebe und der subkutanen Lipidschicht zu definieren wurden beginnend von der dermalen Oberfläche 20 Fettvakuolen abgezählt. Dort wurde möglichst die anatomischen Gegebenheiten widerspiegelnd eine Orientierungsmarkierung gesetzt (Abb. 2.7).

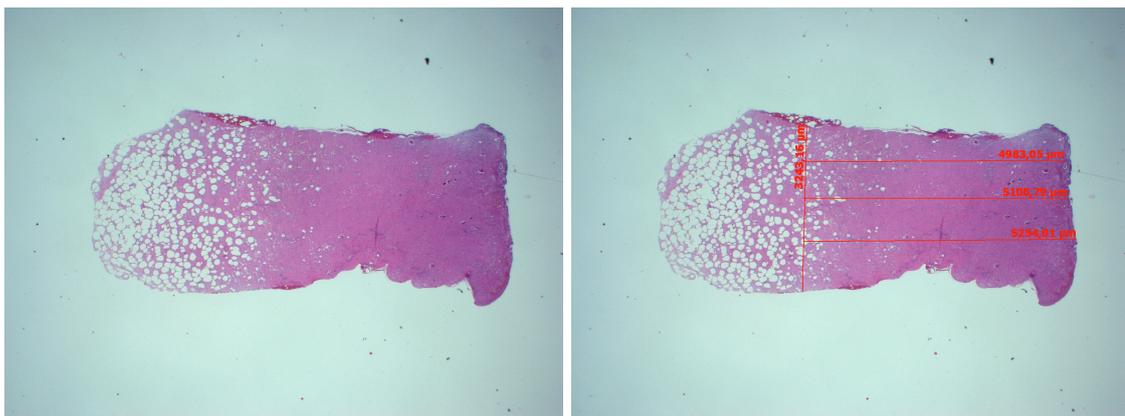


Abb. 2.7 Methodik der histologischen Auswertung: Schnittpräparat vor und nach Beurteilung der Höhe des Granulationsgewebes in AxioVision (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 1,25fache Vergrößerung, Wunde R4 des Schweins S010 an Tag 10)

Durch Einzeichnen von Messstrecken wurde die Höhe des frisch granulierten Gewebes an drei zufällig ausgewählten Stellen bestimmt. Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte in Excel.

2.4.4 Nitritkonzentration im Wundsekret

In vivo spielt Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator im Entzündungsgeschehen eine große Rolle [90]. Eine vermehrte Produktion ist mit lokaler oder systemischer Aktivierung des Immunsystems assoziiert [91]. Da NO als Radikal ein sehr instabiles Molekül ist, findet schnell eine Oxidation zu Nitrit (NO_2^-)

statt [92]. Der Gehalt in Flüssigkeiten kann mittels der Griess'schen Reaktion, welche im Jahr 1982 von Green et al. entwickelt wurde, bestimmt werden [93].

In Gegenwart von Phosphorsäure (H_3PO_4) läuft folgende Reaktion ab:



Nach Zugabe des Reagenz zu einer nitrithaltigen Lösung wird aufgrund der Bildung des Azofarbstoffes ein Farbumschlag zu rosa beobachtet. Nun kann der Nitritgehalt spektrophotometrisch bestimmt werden.

Nitrit-Assay

Das in dieser Studie aus den Wundkammern der Minipigs gewonnene Wundsekret wurde bis zum Zeitpunkt des Nitrit-Assays bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Bestimmung des Nitritgehaltes wurde es mit A. dest. 1:20 verdünnt.

Eine Nitrit-Eichkurve wurde erstellt. Dazu wurden 6,9 mg Natriumnitrit (NaNO_2) in 1 ml A. dest. eingewogen, so dass sich eine 100 mM Lösung ergab. Für die NaNO_2 -Standardreihe wurde sie auf 100 μM gebracht. In der Verdünnungsreihe wurde diese Lösung schrittweise bis zu einer Stoffmengenkonzentration von 2 μM verdünnt.

Zur Durchführung des Griess'schen Reaktion wurden jeweils 80 μl der verdünnten Wundflüssigkeitsproben und der Nitritstandardreihe auf eine 96 *Well* Mikrotiterplatte aufgebracht. Da der Assay als Doppelbestimmung durchgeführt wurde, befanden sich in zwei benachbarten *Wells* die gleichen Lösungen. Anschließend wurde zu jeder Probe und jedem Standard 80 μl des modifizierten Griess'schen Reagenz pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 540 nm gemessen. Aus den jeweils zwei Werten wurde der Mittelwert bestimmt und das Blank (Leerprobe mit A. dest) abgezogen. Die NaNO_2 -Standardkurve (Abb. 2.8) wurde berechnet. Über diese ließ sich die Nitritkonzentration in den Wundsekreten errechnen.

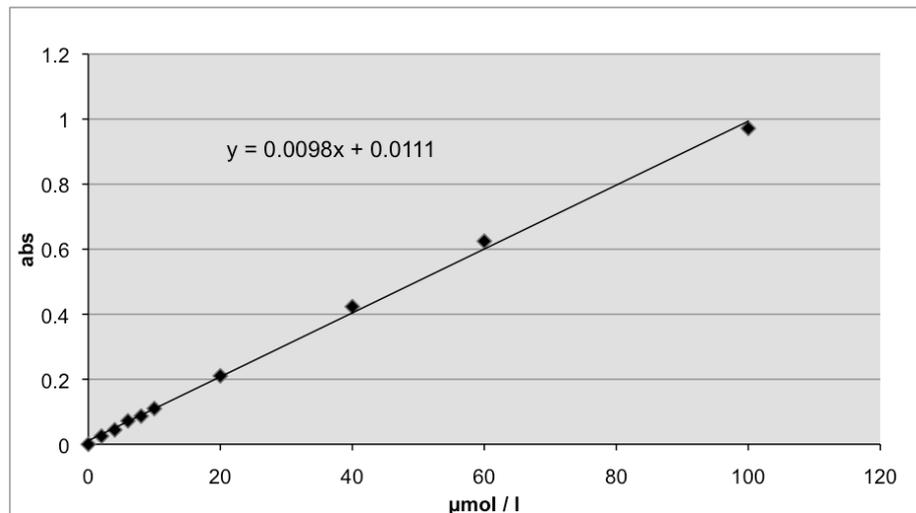


Abb. 2.8 NaNO₂-Standardkurve: Diente zur Berechnung der Nitritkonzentration von Schwein S005 und Schwein S006

2.4.5 Blutbild

Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurde den Miniaturschweinen vor der Operation bzw. vor den Verbandswechseln aus einer Ohrvene Blut entnommen. Das veterinärmedizinische hämatologische Analysegerät Vet abc™ der TVA lieferte direkt im Anschluss aus EDTA-Vollblut ein vollständiges Differenzialblutbild. In dieser Arbeit wurden nur die Leukozytenwerte der Tiere berücksichtigt.

2.5 Statistische Methoden

Die Beratung bei der statistischen Evaluation übernahm Frau Dr. rer. nat. Paunel-Görgülü aus dem Labor der Unfall- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die Datenerfassung erfolgte bei der Wundgrößenvermessung, der Mittelwertbildung des Granulationsgewebes, der Anzahl der Koloniebildenden Einheiten und den Blutbildparametern durch die Wundmanagement-Software JalomedWD der Firma Jalomed GmbH. Zur weiteren Bearbeitung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel™ von Microsoft® Corporation eingesetzt.

Für die Auswertung, die statistische Analyse auf Signifikanz und die graphische Darstellung wurde die Statistik- und Graphik-Software GraphPad Prism® verwendet. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler des arithmetischen Mittels) dargestellt.

Für die Testung auf Signifikanz im zeitlichen Verlauf des Heilungsprozesses wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA) zum Mehrgruppenvergleich durchgeführt. Da auf Grund der experimentellen Untersuchung keine Normalverteilung der Werte angenommen werden konnte, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test gefolgt vom Dunn's Post Test angewandt.

Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde als nicht-parametrischer t-Test der zweiseitige Mann-Whitney Test eingesetzt.

Statistische Signifikanz wurde angenommen und die Nullhypothese verworfen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ (95% Konfidenzintervall). Weitere Signifikanzniveaus lagen bei $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Beurteilung der Wundgröße / Planimetrie

Der Verlauf des makroskopischen Erscheinungsbildes jeder Wunde wurde durch digitale Fotografien am Tag der Operation und an jedem darauffolgendem Verbandswechsel dokumentiert. Beispielhaft werden hier die Veränderungen während des Heilungsprozesses von einer mit der *E. coli* Suspension beimpften Wunde aufgezeigt (Abb. 3.1).

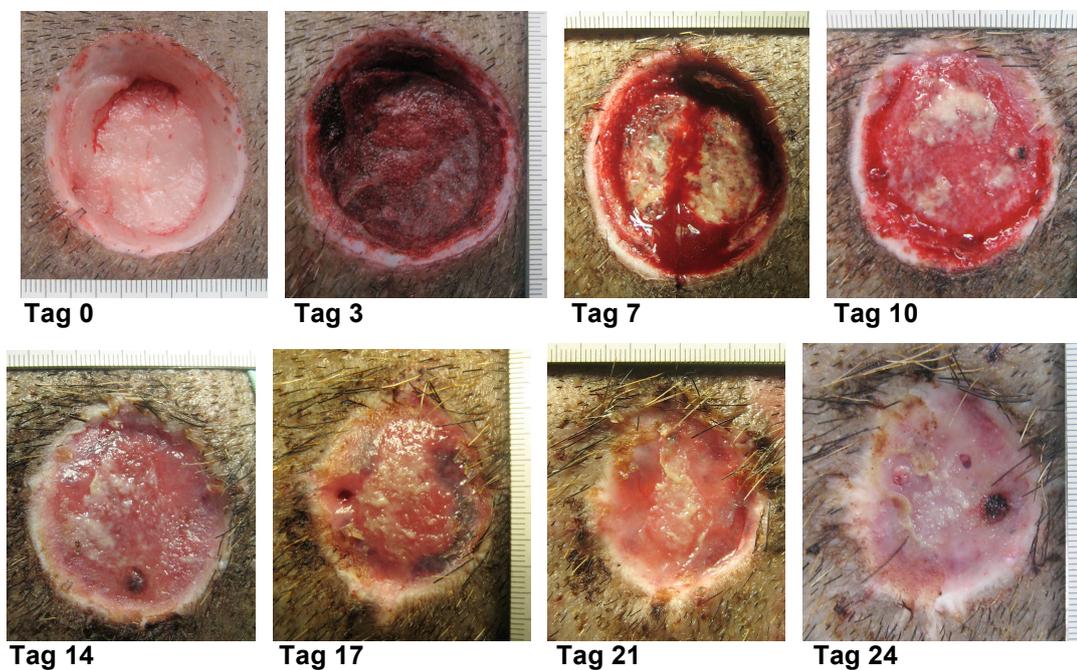


Abb. 3.1 Makroskopischer Wundheilungsverlauf: Die digitalen Fotografien zeigen den Verlauf der Wundheilung einer Wunde, die zu Beginn mit der *Escherichia coli* Suspension beimpft wurde und Mepilex® als Wundaufgabe erhielt. (Wunde R1 des Schweins S007)

Die digitalen Fotografien mit beiliegendem Maßstab dienen zur Berechnung der Wundfläche.

3.1.1 Einfluss der *E. coli* Suspension auf die Wundfläche

Die Größe der beimpften Wunden als auch die Größe der nicht beimpften Wunden nimmt bis zum Ende des Versuchs am Tag 24 ab (Abb. 3.2). Die nicht mit *E. coli* beimpften Wunden zeigen schon am Tag 10/11 mit einer signifikanten Abnahme gegenüber dem Ausgangswert ($p < 0,05$) und

verkleinern sich bis zum letzten Tag auf 32,07% der zu Beginn gesetzten Wundfläche. Bei den beimpften Wunden hingegen kann eine signifikante Reduktion erst am Tag 17/18 verzeichnet werden ($p < 0,01$). Bis zum Ende des Versuchs sinken die Werte auf 39,60% der am Tag 0 gemessenen Fläche.

Der Verlauf der beiden Behandlungsgruppen zeigt weitestgehend ein ähnliches Bild, wobei die Wunden der beimpften Schweine mit ihren Werten stets über denen der nicht beimpften liegen. Schon am Tag des ersten Verbandswechsels (Tag 3/4) lassen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Wundgröße aufzeigen ($p < 0,001$). Diese Disparität bleibt bis zum Ende des Versuchs bestehen ($p < 0,05$), ist jedoch in dem Zeitfenster zwischen dem 10. und 18. Tag am auffälligsten ($p < 0,001$).

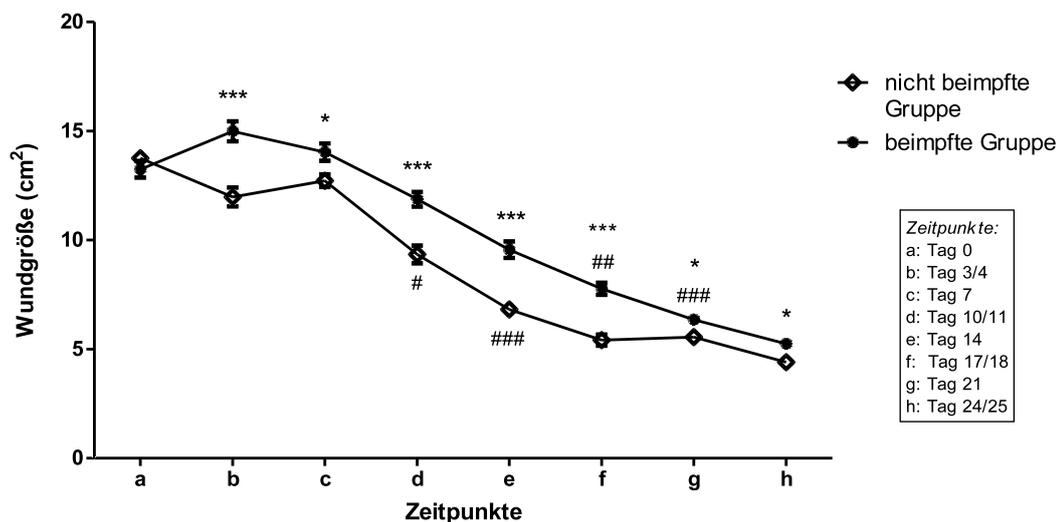


Abb. 3.2 Wundgröße der beimpften und nicht beimpften Wunden: Die Wundgrößen der mit *E. coli* Suspension beimpften Wunden (beimpfte Gruppe) und der nicht beimpften Wunden (nicht beimpfte Gruppe) sind im Verlauf aufgetragen. Mepilex® wurde als Standardverband verwendet. $n = 24$ Wunden (3 Schweine). * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich beimpfte versus nicht beimpfte Gruppe. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ Tag x verglichen mit Tag a

Die Gruppe, der mit der *E. coli* Suspension beimpften und dem PU-Schaumverband Mepilex® versehenen Wunden, wird im Vergleich mit den Wundaufgaben als Kontrollgruppe bezeichnet.

3.1.2 Wirkung der Wundauflagen auf die Wundgröße

Im Folgenden werden die im Experiment getesteten Wundauflagen bezüglich ihres Einflusses auf die Wundgröße im Vergleich zur Standardbehandlung mit Mepilex[®] betrachtet, wobei jedem Wundbett am Tag der Operation die definierte Menge *E. coli* Suspension appliziert wurde und die Analyse somit immer im Modell der infektionsbedingten Wundheilungsverzögerung stattfand.

3.1.2.1 Mepilex[®] Ag

Die mit Mepilex[®] Ag behandelten Wunden lassen im Vergleich einen weitestgehend parallelen Verlauf zur Kontrollgruppe erkennen (Abb. 3.3). Jedoch zeigt sich schon beim ersten Verbandswechsel (Tag 3/4), dass die silberhaltige Wundauflage mit einer kleineren Wundfläche korreliert. Dieser Unterschied bleibt bis zum Ablauf des Versuches bestehen und wird ab Tag 7 deutlich signifikant ($p < 0,05$ bis $p < 0,01$).

Es lässt sich eine Abnahme des Mittelwerts der Wundgrößen auf 56,89% aufzeigen, wohingegen die Kontrollgruppe nur eine Reduktion auf 72,14% erkennen lässt.

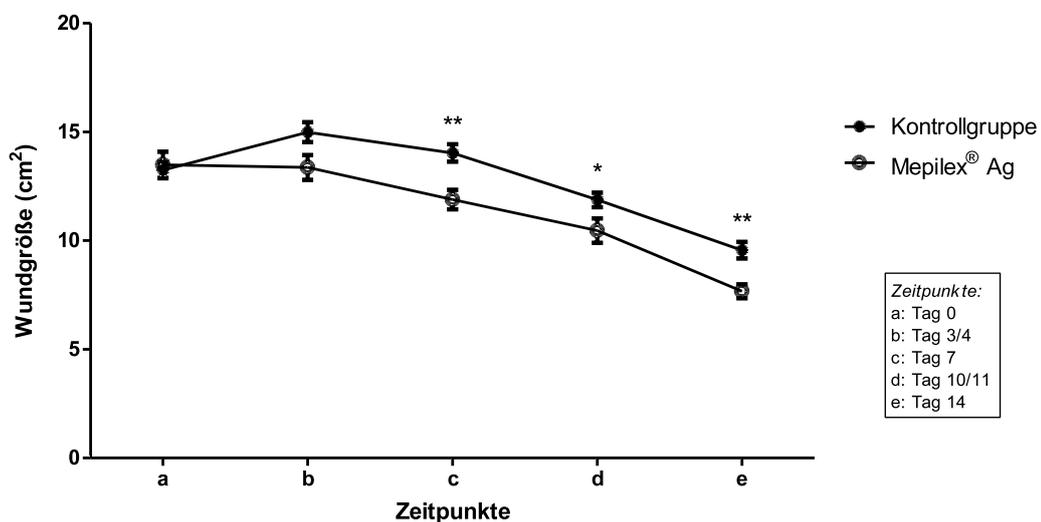


Abb. 3.3 Wundgrößenverlauf unter Mepilex[®] Ag: Die Wundflächen der beimpften, mit Mepilex[®] Ag behandelten Wunden liegen im Vergleich über einen Zeitraum von 14 Tagen stets unter denen der beimpften, mit Mepilex[®] versehenen Wunden (Kontrollgruppe). $n = 8$ Wunden (1 Schwein). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$

3.1.2.2 Tegaderm™ Alginate

Die Wundgrößen der mit Tegaderm™ Alginate versehenen Wunden liegen im Mittel während des ganzen Wundheilungsprozesses unter denen der Kontrollgruppe mit Mepilex® (Abb. 3.4). Eine auffällige Verkleinerung der Fläche ist zwischen dem zweiten und dritten Verbandwechsel festzustellen, so dass sich mit Tag 10 signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennen lassen ($p < 0,001$), die bis zum Tag der Euthanasie anhalten ($p < 0,01$).

Bis zu diesem Tag 14 ergibt sich eine Verkleinerung im Mittel auf 50,77% des Ausgangswertes bei Tegaderm™ Alginate im Vergleich zu 72,14% in der Mepilex®-Gruppe.

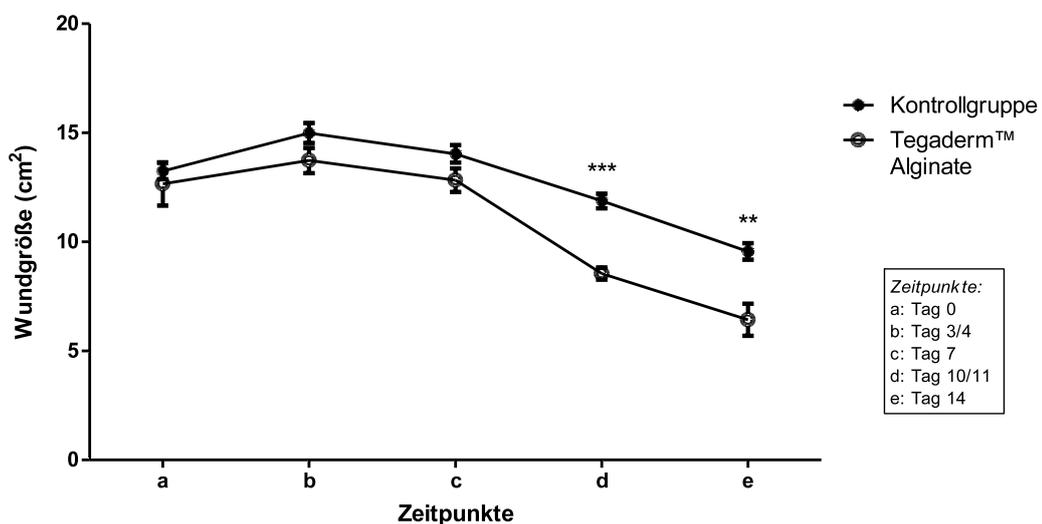


Abb. 3.4 Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Alginate: Die Wundfläche der beimpften, mit Tegaderm™ Alginate versehenen Wunden ist im Vergleich zu den beimpften, mit Mepilex® versehenen Wunden (Kontrollgruppe) dargestellt. Signifikante Unterschiede lassen sich gegen Ende des Beobachtungszeitraums feststellen. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$

3.1.2.3 Tegaderm™ Matrix

Die Größen der Wunden, die mit Tegaderm™ Matrix behandelt wurden, weisen stets einen geringeren Wert als die der Kontrollgruppe auf (Abb. 3.5). Jedoch kann über den gesamten Beobachtungszeitraum nur am Tag 7 ein signifikanter Größenunterschied beobachtet werden.

Insgesamt lässt sich durch die Anwendung von Tegaderm Matrix auf die porcinen Vollhautwunden eine Größenverkleinerung auf 65,07% in 14 Tagen aufzeigen, im Vergleich zu 72,14% bei den Kontrollschweinen.

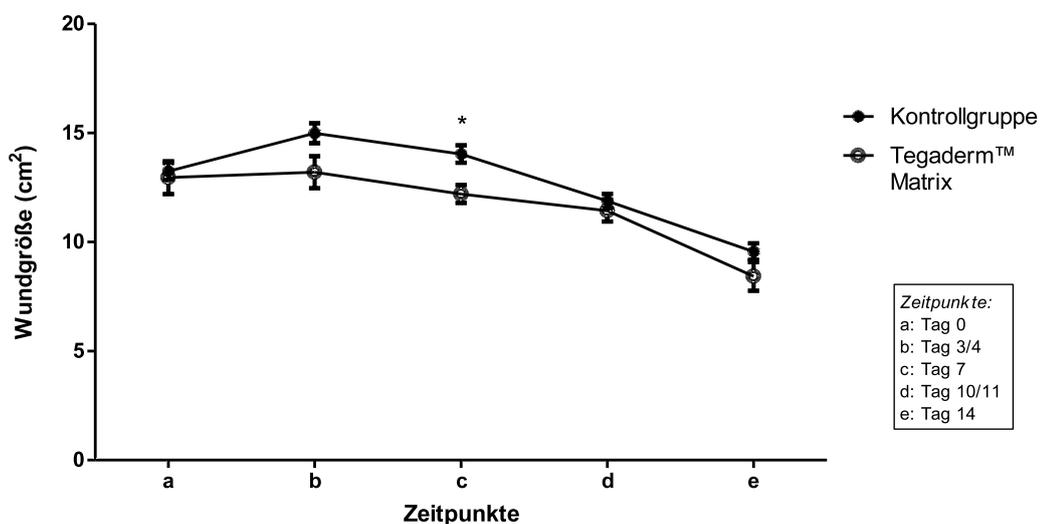


Abb. 3.5 Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Matrix: Über einen Verlauf von 14 Tagen wurde die Wundfläche der beimpften, mit Tegaderm™ Matrix behandelten Wunden gemessen. Sie sind hier im Vergleich zu den beimpften, mit Mepilex® versehenen Wunden (Kontrollgruppe) aufgetragen. n = 8 Wunden (1 Schwein). * p < 0,05

3.1.2.4 Tegaderm™ Alginate Ag

Die Wundauflage Tegaderm™ Alginate Ag bewirkt in dem Versuch eine stetige Abnahme der Flächengröße ab dem Tag der Operation (Abb. 3.6). Im Verlauf der 14 Tage erfolgt eine Verkleinerung der Wunden auf einen Wert von 36,20%, wobei sich eine deutliche Signifikanz gegenüber dem Ausgangsmesswert feststellen lässt ($p < 0,01$).

Schon ab dem Tag des ersten Verbandswechsels - so früh wie bei keiner anderen Wundauflage in dieser tierexperimentellen Studie - wird eine signifikante Abweichung gegenüber den Wundgrößen der mit dem PU-Schaumverband behandelten Wunden deutlich ($p < 0,01$). Diese Divergenz nimmt im Verlauf noch weiter zu und bleibt bis zum Ende des Versuchs mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ bestehen.

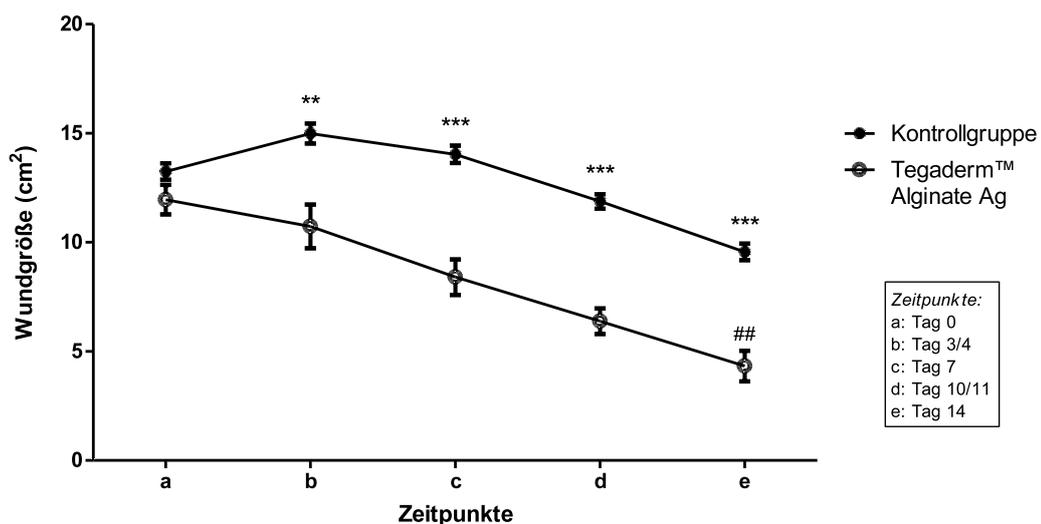


Abb. 3.6 Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Alginate Ag: Alle drei bis vier Tage wurde die Größe der Wundflächen bestimmt. Hier sieht man die mit Tegaderm™ Alginate Ag behandelten Wunden verglichen mit den mit dem PU-Schaumverband behandelten Wunden (Kontrollgruppe). $n = 8$ Wunden (1 Schwein). ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich mit der Kontrolle. ## $p < 0,01$ Tag x versus Tag a

3.1.2.5 Vergleich der verschiedenen Wundauflagen

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Wundauflagen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Wundgröße lässt sich zusammenfassend festhalten, dass alle in dieser porcinen Studie getesteten Therapeutika einen günstigen Einfluss auf den Wundverschluss haben, wobei die Werte im Verlauf des Wundheilungsprozesses stets unter denen der mit Mepilex[®] behandelten Kontrollwunden liegen (Tabelle 3.1). Durch Tegaderm[™] Alginate Ag kann jedoch die deutlichste Verkleinerung der Wundfläche verzeichnet werden, welche sich frühzeitig äußert und am letzten Tag (Tag 14) mit $4,33 \pm 0,70 \text{ cm}^2$ den niedrigsten aller in der Planimetrie gemessenen Werte erreicht. Die geringsten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe zeigen sich bei Tegaderm[™] Matrix.

Wundauflage	Tag 0	Tag 3/4	Tag 7	Tag 10/11	Tag 14
Mepilex[®] (Kontrolle)	13,25 ± 0,38	14,99 ± 0,46	14,04 ± 0,40	11,88 ± 0,34	9,56 ± 0,38
Mepilex[®] Ag	13,49 ± 0,61	13,37 ± 0,57	11,89 ± 0,45	10,47 ± 0,57	7,68 ± 0,32
Tegaderm[™] Alginate	12,66 ± 0,99	13,37 ± 0,58	12,83 ± 0,55	8,55 ± 0,27	6,43 ± 0,73
Tegaderm[™] Matrix	12,95 ± 0,75	13,20 ± 0,74	12,20 ± 0,41	11,43 ± 0,49	8,43 ± 0,66
Tegaderm[™] Alginate Ag	11,96 ± 0,67	10,73 ± 1,00	8,41 ± 0,82	6,38 ± 0,58	4,33 ± 0,70

Tabelle 3.1 Übersicht über Wundgrößen im Verlauf: Die Flächen der porcinen Vollhautwunden wurden mit Hilfe der Wundmanagement Software JalomedWD vermessen. Angegeben sind die arithmetische Mittelwerte ± SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler des arithmetischen Mittels) in cm^2 .

3.2 Mikrobiologische Keimzahlbestimmung

Parallel zur Erfassung der anderen Parameter erfolgte im Drei- bzw. Viertagesrhythmus eine semiquantitative Keimzahlbestimmung des Wundgrundes jeder porcinen Vollhautwunde. Durch eine von unserer Studiengruppe neu entwickelten Methode zur mikrobiologischen Quantifizierung der Keimzahl konnte mit Hilfe von Sensi Discs[®], einer standardisierten Verdünnungsreihe und anschließender kultureller Anzucht die *Colony Forming Units* (CFU) jeder Wunde im Verlauf und im Vergleich beobachtet werden.

3.2.1 Einfluss der *E. coli* Suspension auf die Keimzahl

Betrachtet man den Verlauf der CFU über einen Zeitraum von 24 Tagen, fällt auf, dass die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten sowohl bei den zu Beginn mit *E. coli* beimpften Wunden als auch bei den nicht beimpften Wunden stetig ansteigt (Abb. 3.7). Beide Beobachtungsgruppen zeigen eine Zunahme der Bakterienanzahl um das zehnfache, von circa 10^6 auf über 10^7 CFU/500 μ l in der einen Beobachtungseinheit und von etwas über 10^5 auf über 10^6 CFU/500 μ l in der anderen. Hierbei fällt auf, dass bei den nicht beimpften Schweinen die Werte am letzten Tag gegenüber denen zu Beginn gemessenen (Tag 3/4) mit $p < 0,01$ Signifikanzniveau erreichen.

In dem Experiment konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation einer definierten Bakteriensuspension am Tag der Operation der Keimgehalt des Wundbettes nachhaltig angehoben werden kann. Die graphische Darstellung zeigt, dass die Bakterienanzahl der singular beimpften Wunden während des gesamten Verlaufs über der der Kontrollgruppe liegt. Die Koloniebildenden Einheiten der beimpften Minipigs bewegen sich schon von Anfang an in den Bereichen über 10^6 CFU/500 μ l, wohingegen die gemessenen Werte der nicht beimpften Gruppe vorerst bei um die 10^5 CFU/500 μ l liegen und erst ab Tag 17/18 die 10^6 CFU/500 μ l überschreiten.

Der Vergleich zeigt von Beginn an signifikante Unterschiede mit einem $p < 0,001$, welche bis zu Tag 21 des Versuchs auf einem niedrigeren Signifikanzniveau bestehen bleiben ($p < 0,05$).

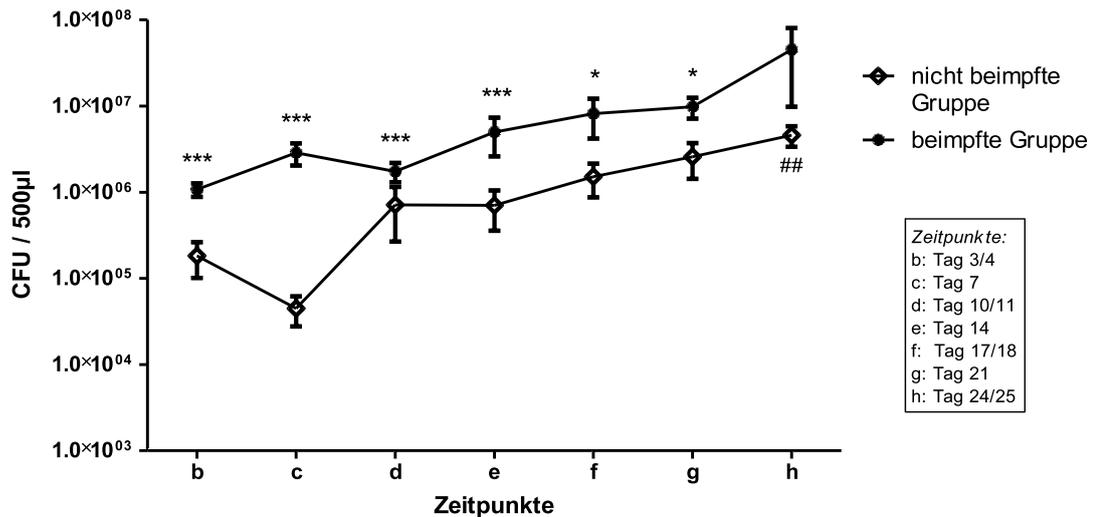


Abb. 3.7 Bakterielle Besiedlung der beimpften und nicht beimpften Schweine: An jedem Tag eines Verbandwechsels fand eine semiquantitative Bestimmung der Keimzahl einer jeden Wunde statt. Die Methode ist in Kapitel 2.3.1.4 und 2.4.2.1 beschrieben. Hier sind die *Colony Forming Units* (CFU) der singular am Operationstag mit *E. coli* beimpften Wunden (beimpfte Gruppe) im Vergleich zur nicht beimpften Gruppe wiedergegeben. n = 24 Wunden (3 Schweine). * p < 0,05 und *** p < 0,001 beimpfte versus nicht beimpfte Gruppe. ## p < 0,01 Tag verglichen mit Tag a

3.2.2 Wirkung der Wundauflagen auf die Keimzahl

Die Besiedlung einer jeden Wunde mit Bakterien nimmt in vielfältiger Form negativen Einfluss auf den Heilungsprozess. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwieweit die in dieser tierexperimentellen Studie getesteten Wundauflagen die Fähigkeit haben, die Keimzahl zu reduzieren. Bis auf den Gebrauch der speziellen Wundauflagen unterlagen alle Wunden dem gleichen Prozedere wie jene beimpften, mit dem PU-Schaumverband behandelten Wunden und werden somit mit diesen verglichen.

3.2.2.1 Mepilex® Ag

Bei denen mit Mepilex® Ag abgedeckten Wunden kann schon am Tag des ersten Verbandwechsels eine signifikante Abnahme der Bakterienzahl gegenüber dem Ausgangswert festgestellt werden ($p < 0,05$) (Abb. 3.8). Diese Tendenz zur konsekutiven Keimzahlreduktion bleibt auch bei den folgenden Beobachtungszeitpunkten erkennbar. Nur am letzten Tag weicht das Ergebnis von dem vorherigen Verlauf ab.

Es ist im Vergleich zum silberfreien PU-Schaum festzuhalten, dass sich in dem Wundgebiet der mit dem silberhaltigen PU-Schaumverband versehenen Wunden vom ersten Verbandwechsel an signifikant weniger Keime nachweisen lassen ($p < 0,001$). Dieser markante Unterschied der Bakterienzahl bleibt fortwährend bis zum Ende des Versuchs bestehen. Bei Mepilex® Ag bewegen sich die Koloniebildenden Einheiten weitestgehend im Bereich zwischen 10^4 und 10^5 CFU/500 μ l, wohingegen die Kontrollgruppe schon früh Werte von über 10^6 CFU/500 μ l erreicht.

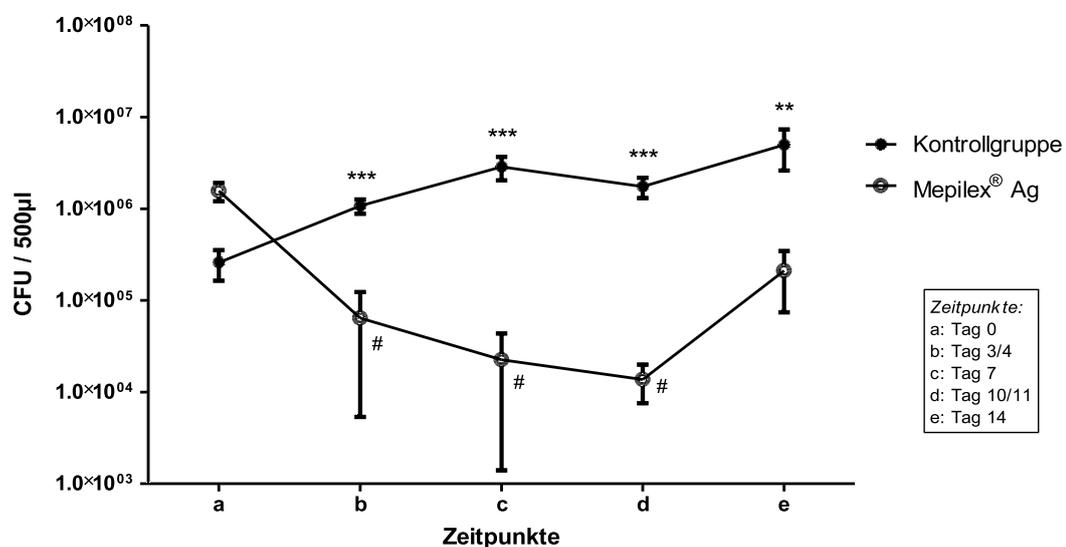


Abb. 3.8 Keimzahlverlauf unter Mepilex® Ag: Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde regelmäßig die Keimzahl der Wunden semiquantitativ bestimmt. Es lässt sich eine signifikante Reduktion der *Colony Forming Units* (CFU) bei den mit Mepilex® Ag behandelten Wunden verglichen mit denen mit reinem PU-Schaum bedeckten Wunden erkennen. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ Mepilex® Ag im Vergleich zur Kontrolle. Die im Verlauf detektierten Werte bei Mepilex® Ag liegen größtenteils signifikant unter dem Ausgangswert. # $p < 0,05$ Tag x versus Tag a

3.2.2.2 Tegaderm™ Alginate

Die Keimzahlbestimmung bei den mit Tegaderm™ Alginate bedeckten Wunden lässt während des gesamten Verlaufs keine eindeutige Tendenz erkennen (Abb. 3.9). Die Anzahl der nachgewiesenen Bakterien bewegt sich zwischen 10^6 und 10^7 CFU/500 μ l. Zu keinem Zeitpunkt kann eine signifikante Abweichung vom Ausgangswert festgestellt werden.

Schaut man sich parallel die Keimbesiedlung der porcinen Vollhautwunden der Kontrollgruppe an, ergeben sich meist Werte in ähnlichen Bereichen.

Nur am Tag 3/4 fallen ausgeprägte Abweichungen der mit Tegaderm Alginate® behandelten Wunden auf, wobei die Koloniebildenden Einheiten signifikant über denen der PU-Schaumverband Gruppe liegen ($p < 0,001$).

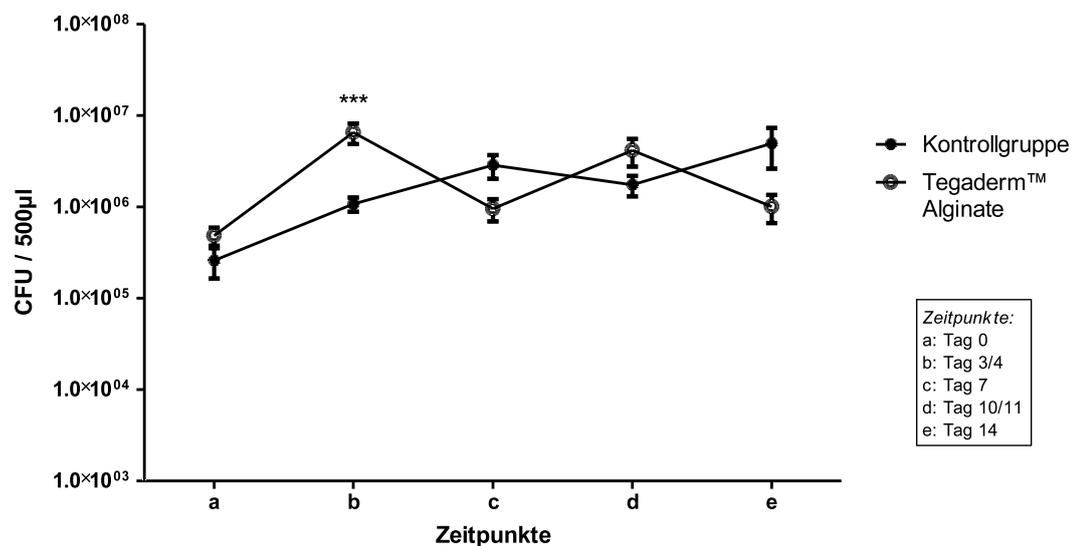


Abb. 3.9 Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Alginate: Durch eine von unserer Studiengruppe neu etablierten Methode wurde am Tag der Operation nach Applikation der definierten *E. coli* Suspension und bei jedem darauffolgenden Verbandswechsel die Zahl der *Colony Forming Units* (CFU) semiquantitativ bestimmt. Hier sieht man den Vergleich zwischen den mit Tegaderm™ Alginate behandelten Wunden und den mit dem PU-Schaumverband versehenen Wunden (Kontrollgruppe). $n = 8$ Wunden (1 Schwein). *** $p < 0,001$

3.2.2.3 Tegaderm™ Matrix

Betrachtet man den Keimzahlverlauf bei Tegaderm™ Matrix, lässt sich zunächst eine Erhöhung der bakteriellen Besiedlung erkennen, wobei diese ab Tag 7 kontinuierlich abnimmt und sich in Bereichen unterhalb 10^6 CFU/500 μ l bewegt (Abb. 3.10).

Vergleicht man bei jedem Verbandswechsel die Werte mit denen der Kontrollgruppe, wird am Tag 3/4 eine Keimzahl signifikant über denen der Kontrolle bestimmt ($p < 0,05$). Ab dem darauffolgenden Verbandswechsel liegen die Koloniebildenden Einheiten jedoch unterhalb derer mit dem PU-Schaumverband behandelten Wunden, wobei sich Signifikanzen von bis zu $p < 0,01$ aufzeigen lassen.

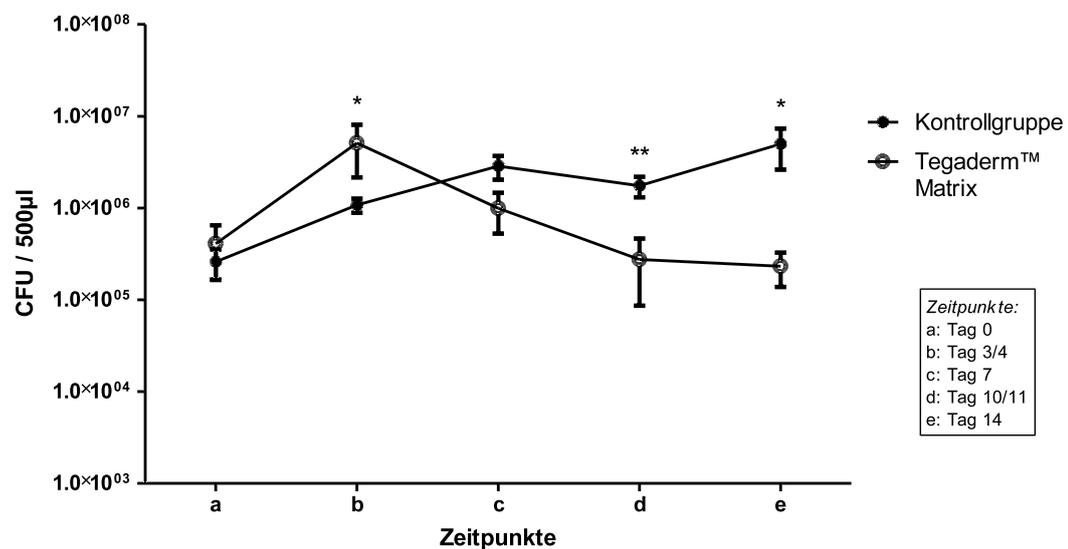


Abb. 3.10 Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Matrix: Das Ausmaß der bakteriellen Besiedlung auf dem Wundgrund der mit dem PU-Schaumverband Mepilex® behandelten Wunden (Kontrollgruppe) und den mit Tegaderm™ Matrix versehenen Wunden wurde mittels eines neu etablierten Verfahrens über den Behandlungszeitraum hinweg beobachtet. Nach 24stündiger Kultivierung konnten die *Colony Forming Units* (CFU) ausgezählt werden. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ Tegaderm™ Matrix versus Kontrolle

3.2.2.4 Tegaderm™ Alginate Ag

Die im Versuch bestimmten Koloniebildenden Einheiten der mit Tegaderm™ Alginate Ag behandelten Wunden zeigen während des gesamten Beobachtungszeitraums nur geringe Schwankungen, die sich stets im Bereich von 10^6 CFU/500 μ l bewegen (Abb. 3.11).

Gegenüber den Werten der Kontrollgruppe weisen diese Wunden und deren bakterielle Besiedlung keine größeren Abweichungen auf. Nur am letzten Tag lässt sich ein signifikanter Unterschied erkennen ($p < 0,05$).

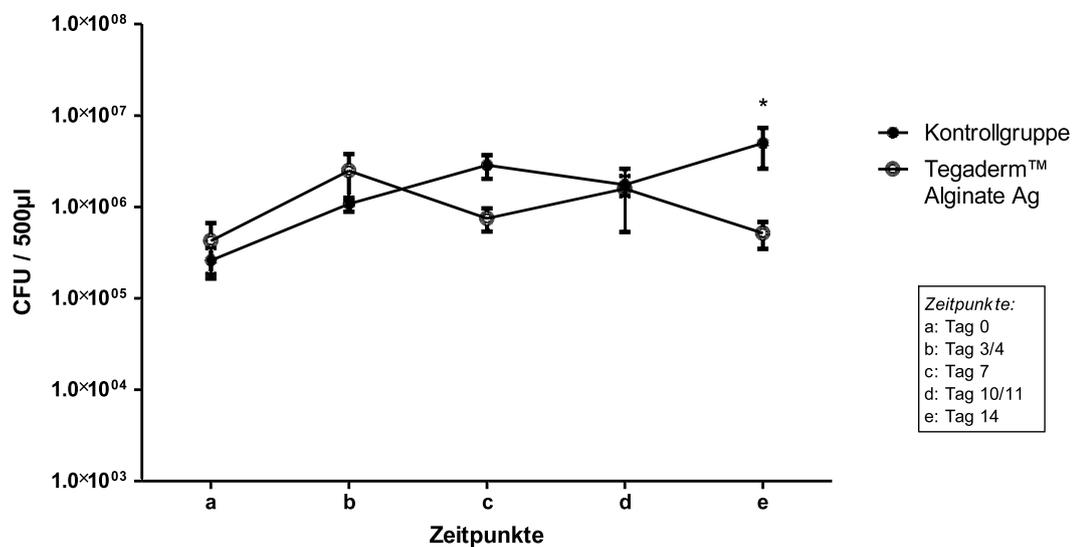


Abb. 3.11 Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Alginate Ag: Um einen Überblick über die bakterielle Besiedlung der Wunden unter Tegaderm™ Alginate Ag im Vergleich zur mit Mepilex® behandelten Kontrollgruppe zu erhalten, wurde alle drei bis vier Tage die Anzahl der Keime einer jeden Wunde semiquantitativ bestimmt. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). * $p < 0,05$

3.2.2.5 Vergleich der verschiedenen Wundauflagen

In den Untersuchungen dieser Studie kann bei Mepilex[®] Ag der deutlichste keimzahlreduzierende Effekt beobachtet werden (Tabelle 3.2). Schon am Tag des ersten Verbandwechsels (Tag 3/4) zeigen sich Werte von weniger als 10^5 CFU/500 μ l, die von keiner anderen Wundauflage während des gesamten Beobachtungszeitraums erreicht werden. Durch Alginatverbände lässt sich keine eindeutige Reduktion der Keimmenge nachweisen.

Wundauflage	Tag 0	Tag 3/4	Tag 7	Tag 10/11	Tag 14
Mepilex [®] (Kontrolle)	0,259 \pm 0,095	1,077 \pm 0,191	2,866 \pm 0,826	1,745 \pm 0,438	4,980 \pm 2,360
Mepilex [®] Ag	1,563 \pm 0,354	0,064 \pm 0,059	0,023 \pm 0,021	0,014 \pm 0,006	0,210 \pm 0,136
Tegaderm [™] Alginate	0,485 \pm 0,109	6,547 \pm 1,671	0,957 \pm 0,260	4,166 \pm 1,401	1,012 \pm 0,342
Tegaderm [™] Matrix	0,408 \pm 0,242	5,117 \pm 2,954	0,996 \pm 0,470	0,275 \pm 0,189	0,233 \pm 0,094
Tegaderm [™] Alginate Ag	0,425 \pm 0,241	2,491 \pm 1,308	0,751 \pm 0,211	1,578 \pm 1,046	0,518 \pm 0,169

Tabelle 3.2 Übersicht über Keimzahlverläufe: Eine semiquantitative Keimzahlbestimmung erfolgte am Tag der Operation (Werte nach initialer Beimpfung mit der definierten Bakteriensuspension) und an jedem darauffolgendem Verbandwechsel. Im Anschluss an die Probengewinnung (vgl. Kap. 2.3.1.4) fand die mikrobiologische Auswertung (vgl. Kap. 2.4.2.1) nach Anlegen einer Verdünnungsreihe und 24stündiger Kultivierung der Bakterien statt. Angabe der arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler des arithmetischen Mittels) in 10^6 CFU/500 μ l.

3.2.3 Keimspektrum

Um einen Überblick darüber zu erhalten, von welchen Erregern die Wunden besiedelt waren, wurden über den gesamten Versuchszeitraum verteilt stichprobenartige Untersuchungen durchgeführt. Nach Isolation des Keims erfolgte die mikrobiologische Identifikation mit Hilfe des Vitek[®] - Geräts.

Auffällig ist, dass trotz steriler Bedingungen bei der Operation und den Verbandswechseln und eines sorgfältig angelegten Wundverbands schon früh eine Kontamination der Wundkammern mit verschiedensten Bakterien nachzuweisen ist.

Bei der Identifikation der Bakterien zeigt sich, dass der *Escherichia coli* des Serotyps O157 auch in der Gruppe der nicht beimpften Schweine zu finden ist, jedoch in der Gruppe der beimpften Wunden die Erregerverteilung dominiert.

Mit Hilfe der mikrobiologischen Schnelldiagnostik lassen sich daneben weitere *Enterobacteriaceae*, wie diverse Arten des *Enterobacter* (*E. cloacae*, *E. aerogenes* und *E. amnigenus*), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* und *Escherichia hermannii*, bestimmen. Unter den grampositiven Keimen finden sich verschiedene Staphylokokken (*S. hyicus*, *S. chromogenes* und *S. warneri*) und auch Enterokokken (*E. casseliflavus*). Sowohl die Wunden der beimpften als auch der nicht beimpften Tiere sind vereinzelt mit Pseudomonaden (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*) besiedelt.

3.3 Dicke des Granulationsgewebes

Das primäre Ziel der Wundheilung ist die Regeneration und Neubildung von Gewebe nach einem Trauma. Um diesen Prozess genauer beobachten zu können, wurden bei jedem Verbandswechsel Gewebeproben aus dem Wundbett entnommen, wobei die Biopsiestanzen jeweils an wechselnden, zuvor festgelegten Punkten gesetzt wurden. Nach Fixierung und Einbettung der Gewebiszylinder wurden diese geschnitten, auf Objektträger gebracht und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Zur Ermittlung der Höhe des neu gebildeten Granulationsgewebes erfolgte eine Messung mit Hilfe des Programms AxioVision von Zeiss unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 1,25. Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgeführt.

3.3.1 Einfluss der *E. coli* Suspension auf die Granulation

Die Schichtdicke des granulierenden Gewebes der nicht beimpften und beimpften Vollhautwunden zeigt im Versuchsverlauf ein sehr ähnliches Bild (Abb. 3.12). Zu Beginn, zwischen Tag 7 und Tag 14, kommt es zu einer ausgeprägten Proliferation an neuem Bindegewebe, so dass sich die gemessenen Werte zwischen diesen Tagen bei beiden Gruppen mehr als verdoppeln ($p < 0,001$). Bei den nachfolgenden Verbandswechseln können hinsichtlich der neugebildeten Gewebisdicke keine markanteren Veränderungen beobachtet werden, was sich in Abb. 3.12 in dem Plateau widerspiegelt. Nach Tag 21 wird in der Gruppe der nicht beimpften Tiere eine leichte Abnahme der Dicke des Granulationsgewebes verzeichnet, wohingegen die beimpften Wunden noch eine weitere Zunahme aufweisen.

Im Vergleich zu den nicht beimpften Wunden fällt auf, dass bei den beimpften bis Tag 7 eine signifikant höhere Bindegewebsneubildung stattgefunden hat ($p < 0,05$). In den folgenden sieben Tagen jedoch nimmt die Proliferation bei den nicht beimpften Tieren zu. Die Gewebisdicke erhöht sich im Mittel von 2,48 mm auf 8,64 mm, während die Mittelwerte bei der Vergleichsgruppe von 3,67 mm auf 7,88 mm ansteigen. Dieser Vorsprung an neuem Gewebe bei den nicht beimpften Wunden bleibt fast während des gesamten Beobachtungszeitraums bestehen und zeigt am Tag 21 eine Signifikanz ($p < 0,01$). Nur am letzten

Verbandswechselflag dreht sich dieses Verhältnis wieder um: Bei den beimpften Tieren kann eine erneute Zunahme bei der Gewebsproliferation verzeichnet werden, wohingegen in der nicht beimpften Gruppe eine Minderung der Schichtdicke gefunden wird.

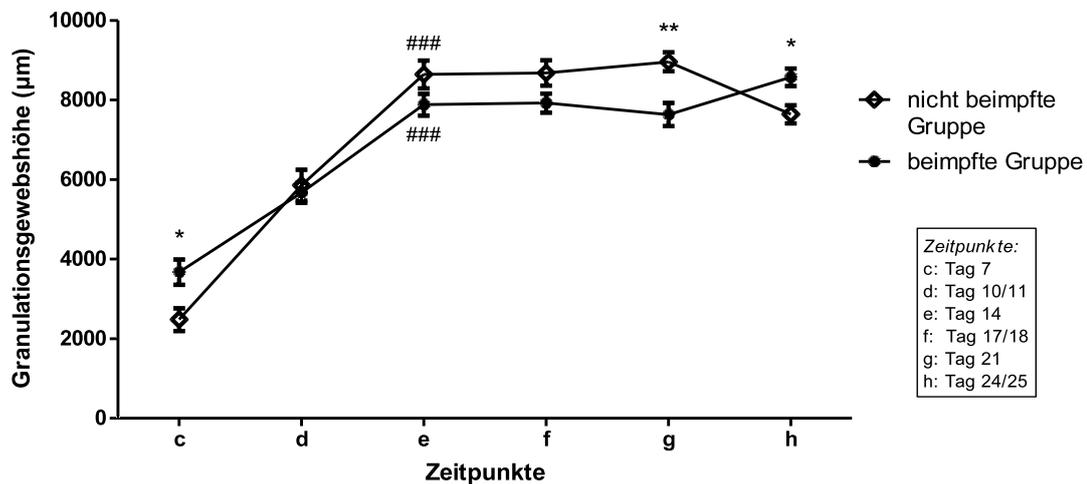


Abb. 3.12 Höhe des Granulationsgewebes der beimpften und nicht beimpften Schweine: An den Tagen der Verbandswechsel wurden Gewebsproben aus dem Wundgebiet entnommen. Diese Biopsien wurden zu histologischen Schnitten verarbeitet und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Unter einem Mikroskop wurde dann mit Hilfe des Bildanalyse-Programms AxioVision die Höhe des neu synthetisierten Gewebes gemessen. Eine standardisierte Beurteilung konnte erst ab Tag 7 erfolgen. Hier sind die Werte der beimpften und der nicht beimpften Gruppe aufgetragen. n = 24 (3 Schweine). * p < 0,05 und ** p < 0,01 im Vergleich der beiden Gruppen. ### p < 0,001 Tag x versus Tag c

3.3.2 Wirkung der Wundauflagen auf die Granulation

Therapeutisches Ziel bei der Behandlung von akuten und chronischen Wunden ist die adäquate Neusynthese von Bindegewebe. Im Folgenden wird beobachtet, inwieweit spezielle Wundauflagen Einfluss auf die Menge neu gebildeten Granulationsgewebes nehmen können. Als Vergleichsgruppe werden dabei stets die beimpften, mit dem PU-Schaumverband Mepilex® behandelten Wunden herangezogen.

3.3.2.1 Mepilex® Ag

Die Schichtdicke des Granulationsgewebes bei den mit Mepilex® Ag versehenen Wunden zeigt zwischen dem 7. und 14. Tag einen ganz ähnlichen Verlauf verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 3.13). Es kann im Durchschnitt eine Zunahme von 3,95 mm auf 8,15 mm bestimmt werden. Lediglich am Tag des dritten Verbandwechsels kann ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fraktionen gefunden werden ($p < 0,05$), wobei die in der Mepilex® Ag Gruppe gemessene Gewebsdicke die der Kontrollgruppe übersteigt.

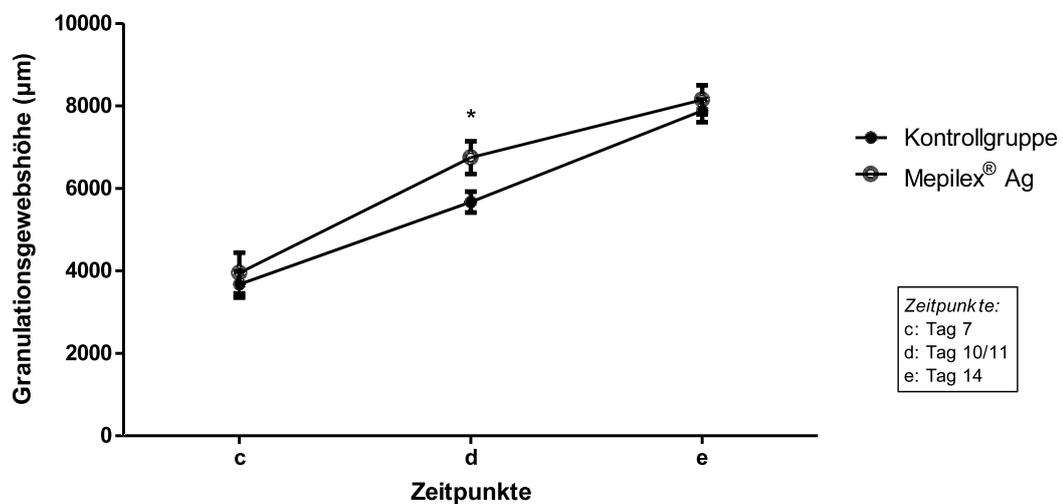


Abb. 3.13 Granulationsgewebshöhe bei Mepilex® Ag: Die Schichtdicke des gebildeten Granulationsgewebes wurde anhand von histologischen, HE gefärbten Schnitten beurteilt. Die Wunden der Mepilex® Ag Gruppe zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf wie die mit dem silberfreien PU-Schaum versehenen Wunden (Kontrollgruppe). $n = 8$ Wunden (1 Schwein). * $p < 0,05$

3.3.2.2 Tegaderm™ Alginate

Bei den mit Tegaderm™ Alginate behandelten Wundflächen kommt es in der zweiten Woche des Versuchs auch zu einer signifikanten Zunahme an Granulationsgewebe ($p < 0,01$) - die Werte steigen im Mittel von 2,99 mm auf 8,44 mm an.

Sie weichen bezüglich der Neubildung von Bindegewebe nicht stark von der Kontrollgruppe ab (Abb. 3.14).

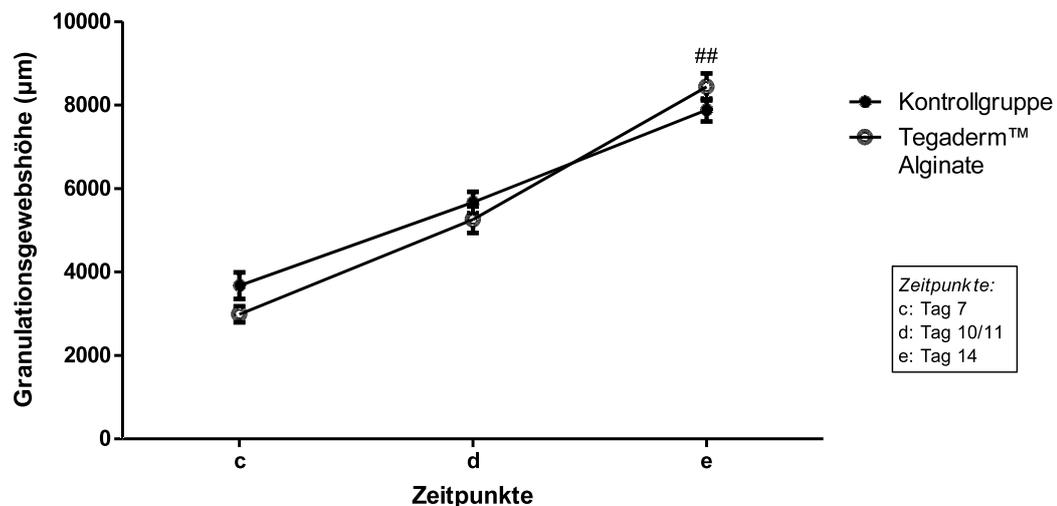


Abb. 3.14 Granulationsgewebeshöhe bei Tegaderm™ Alginate: Die während der Verbandswechsel entnommenen Biopsien wurden verwendet, um die Menge an neu synthetisiertem Gewebe messen zu können. Dazu wurden histologische Schnittpräparate unterm Mikroskop ausgewertet. Unter Tegaderm™ Alginate zeigt sich eine signifikante Zunahme während des Beobachtungszeitraums. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). $## p < 0,01$ Tag x verglichen mit Tag c

3.3.2.3 Tegaderm™ Matrix

Schaut man sich die Dicke des proliferierenden Gewebes bei den mit Tegaderm™ Matrix bedeckten Wunden an, so findet sich auch hier vom dritten bis zum fünften Verbandswechsel eine stetige Zunahme der Schichtdicke (Abb. 3.15). Es zeigt sich eine Steigerung von durchschnittlich 1,51 mm auf 5,82 mm.

Auffällig ist, dass die gemessenen Werte weit hinter denen der Kontrollgruppe zurück bleiben. Sie weichen während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant von denen mit dem PU-Schaumverband behandelten Wunden ab ($p < 0,001$).

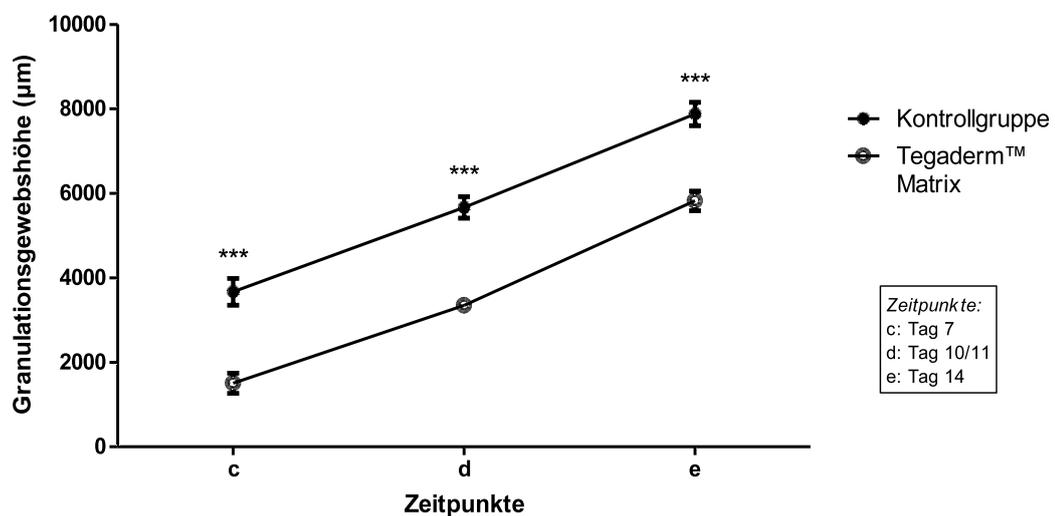


Abb. 3.15 Granulationsgewebshöhe bei Tegaderm™ Matrix: Anhand von HE gefärbten histologischen Schnitten wurde mit Hilfe der Mikroskop-Software AxioVision die Höhe des Granulationsgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hier ist der Vergleich von Tegaderm™ Matrix und der mit dem PU-Schaumverband behandelten Kontrollgruppe veranschaulicht. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). *** $p < 0,001$ Tegaderm™ Matrix versus Kontrolle

3.3.2.4 Tegaderm™ Alginate Ag

Die Bildung neuen Gewebes bei den mit Tegaderm™ Alginate Ag versehenen Wunden verläuft zwischen Tag 7 und Tag 14 ebenfalls stetig (Abb. 3.16). Die Höhe des Granulationsgewebes steigt im Mittel um mehr als das Dreifache von 1,94 mm auf 7,14 mm.

Im Vergleich liegen nur die Zahlen beim zweiten Verbandswechsel signifikant hinter denen der Mepilex® Gruppe zurück ($p < 0,01$). Im weiteren Verlauf gleichen sich dann die Werte denen der Kontrollgruppe an.

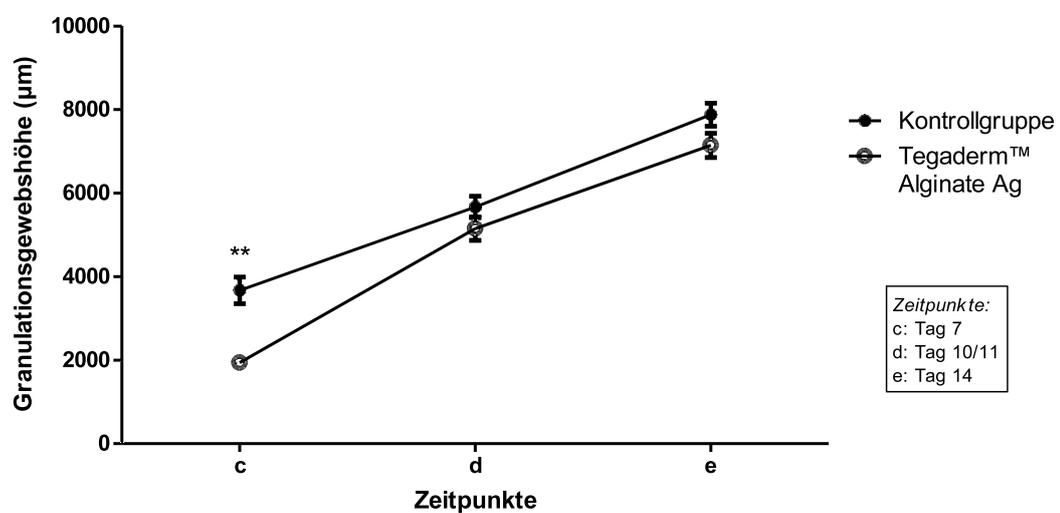


Abb. 3.16 Granulationsgewebshöhe bei Tegaderm™ Alginate Ag: Die Messung der Höhe des Granulationsgewebes erfolgte an histologischen Präparaten, die aus den Biopsien gefertigt worden waren. Die mit Tegaderm™ Alginate Ag bedeckten Wunden zeigen nur zu Beginn signifikante Unterschiede gegenüber der mit dem PU-Schaum Mepilex® versehenen Kontrollgruppe. $n = 8$ Wunden (1 Schwein). ** $p < 0,01$

3.3.2.5 Vergleich der verschiedenen Wundauflagen

Hinsichtlich der Höhe des Granulationsgewebes lässt sich in jeder Versuchsgruppe eine stetige Zunahme über den Verlauf aufzeigen, die jedoch bei Tegaderm™ Alginate am bedeutsamsten ausfällt (Tabelle 3.3). Bei den speziellen Wundauflagen zeigen sich im Vergleich zur Kontrolle keine größeren Abweichungen. Nur unter Tegaderm™ Matrix werden über den gesamten Zeitraum Werte determiniert, die bis zu mehr als 2 mm unter denen der Mepilex® Gruppe liegen.

Wundauflage	Tag 7	Tag 10/11	Tag 14
Mepilex® (Kontrolle)	3672 ± 316,6	5669 ± 253,8	7880 ± 275,0
Mepilex® Ag	3948 ± 493,1	6747 ± 394,5	8149 ± 351,8
Tegaderm™ Alginate	2986 ± 194,2	5256 ± 315,1	8439 ± 323,5
Tegaderm™ Matrix	1507 ± 240,1	3347 ± 137,0	5823 ± 231,9
Tegaderm™ Alginate Ag	1937 ± 110,4	5151 ± 281,1	7143 ± 290,7

Tabelle 3.3 Übersicht über Verläufe der Granulationsgewebshöhe: Nach Entnahme der Biopsien und Anfertigung histologischer Schnitte erfolgte die Messung der Höhe des proliferierenden Gewebes bei 1,25facher Vergrößerung mit der Mikroskop-Software AxioVision. Arithmetisches Mittel ± SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler des arithmetischen Mittels) sind in µm angegeben.

3.4 Nitrit

Die Nitritkonzentration im gewonnenen Wundsekret wurde als Indikator für die Stickstoffmonoxidsynthese im Wundgebiet bestimmt. Die Messung erfolgte unter zur Hilfenahme des Griess'schen Reagenzes spektrophotometrisch.

Auffällig ist, dass im Sekret der beimpften, mit dem PU-Schaumverband Mepilex® bedeckten Wunden der Kontrollgruppe der höchste Nitritgehalt nachgewiesen werden kann (Abb. 3.17). Schon am Tag des zweiten Verbandswechsels kann ein signifikanter Anstieg gegenüber Tag 3/4 aufgezeigt werden ($p < 0,05$), welcher im weiteren Verlauf noch weiter zunimmt ($p < 0,001$). Auch bei den beimpften, mit Mepilex® Ag und Tegaderm™ Matrix behandelten Schweinen lässt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum ein Anstieg der Nitritkonzentration erkennen, der jedoch geringer ausfällt als bei der Kontrolle. In der Gruppe der nicht beimpften Schweine finden sich durchweg vergleichsweise niedrige Nitritwerte.

In unserer Studie konnte nicht zu jedem Zeitpunkt und aus jeder Wunde Exsudat gewonnen werden, weshalb nicht alle Tiere in diesem Ergebnisteil vorzufinden sind.

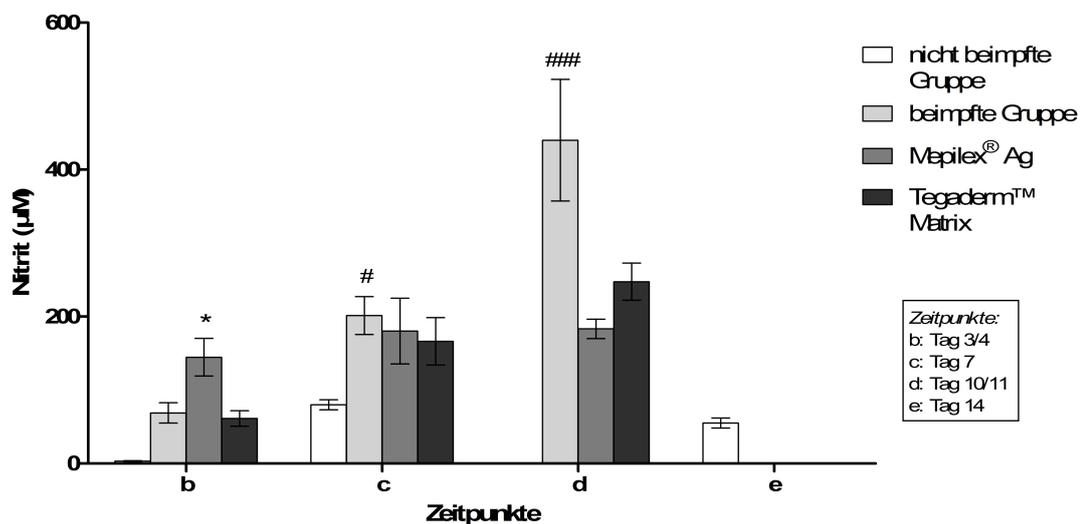


Abb. 3.17 Nitritkonzentration im Wundsekret: Die Stoffmengenkonzentration von Nitrit (NO_2^-) in extrazellulären Flüssigkeiten gilt als Indikator für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Dies ist ein wichtiger Mediator bei inflammatorischen Prozessen. Nitrit wurde im Griess-Assay spektrophotometrisch bestimmt. # $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$ verglichen mit Tag b. * $p < 0,05$ Mepilex® Ag versus beimpfte Gruppe

3.5 Leukozyten

Zu Beginn eines jeden Behandlungstages wurde im Rahmen des kleinen Blutbildes aus einem der abgenommenen EDTA-Röhrchen mitunter die Zahl der weißen Blutkörperchen bestimmt. Der Referenzbereich für Leukozyten bei Schweinen allgemein wird mit $10-22 \times 10^3/\mu\text{l}$ angegeben [94], wobei die Werte bei Minipigs meist in einer Spanne zwischen $5,9$ und $24,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ vorzufinden sind [95]. Abweichungen lassen sich auf eine Infektion mit systemisch immunologischer Reaktion, aber auch auf Einflüsse wie Alter, Umgebung und Ernährung zurückführen [96].

Neben der Erfassung, Kontrolle und Dokumentation des allgemeinen Gesundheitszustandes des Tieres, lag der besondere Focus bei diesem Untersuchungsparameter auf der Fragestellung, inwieweit das Setzen der Wunden, die Applikation einer definierten *E. coli* Suspension und die unterschiedlichen Verbandsmaterialien Einfluss auf das Abwehrsystem haben.

Die Ergebnisse unserer tierexperimentellen Studie zeigen in Tabelle 3.4, dass die Schweine auf die Operation nicht mit einer akuten Erhöhung der Leukozyten reagieren. Der Verlauf der Blutwerte spiegelt keinerlei Auswirkungen der lokalen Wunden auf das Immunsystem wieder. Hervorzuheben ist, dass eine Beimpfung der Wunden mit *E. coli* keinen Einfluss auf die Leukozytenzahl im Blutkreislauf hat (Abb. 3.18). Auch beim Vergleich der diversen Wundauflagen lassen sich bei der Zahl der weißen Blutkörperchen keine Tendenzen ablesen.

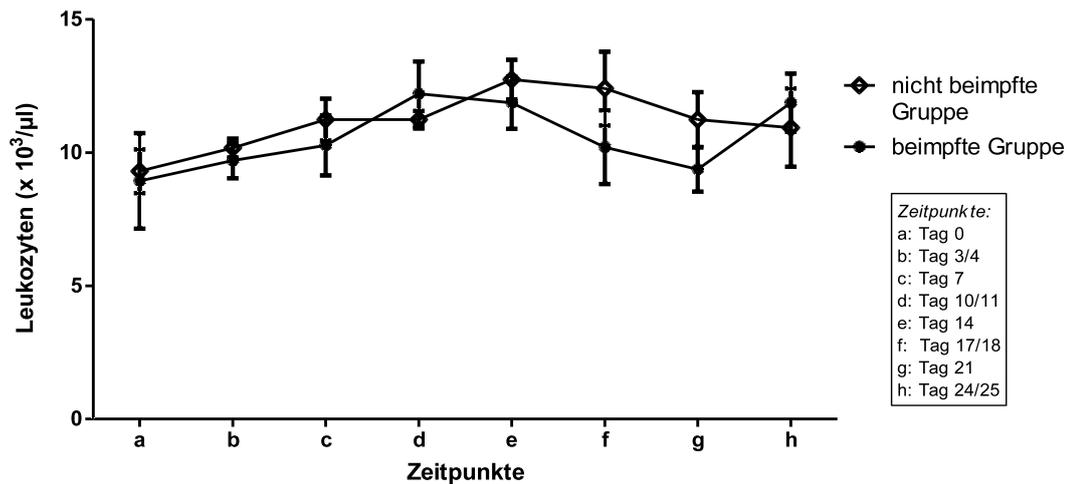


Abb. 3.18 Leukozytenzahl im Blut: Um die systemischen Auswirkungen der definierten, am Tag der Operation durchgeführten Beimpfung der Wunden mit *E. coli* einschätzen zu können, wurden während des gesamten Beobachtungszeitraums die Leukozyten im Blut der Tiere bestimmt. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede der beimpften Tiere (beimpfte Gruppe) gegenüber der nicht beimpften Gruppe aufzeigen. $n = 3$ Schweine

Schwein	Tag a	Tag b	Tag c	Tag d	Tag e	Tag f	Tag g	Tag h
n. beimp. Gr.	8.80	10.70	11.70	10.60	11.80	9.70	9.70	8.40
n. beimp. Gr.	8.20	9.50	12.30	11.70	14.20	13.20	10.80	13.50
n. beimp. Gr.	10.90	10.30	9.70	11.40	12.20	14.30	13.20	10.90
beimpf. Gr.	8.00	10.80	10.10	12.40	11.20	10.20	10.90	12.70
beimpf. Gr.	12.40	9.80	12.30	14.20	13.80	12.60	8.00	13.20
beimpf. Gr.	6.40	8.50	8.40	10.00	10.60	7.80	9.20	9.70
S008	7.7	7.9	8.8	10.5	10.7			
S009	8.1	8.4	10.3	8.2	9			
S010	6.3	7.4	7.9	7	6.7			
S011	6.6	8.2	9.6	12.3	9.5			
S012	6	9.8	8.5	9.8	9.4			
S013	6.4	8.2	8	8.9	10			
S014	8.2	8.5	7	7.1	9.7			
S015	8.1	8.9	12.7	10.6	10.2			

Tabelle 3.4 Anzahl der Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$) im Blut der Münchener Miniaturschweine: Vor einer jeden Operation und eines jeden Verbandswechsels fand eine Blutabnahme statt. Aus einer EDTA-Vollblutprobe wurde in einem Vet abc™ (*Animal blood counter*) die Leukozytenzahl der Tiere bestimmt. Die Leukozytenzahlen der beimpften Tiere (beimpf. Gr. = beimpfte Gruppe), der nicht beimpften Tiere (n. beimp. Gr. = nicht beimpfte Gruppe) und der mit verschiedenen Wundaufgaben behandelten Tiere (Schweine S008 - S015) weisen keine deutlichen Unterschiede auf.

4 Diskussion

4.1 Das porcine Wundheilungsmodell

Das Schwein dient der medizinischen Forschung in vielen Bereichen als Tiermodell. Seine anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen, Parallelen zum Beispiel beim kardiovaskulären und gastrointestinalen System, machen das Schwein vor allem in der Chirurgie zu einem häufig genutzten Versuchstier. Swindle (1986) erörtert den Einsatz des porcinen Modells in vorangegangenen chirurgischen Studien und zeigt den Nutzen für die Forschung im Bereich der Organtransplantationen, plastischen, kardiovaskulären, urogenitalen, gastrointestinalen und Kinderchirurgie auf [97].

Ein besonderer Fokus liegt jedoch seit je her auf der Dermis und Epidermis des Schweins. So finden sich in der Literatur diverse tierexperimentelle Studien zum Wundheilungsprozess [32, 37, 98, 99]. Die Basis für diese Studien wurde in Untersuchungen geschaffen, die die Eignung der porcinen Haut als Modell für die dermale Wundheilung diskutierten. Nach Winter (1972) gleicht die grundlegende Architektur der Schweinehaut der des Menschen: in beiden Fällen besitzt die Epidermis Hautleisten, und die Dermis weist eine eigene papilläre Schicht auf (vgl. Kap. 1.1.1). Ähnlichkeiten ergeben sich auch aus der relativ sparsamen Behaarung und der breiten subepidermalen Fettgewebsschicht (Abb. 4.1) [60].

Montagna und Yun (1964) untersuchen in ihrer Studie anhand histologischer Schnitte aus unterschiedlichen Gebieten des porcinen Integuments die Parallelen zur menschlichen Haut. Neben den Gemeinsamkeiten, wie der hohe Gehalt an elastischen Fasern, betonen sie jedoch auch die Unterschiede: Das Schwein weist eine geringer vaskularisierte Dermis auf; im Gegensatz zum Menschen, der über den Körper verteilt ekkrine Schweißdrüsen besitzt, findet man beim Schwein nur apokrine Drüsen; die wenigen „ekkrinen“ Drüsen an Lippen und Schnauze lassen sich im Aufbau nicht mit denen des Menschen vergleichen; die Talgdrüsen beinhalten große Mengen alkalischer Phosphatase, welche bei Menschen nicht nachzuweisen ist [61, 100].

Sowohl der Mensch als auch das Schwein besitzen eine dicke Epidermis. Die porcine Höhe variiert je nach Autor zwischen 30-100 µm und 70-140 µm, und bewegt sich im ähnlichen Rahmen wie die des Menschen mit 50-120 µm. Da diese Messwerte jedoch stark von der Körperregion abhängig sind, lässt sich als Vergleichswert besser das dermale-epidermale Verhältnis heranziehen. Bei Schweinen beträgt dieses 10:1 bis 13:1 und ist mit dem des Menschen vergleichbar [58, 101].

Meyer (1996) gibt an, dass Zellindex und Erneuerungsrate der porcinen und humanen Epidermis ähnliche Werte aufweisen (totale Erneuerung einschließlich *Stratum corneum* - Mensch: 28 Tage (d), Schwein: 30 d; Passage der vitalen Epidermis - Mensch 13 d, Schwein: 10-14 d), es jedoch gewisse Unterschiede bei Form und Anzahl der Langerhans-Zellen, der Antigen-präsentierenden Zellen, gibt. Für die Dermis lassen sich Gemeinsamkeiten bei der Aminosäurezusammensetzung des Kollagens und bei Struktur und Gehalt von Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen aufzeigen [63].

Nach Vardaxis et al. (1997), die mit Hilfe eines Konfokalmikroskops die Ähnlichkeiten porciner und humaner Haut in ihrer Arbeit bestätigen konnten, eignet sich ein Schweinemodell für die Durchführung von Wundheilungsstudien [101].

Sullivan et al. (2001) evaluieren 25 verschiedene Wundtherapien aus 180 Studien und zeigen bei vorhandener Vergleichbarkeit, dass die Ergebnisse porciner Wundheilungsmodelle eine höhere Konkordanz mit menschlichen Studien zeigen, als es die Versuche an kleinen Säugetiere oder *in vitro* tun. Deren Fazit ist, dass sich Schweinemodelle ausgezeichnet für die Beurteilung von therapeutischen Agenzien eignen, die für die Behandlung menschlicher Haut bestimmt sind [58].

Auch nach Hartwell (1955) gleicht die porcine Haut dem Integument des Menschen mehr, als es die Haut eines der gängigen kleinen Versuchstiere tut [60, 100]. So besitzen Nager und niedrige Säuger eine spezielle Muskelschicht unterm Fell, den *Panniculus*, der sich bei Verletzungen kontrahiert, um die Wundfläche zu verkleinern [57].

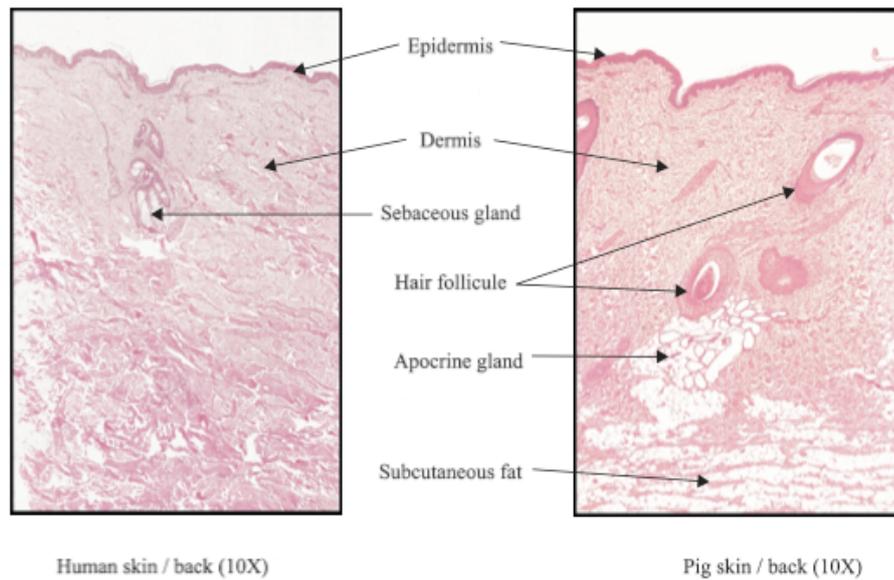


Abb. 4.1 Histologischer Vergleich humaner und porciner Haut [58]: Sowohl die humane als auch die porcine Dermis werden in eine papilläre und retikuläre Schicht unterteilt. Beide besitzen reichlich subepidermales Fettgewebe. Haarfollikel und die Talgdrüsen sind jeweils im Verhältnis 1:1 vorhanden. Die retikuläre Dermis des Schweins zeigt ein geringer ausgeprägtes Gefäßsystem. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte der Kutis von einem vergleichbaren Gebiet im Bereich der Rückens (10fache Vergrößerung) [100]

4.2 Das Studiendesign

Die zirkulären Vollhautwunden mit einem Durchmesser von 4 cm bieten eine ausreichende Fläche für die mikrobiologische Probengewinnung, lassen über einen Zeitraum von zwei Wochen wechselnde Entnahmestellen für die Biopsien zu und machen die Gewinnung von genügend Wundexsudat möglich. Die Anzahl von acht Wunden pro Tier wurde gewählt, um die Tierzahl und die Kosten gering zu halten und trotzdem statistische Signifikanzen erreichen zu können. Mehr Wunden, verteilt über eine größere Körperregion, hätten aufgrund von Variationen in der Dicke der Haut und des subdermalen Fettgewebes zu unterschiedlichen Bedingungen geführt [101]. Laut Chvapil und Chvapil (1992) kontrahieren seitliche Wunden signifikant stärker als dorsal gesetzte [102]. Dies hätte in diesem Versuch die Wundgrößenbestimmung beeinflusst. Bei einer größeren Anzahl von Wunden wäre auch das Risiko einer gegenseitigen Kontamination erhöht gewesen. Ob das Ausmaß der Wundsetzung systemischen Einfluss hat und inwieweit sich die Wunden gegenseitig in ihrem Heilungsprozess beeinflussen, bleibt ungeklärt [99]. Eine systemische immunologische Reaktion kann anhand der Leukozytenwerte, die keinen akuten Anstieg verzeichnen lassen, nicht ausgemacht werden. Nach Vardaxis et al. (1997) zeigen derartige Wunden geringste interindividuelle Unterschiede, die sich durch geringe Alters- und Gewichtsabweichungen noch minimieren lassen, und somit gleich bewertet werden können [101]. In zukünftigen Studien könnte eine Wundauflage auf den Wunden mehrerer Schweine und gleichzeitig verschiedene Wundauflagen bei einem Tier getestet werden, um die interindividuellen Einflüsse weiter zu reduzieren.

Um während des gesamten Beobachtungszeitraumes einen Überblick über die unterschiedlichsten Aspekte des Wundheilungsprozesses zu erlangen, fiel vor Versuchsbeginn die Wahl auf die in dieser porcinen Studie erhobenen Parameter. Im Verlauf des Versuchs bestätigte sich, dass die mikrobiologische Keimzahlbestimmung, die Dokumentation der Wundgröße, die histologische Erfassung der Granulationsgewebshöhe, sowie das Blutbild und der Nitritwert im Wundsekret aussagekräftige und umfassende Informationen zur Beurteilung des Heilungsverlaufs liefern. Parallel wurde der Heilungsprozess dieser porcinen, unterschiedlich behandelten Wunden mit Hilfe immunhistochemischer

Methoden untersucht, wobei die Analysen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Bei speziellen Fragestellungen kann das Modell durch weitere Kenngrößen ergänzt werden. Dazu zählen auch eine Reihe weiterer nicht invasiver Methoden. So analysiert Archer et al. (1990) nicht nur die Keime in der Wundflüssigkeit, sondern auch die antimikrobielle Aktivität des Exsudats [103]. Wright et al. (2002) untersuchen beispielsweise die Wundexsudatproben bezüglich ihrer Matrix-Metalloproteinasen Aktivität, welche bei chronischen Wunden eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [77].

Die zur Erhebung der Daten verwendete Wundmanagement Software JalomedWD ist ein im klinischen Alltag etabliertes Programm zur Dokumentation chronischer Wunden. Bei der Planimetrie und der Höhenbestimmung des Granulationsgewebes kann ein individueller, subjektiver Einfluss auf das Ergebnis nicht ausgeschlossen werden. Durch Doppelmessungen und Mittelwertbildung wurde versucht diese auswerterabhängigen Fehlermöglichkeiten zu minimieren.

Es ist uns gelungen, ein Wundheilungsmodell für die Forschung, im Besonderen für den standardisierten Vergleich von Wundauflagen, zu entwickeln. Dieses Modell ist realisierbar und reproduzierbar - es kann und es wird schon in nachfolgenden Untersuchungen erfolgreich eingesetzt.

4.3 Die semiquantitative Keimzahlbestimmung

Biologische Marker, wie zum Beispiel die Erhebung der mikrobiellen Besiedlung, können helfen die Wundbehandlung individuell anzupassen und das therapeutische *Outcome* zu verbessern. So können Bakterien in Wunden nicht nur die Wundheilung verzögern, sondern auch zu Zellulitis, Osteomyelitis oder Sepsis führen [104].

In der Literatur finden sich verschiedenste Methoden der Keimzahlbestimmung, die sich in oberflächliche und tiefe Techniken der Probengewinnung einteilen lassen [85]. Über die Vor- und Nachteile der Analysen herrscht eine kontroverse Diskussion. Es wird argumentiert, dass die oberflächlich gewonnenen Kulturproben nicht ausreichend die Situation im tieferen Gewebe reflektieren [76, 105]. In dem porcinen Wundmodell zur Untersuchung tiefer Wundinfektion bei Verbrennungswunden von Breuing et al. (2003) kann keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an Bakterien in der Wundflüssigkeit und den korrespondierenden Gewebsbiopsien ausgemacht werden [106]. In anderen Studien kann jedoch eine eindeutige Korrelation zwischen oberflächlichen und aus tiefen Gewebeproben gewonnenen Kulturen ausgemacht werden. So demonstrieren sowohl Thomson et al. (1990) als auch Levine et al. (1976) eine lineare Relation zwischen der Keimmenge semiquantitativer Abstriche und quantitativer Biopsien, welche an offenen Verletzungen von Verbrennungspatienten durchgeführt wurden [86, 107]. Auch Sapico et al. (1986) und O'Meara et al. (2006) betonen die Bedeutung semiquantitativer Analysen eines Wundabstrichs als eine wertvolle Alternative zur invasiven Quantifizierung [108, 109]. In einer Studie von Davies et al. (2007), die das Mikromilieu von 70 Patienten mit chronisch venösen Ulzera untersuchen, zeigt sich, dass die mikrobiologische Analyse der gewonnenen Biopsien keinerlei zusätzliche Informationen verglichen mit dem Ergebnis des oberflächlichen Wundabstrichs liefert [110].

Insgesamt geht aus zahlreichen Studien hervor, dass sich die Dichte der bakteriellen Besiedlung der Wundoberfläche als Prädiktor für das Risiko der Entwicklung einer Wundinfektion und einer verzögerten Heilung eignen und semiquantitative Abstriche gleichartige Informationen wie tiefe Gewebsbiopsien bieten [83, 85, 87, 110]. Da die Mehrzahl an Wunden mit Mikroorganismen der

direkten externen Umgebung kontaminiert sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine oberflächlich gewonnene Probe das volle Spektrum der aeroben und anaeroben mikrobiellen Flora auch der tieferen Bereiche anzeigt, von denen einige Bakterien in die Pathogenese involviert sind und manche nicht [85].

Die Gewebeprobengewinnung ist eine invasive, traumatische und für den Patienten potentiell schmerzhaftes Prozedur, die meist als Nicht-routinetätigkeit von Experten durchgeführt werden muss und eine vermehrte Arbeitsbelastung für das mikrobiologische Labor darstellt. Ein weiterer Faktor, der bei einer Entnahme der Biopsie berücksichtigt werden muss, ist die Verteilung der Mikroorganismen im Gewebe. Die quantitative Analyse einer einzelnen Stelle limitiert eventuell die Aussagekraft der Keimzahlbestimmung [85].

Für den praktizierenden Arzt, mikrobiologische Labore, die experimentelle Forschung, die Interpretation und den Vergleich von Daten sowie für das gesamte Wundheilungsmanagement stellt es ein langjähriges Problem dar, dass es nicht die eine, universell akzeptierte Methode zur Quantifizierung der mikrobiellen Besiedlung einer Wunde gibt. In der Literatur lässt sich keine Technik, seien es verschiedenartige Abstriche, Biopsien, Kürettagen oder Aspirationen, ausmachen, die den hier gestellten Ansprüchen genügt. Ein Ziel dieser experimentellen Studie war es, eine neue mikrobiologische Methode zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung zu finden, die sich standardisiert in Klinik und Forschung anwenden lässt. Sie sollte reproduzierbar sein und möglichst nicht nur die bakterielle Besiedlung eines kleinen Wundbereichs wiedergeben. Es sollte eine einfache, wenig kostenintensive Technik gefunden werden, mit der sich ohne chirurgische Manipulation sehr detaillierte Daten über das Mikromilieu einer Wunde ermitteln lassen. Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser durchgeführten Großtierstudie führen zu dem Schluss, dass hier eine Methode zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung entwickelt werden konnte, die sich für die Anwendung bei der Mehrheit aller Wunden eignet. Sie ist nicht invasiv und wird nach einem standardisierten Ablauf durchgeführt. Wertvolle Informationen bezüglich der Keimmenge, der Vielfalt der anwesenden Mikroorganismen und potenzieller pathogener Keime werden gewonnen. Es lässt sich ein Verlauf der Keimzahl semiquantitativ beobachten und sich somit der therapeutische Erfolg einer Wundbehandlung beurteilen. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um diese Methode mit Ergebnissen

invasiver, quantitativer Techniken, wie beispielweise einer Biopsiekultur oder einem histologischen Grampräparat, zu vergleichen. Des Weiteren sollte eine eventuelle Korrelation zur klinischen Diagnose „Wundinfektion“ aufgezeigt werden.

Die Anwesenheit von Bakterien allein bedeutet nicht, dass eine Wunde infiziert ist [84]. In jeder Wunde, vor allem in chronischen, finden sich Mikroorganismen [85]. Die Diagnose „Infektion“ wird klinisch gestellt (vgl. Kap. 1.3.2.1). Somit sollte in zukünftigen Wundheilungsstudien möglichst auch eine Beurteilung nach dem makroskopischen Erscheinungsbild stattfinden. Dabei sollten klinische Anzeichen einer Infektion dokumentiert werden. Dies wäre auch unter dem Aspekt interessant, dass die Okklusion einer Wunde (vgl. Kap. 1.2.1) in vielen Untersuchungen zu einer Zunahme des bakteriellen Wachstums geführt hat, wobei die Infektionsrate einen Rückgang verzeichnen ließ [31, 38, 44, 111]. In dieser Studie wurde jede Wunde bei den Verbandswechseln mit Hilfe des Wundscores nach Wollina beurteilt. Dieser bewertet die Menge, Farbe und Konsistenz des proliferierenden Granulationsgewebes [112]. Die Ergebnisse sind dokumentiert, doch eine Auswertung fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt.

Es lässt sich kritisieren, dass bei den hier durchgeführten Analysen langsam wachsende Keime und Anaerobier nicht erfasst werden. So sind Kultivierung, Isolation und Identifikation anaerober Keime meist zeitaufwendig, laborintensiv und kostspielig. In dieser Studie hätte sich der zusätzliche Aufwand aufgrund des geringen wissenschaftlichen Nutzens hinsichtlich unserer Fragestellungen nicht gelohnt. Dabei ist die Rolle der Anaerobier im Wundheilungsprozess noch nicht abschließend geklärt [85, 104]. In zukünftigen Untersuchungen und bei speziellen Fragestellungen ließe sich die Auswertung um diesen Aspekt ergänzen.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Aspekte dieser Großtierstudie lassen den Schluss zu, dass sich die neue Methode zu Keimzahlbestimmung für eine orientierende Quantifizierung der bakteriellen Besiedlung einer Wunde eignet. Inwieweit diese nicht invasive, semiquantitative Analyse mit den klinischen Zeichen einer Infektion oder den Werten quantitativer Bestimmungen durch Biopsieentnahmen korreliert, bleibt in folgenden Studien zu erörtern.

4.4 Der Einfluss einer vermehrten Keimbeseidlung

Die Anwesenheit von Bakterien ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Wundheilungsverzögerungen (vgl. Kap. 1.3.2.2). Eine jede Wunde ist kontaminiert. Welche Mechanismen nun dazu führen, dass sich aus einer kontaminierten Wunde eine chronische, nicht heilende Wunde entwickelt, ist noch nicht abschließend geklärt [80]. Zum einen können Immunstatus und lokale Gegebenheiten auf Seiten des Patienten diese Genese beeinflussen. Zum andern können Mikroorganismen entscheidend in den Wundheilungsprozess eingreifen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Art [113], jedoch besonders die Anzahl der Bakterien dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

So wurde beobachtet, dass Wunden in einem künstlich erzeugten, keimfreien Milieu signifikant langsamer heilen als Wunden bei physiologischen Gegebenheiten [114]. Laato et al. (1988) berichten, dass ein Inokulum mit einer geringen Menge *Staphylococcus aureus* (10^2 Mikroorganismen/ml) eine beschleunigte Wundheilung induzieren, wohingegen höhere Keimzahlen (10^5 Mikroorganismen/ml) mehrheitlich zu einer Infektion und verzögerten Wundheilung führen [68].

Einen quantitativen Zusammenhang zwischen Keimzahl und einem verzögerten Heilungsprozess stellen auch Robson und Heggors (1970) fest. Sie befassen sich mit der bakteriellen Besiedlung von Wunden, die erst verspätet nach Granulationsgewebsbildung verschlossen werden konnten. Die Wunden, deren Biopsien mehr als 10^5 Bakterien/g Gewebsprobe aufwiesen, heilten signifikant schlechter als Wunden mit geringerer Keimzahl [115]. In einer Studie von Bendy et al. (1964) kann eine Progression der Heilung von Dekubitalulzera nur verzeichnet werden, wenn sich in einem oberflächlichen Wundabstrich weniger Bakterien als 10^6 CFU/ml Wundflüssigkeit nachweisen lassen [104]. Hirsch et al. (2008) untersuchen den Einfluss einer vermehrten *Staphylococcus aureus* Besiedlung auf die Wundheilung bei Schweinen mit und ohne diabetischer Stoffwechsellage. Dabei kam es in der Diabetes Gruppe bei den Wunden durch eine Inokulation mit *Staphylococcus aureus* zu einer signifikanten verzögerten Reepithelialisierung im Vergleich zu den nicht beimpften Wunden. Auch bei

den Tieren ohne induzierten Diabetes kam es zu einer Verzögerung durch den Keim, diese war jedoch nicht signifikant [76].

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, inwieweit es eine feste Grenze gibt, eine kritische bakterielle Besiedlung, die, sobald sie überschritten wird, negativ in den Wundheilungsprozess eingreift. In diesem Zusammenhang werden je nach Autor verschiedene Keimzahlen angegeben, die bei Überschreitung die Wundheilung verzögern, eine Infektion hervorrufen oder die Wahrscheinlichkeit einer Sepsis erhöhen [85]. Dabei sind sich viele einig, dass eine Wunde nur erfolgreich heilt, wenn das mikrobielle Level bei 10^5 oder weniger Bakterien pro Gramm Gewebe liegt [54, 67, 79, 116]. In manchen Studien wird eine Infektion als eine Keimmenge von mehr als 10^5 CFU/g Gewebe definiert [59, 76, 117]. Thomson und Smith (1994) argumentieren hingegen, dass auch Wunden mit mehr als 10^6 Mikroorganismen/g Gewebe ohne jeglichen Anzeichen einer Infektion heilen könnten und betonen, dass andere wichtige Variablen auf Seiten des Patienten (Wundgröße, Gesundheitszustand) und der Bakterien (Art, Mischflora) berücksichtigt werden müssten [86].

In dieser tierexperimentellen Studie wurde bei der Suche nach der adäquaten Menge an *Escherichia coli* ähnlich vorgegangen wie bei Bucknall (1980) [118]. Die Beimpfung der Wunden sollte verzögernd in den Wundheilungsprozess eingreifen, gleichzeitig jedoch keine schwere systemische Reaktion hervorrufen. Als Orientierung wurde die gängige Literatur herangezogen und sich für eine Keimmenge von über 10^5 CFU/ml Bakteriensuspension entschieden. Es wurde eine Dosis von 2×10^7 CFU/ml Suspension gewählt, so dass bei einer Inokulation von $500\mu\text{l}$ 10^7 CFU in eine Wundkammer gegeben wurden. Erste Beobachtungen bei den Verbandswechseln deuteten schnell darauf hin, dass das Ziel einer Wundheilungsverzögerung ohne systemische Auswirkungen erreicht werden konnte.

Dies bestätigte sich in der durchgeführten Computer-Planimetrie. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes lassen sich bei Beobachtung der Größe der Wundflächen durch die Beimpfung mit einer definierten Bakteriensuspension durchweg signifikant größere Flächen ermitteln (Abb. 3.2). In der Gruppe, der nicht beimpften Wunden kommt es bis zum 10./11. Tag zu einer signifikanten Abnahme der Wundgröße. Die Wunden, denen bei Operation eine Bakteriensuspension appliziert wurde, zeigen eine signifikante

Reduktion der Fläche erst am Tag 17/18. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine vermehrte bakterielle Besiedlung zur Wundheilungsverzögerung führt. Das Bild des Wundgrößenverlaufs aller Wunden über den gesamten Zeitraum lässt eine eventuelle Zunahme in den ersten Tagen nach Wundsetzung erkennen, gefolgt von einer zuerst steilen Abnahme ab zirka dem siebten postoperativen Tag mit immer geringer werdenden Reduktion der Wundfläche. Ähnliche Verläufe ergeben auch die jüngeren Studien von Fries et al. (2005) und Gallant-Behm und Hart (2006) an porcinen Vollhautwunden [119, 120].

Bei der Beobachtung des Keimzahlverlaufs fällt sowohl bei den beimpften als auch den nicht beimpften Wunden eine stetige Zunahme der Keimzahl auf, wobei die singuläre, zu Beginn des Versuchs durchgeführte Inokulation der Wunden mit *E. coli* die Keimmenge in den Wunden nachhaltig erhöhte (Abb. 3.7). Die Divergenz bleibt bis auf den letzten Tag des Beobachtungszeitraums signifikant. Diese Annäherung ist auf eine zunehmende Kolonisation und einem damit verbundenen signifikanten Anstieg der bakteriellen Besiedlung in der Gruppe der nicht beimpften Minipigs über einen Zeitraum von drei Wochen zurückzuführen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich eine im Prozess der Wundheilung frühzeitige Eskalation der Bakterienzahl negativ auf die Wundheilung auswirkt. Inwieweit der Zeitpunkt einer vermehrten Keimbesiedlung entscheidend ist, bleibt in zukünftigen Studien herauszufinden. Eine Zunahme an Mikroorganismen in porcinen Wunden, die nicht experimentell mit Bakterien beimpft wurden, finden sich auch in anderen Studien, wobei ein ähnliches Keimspektrum zu beobachten ist [77, 121]. In einer Studie von Wang et al. (2001) und einer weiteren von Hirsch et al. (2008) kann durch eine quantitative Keimzahlbestimmung einer Gewebsbiopsie von nicht beimpften porcinen Vollhautwunden eine maximale Erhöhung der bakteriellen Besiedlung zwischen dem dritten und siebten bzw. am achten postoperativen Tag ausgemacht werden [62, 76]. Ein ähnliches Maximum kann in dieser Studie nicht beobachtet werden. Inwieweit dies auf die Bedingungen der Wundzone oder auf die Methodik der Keimzahlbestimmung zurückzuführen ist, ist nicht geklärt.

Zur Beurteilung der Proliferation des Granulationsgewebes wird anhand Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten die Höhe des neusynthetisierten Bindegewebes bestimmt. In beiden Gruppen ist eine enorme Zunahme

zwischen dem 7. und 14. Tag zu verzeichnen (Abb. 3.12). Im Vergleich fällt dieser Zuwachs in der Gruppe mit der geringeren Keimbesiedlung größer aus. Es wird ein Plateau bei etwa 8.000 μm erreicht. Ab dem 21. Tag kommt es in der Gruppe der nicht beimpften Wunden zu einem Rückgang bei der Höhe des Granulationsgewebes. Diese Abnahme ist nach den Beobachtungen von Winter (1972) auf ein Schwinden der Zellpopulation, eine zunehmende Fibrosierung und eine damit verbundene Kontraktion des Bindegewebes zurückzuführen [60]. Bei den mit *E. coli* beimpften Wunden lässt sich hingegen am Tag des letzten Verbandwechsels ein erneuter Anstieg erkennen. Es wäre denkbar, dass hier eine erhöhte inflammatorische Reaktion durch die vermehrte bakterielle Besiedlung zu einer Hypertrophie des Granulationsgewebes führt. So zeigen weitere Studien einen Zusammenhang von gesteigerter inflammatorischer Reaktion oder Infektion und dem Auftreten von hypertrophiertem Granulationsgewebe [122, 123]. Längere Standzeiten hätten hier eventuell zu einem eindeutigeren Bild geführt. Darüber hinaus wäre eine Beurteilung der Narbe ermöglicht worden, dessen Qualität sich laut Eming et al. (2007) grundlegend vom Entzündungsprozess beeinflussen lässt [124].

Die Probengewinnung durch Biopsien gibt immer nur einen Ausschnitt des Gewebes wieder. Um den Umfang der Probe auszunutzen, nahmen wir Höhenmaß an drei verschiedenen Punkten des histologischen Schnittes und bestimmten den Mittelwert. Am Tag des ersten Verbandwechsels war dies aufgrund der mangelnden Festigkeit des Gewebes nicht möglich. Insgesamt war darauf zu achten, dass die Biopsien weit genug in die Tiefe reichten und möglichst gerade eingebettet wurden.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, das in einem NO-Synthase (NOS)-abhängigen enzymatischen Prozess aus der Aminosäure Arginin und Sauerstoff gebildet wird [6]. NO und seine verschiedenen induzierbaren und nicht induzierbaren Synthesen sind Gegenstand vieler aktueller Forschungen. So übernimmt NO wichtige Funktionen bei der Modulation des Gefäßtoni, der Neurotransmission und des Immunsystems und kann von einer Reihe verschiedener Zellen gebildet werden [125, 126]. In vielen Studien zeigt sich, dass eine Aktivierung des Abwehrsystems, ob lokal oder systemisch, mit einer vermehrten Produktion von NO assoziiert ist [91]. Weitere Forschungen ergaben, dass NO eine zentrale Bedeutung im Wundheilungsprozess besitzt.

Es übt einen positiven Einfluss auf Mechanismen wie Inflammation, Angiogenese und Zellproliferation aus und kann die Heilung beschleunigen [127]. So ermitteln Benrath et al. (1995) einen stimulierenden Effekt auf die Keratinozytenproliferation [128]. Die Kollagensynthese wird konzentrationsabhängig beeinflusst, wobei ein Mangel an NO in Wunden zu einer verminderten Kollagenbildung und verlangsamten Wundheilung führt, ein Überschuss sich jedoch toxisch auswirkt [6]. Des Weiteren werden von Weller et al. (2001) antimikrobielle Eigenschaften beobachtet [126]. Es bleibt eine Aufgabe zukünftiger Forschungen die funktionelle Bedeutung der NO-Synthese in humanen Wunden intensiver zu erforschen und die Frage nach einer therapeutischen Bedeutung einer Modulation der NO-Physiologie in Wunden zu beantworten.

Für die quantitative Analyse der NO-Produktion werden im Plasma oder extrazellulären Flüssigkeiten die Levels von Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) bestimmt. Sie sind die wichtigsten Metaboliten des kurzlebigen NO und lassen sich mit Hilfe der Griess'schen Reaktion in biologischen Flüssigkeiten nachweisen [91, 129]. Die Untersuchungen des Wundsekrets der porcinen Wunden dieser Studie ergeben in der *E. coli* beimpften Gruppe einen signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration (Abb. 3.17). Die Nitritkonzentration im Exsudat der nicht beimpften Wunden bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem geringen Niveau. Diese Ergebnisse lassen sich auf eine durch die gesteigerte bakterielle Besiedlung vermehrte inflammatorische Reaktion, welche einen Anstieg der NO-Produktion impliziert, zurückführen [91]. Die Erkenntnisse von Mahoney et al. (2002) eines murinen Wundheilungsmodells deuten daraufhin, dass die hier gemessenen höheren Nitritspiegel durch die Expression einer induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Entzündungszellen nicht Teil eines allgemeinen Heilungsprozesses sind, sondern die Aktivierung spezifisch durch Bakterien ausgelöst wird [130]. Es muss berücksichtigt werden, dass die Griess'sche Reaktion spezifisch ist für Nitrit. Die Analyse von Nitrat erfordert eine vorherige chemische oder enzymatische Reduktion zu Nitrit. Diese wurde in diesem Versuch nicht durchgeführt, so dass nur das Nitrit als Metabolit und Indikator für NO bestimmt wurde. Viele gramnegative Keime, so auch *E. coli*, besitzen eine Nitratreduktase und sind in der Lage Nitrat zu Nitrit zu reduzieren [129]. So

kann eine vermehrte Reduktion von Nitrat durch die anwesenden Keime zu erhöhten Nitritwerten in der beimpften Gruppe geführt haben, ohne dass diesem eine gesteigerte NO-Produktion zugrunde liegt. Um auch das Nitrat in den gering besiedelten Wunden zu erfassen und umfassende Rückschlüsse auf die NO-Synthese im Wundgebiet zu ziehen, sollte in Folgestudien das in der Wundflüssigkeitsprobe vorhandene Nitrat vor Zugabe des Griess'schen Reagenz zunächst enzymatisch zu Nitrit reduziert werden.

Eine Limitation der Nitritbestimmung im Wundsekret entsteht durch den Mangel an Wundflüssigkeit, der sich besonders gegen Ende des Versuchszeitraums ergibt. So konnte auch in dieser Studie gegen Ende kein oder nicht genügend Exsudat gewonnen werden, um statistische Signifikanzen zu erreichen.

4.5 Die Wirkung der verschiedenen Wundauflagen

4.5.1 Mepilex® Ag

Das traditionelle Management einer Wundinfektion besteht aus einer systemischen oder lokalen Therapie oder einer Kombination aus beiden. Seit Jahrhunderten ist der Menschheit die desinfizierende und antiseptische Wirkung von Silber und seinen Verbindungen bekannt und wird seit langem zur Prävention und Behandlung von Infektionen herangezogen. Aufgrund der wachsenden Inzidenz an Wundinfektionen und der Resistenzentwicklung der verursachenden Bakterienstämme, hat die Anwendung von Silber in der Wundbehandlung in den letzten Jahren zugenommen. So werden mittlerweile viele silberhaltige Wundauflagen produziert und eingesetzt, wobei es an großen randomisierten Studien zum Nachweis derer Effektivität mangelt [55, 131].

Wright et al. (2002) erreichen durch die Anwendung silberhaltiger Wundauflagen in einem porcinen Modell eine Reduktion der Keimmenge und eine beschleunigte Wundheilung in den mit einer Bakteriensuspension beimpften Vollhautwunden. Histologisch zeigte sich eine Minderung der inflammatorischen Reaktion und eine frühzeitigere Entwicklung eines gut vaskularisierten Granulationsgewebes im Vergleich zu den mit nicht-silberhaltigen Auflagen behandelten Wunden [77]. In der klinischen Studie von Jørgensen et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass silberfreisetzende Schaumverbände bei der Minimierung der Wundgrößen und der Geruchsentwicklung chronisch venöser Ulzera anderen Schaumverbänden gegenüber überlegen sind [132]. Neben den silberimprägnierten Wundauflagen ist die Applikation von Silber auch mittels Lösungen oder Cremes möglich. Bei einem *in vitro* Vergleich der bakteriziden Wirksamkeit kann eine klare Überlegenheit des Wundverbandes ausgemacht werden [133].

Inwieweit Silber eine Zytotoxizität aufweist, wird in der Literatur diskutiert [55]. So zeigt sich in Zellkulturstudien ein zytotoxischer Effekt auf Keratinozyten und Fibroblasten. Dieser ist abhängig von der gemessenen Silberkonzentration im Kulturmedium, welche von der jeweiligen Wundauflage bestimmt wird. Parallel kann eine Verzögerung der Reepithelialisierung *in vitro* verzeichnet werden [134].

Der zunehmende Gebrauch von Silber in der Wundversorgung lässt Bedenken hinsichtlich der Entwicklung von Resistenzen aufkommen [78]. Resistenzen gegenüber Silber existieren, so auch bei *E. coli*, diese sind jedoch selten [135]. Da die Bakterien durch die imprägnierten Wundauflagen in kürzester Zeit abgetötet werden, wird davon ausgegangen, dass sich die Entwicklung neuer Resistenzen begrenzen lässt. Dies verlangt jedoch die Beobachtung durch zukünftige Studien [78, 133].

In einer Multicenterstudie und kleineren Fallstudien konnte festgestellt werden, dass sich mit Mepilex[®] Ag die Keimmenge reduzieren lässt, Patienten über weniger Schmerz berichten, sich ein Rückgang der Kosten verzeichnen lässt und Heilungsraten verbessert werden können [136, 137].

Ähnliches lässt sich aus unseren Untersuchungen folgern. Der Gebrauch von Mepilex[®] Ag führt bei vermehrt bakteriell besiedelten Wunden frühzeitig zu einer signifikanten Verkleinerung der Wundfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.3). Zytotoxische Eigenschaften auf das proliferierende Granulationgewebe und einen negativen Einfluss des freigesetzten Silbers lassen sich nicht erkennen (Abb. 3.13). Des Weiteren geht hervor, dass Mepilex[®] Ag die Keimmenge in einer Wunde reduziert (Abb. 3.8). Die geringeren Keimzahlen schon am Tag des ersten Verbandwechsels lassen den Schluss zu, dass Mepilex[®] Ag in kürzester Zeit seine therapeutische Wirksamkeit entfaltet. Der Anstieg der Bakterienzahlen gegen Ende des Beobachtungszeitraums lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Wunden nicht ausreichend sezernieren und nicht genügend Silberionen (Ag^+) in Lösung gehen. Denn nur Ag^+ ist biologisch aktiv [138]. Daraus ergibt sich die Frage, ob sich für Mepilex[®] Ag die Anwendung in einer jeden Phase des Wundheilungsprozesses eignet. Dies sollte in weiteren Studien mit eventuell längeren Standzeiten evaluiert werden. Die Nitritwerte, die sich auf mittlerem Niveau halten (Abb. 3.17), lassen sich durch die geringere inflammatorische Reaktion und/oder den direkten Einfluss der verminderten bakteriellen Besiedlung im Vergleich zur Mepilex[®] Gruppe erklären.

4.5.2 Tegaderm™ Alginate

Die Kalziumalginat-Kompresse Tegaderm™ Alginate besteht aus Fasern schottischer Braunalgen. Bei Kontakt mit Wundsekret bildet sich durch

Austausch von Kalzium und Natriumionen mit der umgebenden Flüssigkeit ein hydrophiles Gel, welches für die Aufrechterhaltung eines feuchten Wundmilieus sorgt [23, 48]. Die erhöhte Kalziumkonzentration wirkt sich auf viele zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung aus und scheint einen Effekt auf die Wachstumshormonproduktion zu haben [23, 139]. Darüber hinaus zeigen Alginatauflagen in verschiedenen Studien gute hämostatische Eigenschaften [140, 141].

In einer Multicenterstudie von Lalau et al. (2002) wird der Therapieerfolg eines Alginatverbands mit dem einer Vaseline Gaze an diabetischen Fußläsionen von 77 Patienten verglichen. Es zeigt sich eine Überlegenheit bei der Granulationsgewebsbildung, der Schmerzreduktion und der Länge der Verbandswechselintervalle gegenüber der Kontrollgruppe [142]. Weitere positive Effekte der faserhaltigen Wundaufgaben konnten durch Barnett und Varley (1987) und Vanstraelen (1992) auf die epidermale Wundheilung bei porcinen und humanen Spalthautdefekten ausgemacht werden [141, 143].

Immer wieder wird berichtet, dass diese Art von Kompressen gelegentlich am Wundgrund haften bleibt und sich beim Verbandswechsel schwer lösen lässt. So kommt es auch zu Faserrückständen in der Wunde und selten zu daraus folgenden Fremdkörperreaktionen. Dies ist jedoch meist dem Mangel an Wundsekret mit geschuldet. Das Verhältnis von Alginat und Sekret führt zur Austrocknung der Wunde und der Wundaufgabe. Ebenfalls werden Unterschiede zwischen den verschiedenen Alginatprodukten und Faserstrukturen deutlich [139, 141, 143]. Zytotoxische Effekte können *in vitro* beobachtet werden [144].

Aus den Ergebnissen dieser Studie lassen sich keinerlei zytotoxische oder hypertrophische Eigenschaften ableiten. Das Granulationsgewebe zeigt eine signifikante Zunahme innerhalb der zweiten postoperativen Woche (Abb. 3.14), wobei sich kein großer Unterschied zur Kontrollgruppe aufzeigen lässt. Die signifikante Verkleinerung der Wundfläche durch Tegaderm™ Alginate (Abb. 3.4) legt den Schluss nahe, dass Alginatverbände einen stimulierenden Effekt auf die Wundheilung haben. Im Gegensatz zu Wiegand et al. (2009), die *in vitro* eine antibakterielle Aktivität von Alginaten nachweisen, zeigt sich hier kein keimzahlreduzierender Effekt (Abb. 3.9) [145].

4.5.3 Tegaderm™ Matrix

Tegaderm™ Matrix ist eine moderne Wundauflage, die mit gepufferten Spurenelementen (polyhydrierte Ionogenen = PHI™) imprägniert ist. Diese sollen das gestörte Verhältnis zwischen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (*tissue inhibitor of metalloproteinases* = TIMP), welches häufig mit einer verzögerten Wundheilung assoziiert ist, wieder in ein Gleichgewicht zurückbringen. MMP gehören zu den Proteasen, die während der Wundheilung eine entscheidende Rolle bei dem Wunddebridement, der Angiogenese, der Epithelialisierung und dem abschließenden Remodeling spielen. Die MMP Familie besteht aus 20 Enzymen, die sich in Subklassen unterteilen lassen, von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten und Entzündungszellen in den verschiedenen Phasen des empfindlichen Prozesses gebildet werden und in unterschiedliche Vorgänge involviert sind. Ihre Produktion wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert. Eine kontrollierte, spezifische Freisetzung der MMP und ein ausgewogenes Verhältnis der MMP und derer TIMP ist von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Wundheilung. So liegt bei einer verzögerten Wundheilung gehäuft eine Kombination aus einem Überschuss an MMP und einem Mangel an TIMP vor. Neue Strategien zielen darauf ab, die MMP Konzentration im Wundgebiet zu reduzieren und die TIMP Konzentration zu steigern. Dies soll durch die PHI, welche Metallionen und Zitronensäure enthalten, erreicht werden [6, 146, 147].

Da Produkte wie Tegaderm™ Matrix Folge jüngster Erkenntnisse sind, wurde der Einfluss von PHI auf den Wundheilungsprozess erst in wenigen Studien erforscht. In einer Pilotstudie von Pirayesh et al. (2007) an 20 Patienten mit diabetischem Fußulcus konnte bei 16 Ulzera (80 %) ein erfolgreicher Wundverschluss mit hoher Patientenzufriedenheit innerhalb von 18 Wochen erreicht werden [147]. Laut einer Studie von van Rossum et al. (2007) gibt es einen konzentrationsabhängigen Einfluss von PHI auf die initiale Phase der Wundheilung. Nach einer Woche zeigte sich eine Zunahme der Wundgrößenreduktion mit ansteigender PHI Konzentration bei Meerschweinchen [148].

Dies kann in dieser Studie an Minipigs nicht bestätigt werden. In der Planimetrie sind so gut wie keine Unterschiede im Vergleich zum Wundgrößenverlauf bei

den Kontrollgruppen messbar (Abb. 3.5). Es zeigt sich jedoch ein anhaltend signifikanter Unterschied bei der Höhe des Granulationgewebes (Abb. 3.15). Aus den Untersuchungen geht hervor, dass Tegaderm™ Matrix zu einer verminderten Produktion an Granulationgewebe verglichen mit der Kontrollgruppe führt. Insgesamt kann in dieser tierexperimentellen Studie durch die Anwendung einer PHI imprägnierten Wundauflage kein Nutzen erkannt werden.

4.5.4 Tegaderm™ Alginate Ag

Tegaderm™ Alginate Ag vereint die Eigenschaften eines Alginatverbands mit der antimikrobiellen Wirksamkeit des Silbers. *In vitro* lässt sich von Wiegand et al. (2009) für Alginat allein ein antibakterieller Effekt gegenüber Keimen wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* feststellen, die jedoch von silberhaltigen Alginaten übertroffen wird [145]. In einer von Meaume et al. (2005) durchgeführten Multicenterstudie mit 99 Patienten venöser und Druckulzera zeigt die Behandlung mit einer silberfreisetzenden Hydroalginatauflage einen therapeutischen Vorteil gegenüber der Anwendung eines reinen Kalziumalginatverbands. Die Inzidenz von Wundinfektionen in einem Zeitraum von vier Wochen konnte reduziert und die Wundverschlussrate gesteigert werden [149].

Aus den Untersuchungen dieser porcinen Studie ergibt sich ein günstiger, statistisch signifikanter Einfluss von Tegaderm™ Alginate Ag auf den Wundverschluss von Vollhautwunden (Abb. 3.6). Jedoch lassen sich im Vergleich zu anderen Studien keine antibakteriellen Eigenschaften dieses silberfreisetzenden Alginatverbands ableiten (Abb. 3.11). Das ist darauf zurückzuführen, dass die Kompressen aufgrund eines Mangels an Wundsekret besonders gegen Ende des Versuchs sehr trocken blieben, das Silber nicht entsprechend in Lösung gehen konnte und folglich die Menge des gelösten, aktiven Silberions Ag^+ nicht die nötige antibakterielle Konzentration erreichte.

5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie legen nahe, dass die Wundaufgabe auf die verschiedensten Aspekte der Wundheilung Einfluss nehmen kann. Eine breite Palette unterschiedlich wirksamer Wundverbände steht aktuell zur Behandlung zur Verfügung. Es gehört somit zur modernen Wundversorgung, für eine jede Wunde den entsprechenden Verband auszuwählen, der für die vorliegenden Wundverhältnisse adäquate Bedingungen schafft, um eine optimale Wundheilung zu gewährleisten. Dazu sind detaillierte Kenntnisse der Wundproduktgruppen eine wichtige Voraussetzung: die Anwendung wird erleichtert, ein vorteilhafteres Ergebnis erzielt und ein kostengünstiger Einsatz ermöglicht.

Eine gute Kenntnis über die Wirkung der jeweiligen Wundaufgabe kann nur in Versuchen wie diesem erlangt werden. Um dem Mangel an randomisierten Studien entgegenzuwirken, wurde dieses Tiermodell geschaffen. Bei diesem verlässlichen und realisierbaren Modell wird durch die Applikation einer definierten Bakterienmenge eine Situation der verzögerten Wundheilung geschaffen. Es ist reproduzierbar und bietet die Möglichkeit, den Wundheilungsprozess, die Wundinfektion und therapeutische Optionen hinsichtlich verschiedener Aspekte durch Erhebung des Wundgrößenverlaufs, mikrobiologischer, histologischer und chemischer Parameter zu untersuchen. So kann es im Besonderen für zukünftige Studien nützlich sein, deren Schwerpunkt auf neuen therapeutischen Ansätzen oder auch zellulären oder molekularbiologischen Mechanismen liegt. Die Ergebnisse führen zu Fortschritten im klinischen Alltag und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Es wird außerdem eine neue mikrobiologische Methode zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung etabliert. Die Erkenntnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass sich diese Technik zur Anwendung sowohl in der medizinischen Forschung als auch in der Klinik zur quantitativen und qualitativen Erhebung der bakteriellen Besiedlung eignet.

In dieser Großtierstudie konnte nur ein Ausschnitt der aktuell erhältlichen Wundtherapeutika und deren Einfluss auf diverse Faktoren der Wundheilung

untersucht werden. Für die zukünftige Verbesserung der Datenlage bedarf es weiterer Forschung und Validierung durch entsprechende Studien.

6 Literaturverzeichnis

1. Voggenreiter G, Dold C, editors. Wundtherapie. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
2. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009; 37(5):1528-42.
3. Sellmer W, Bültemann A, Tigges W. Wundfibel. 2nd ed. Berlin: Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2010.
4. Clark RAF, Tonnesen MG, Feng XD. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Derm Symp P.* 2000 Dec; 5(1):40-6.
5. Horn T. Wound dressings: Overview and classification. *Chir Gastroenterol.* 2006; 22(3):147-54.
6. Schaffer M, Becker HD. Immunregulation der Wundheilung. *Der Chirurg.* 1999; 70(8):897-908.
7. Altmeyer P. Der Wundheilungsprozeß aus heutiger Sicht. In: Sedlarik KM, Lippert H, editors. Wundheilung und Wundaufgaben. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1996. p. 215 p.
8. Rassner G, editor. Dermatologie. 9th ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2009.
9. Lippert H. Anatomie. 7th ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2006.
10. Welsch U, editor. Histologie: Farbatlas der Zytologie, Histologie und Mikroskopischen Anatomie des Menschen / Sobotta. 5th ed. München; Wien; Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1997.
11. Moll I, editor. Dermatologie. 7th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.
12. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Percoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair Regen.* 1994 Jul; 2(3):165-70.
13. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4; 276(5309):75-81.
14. Tomic-Canic M, Agren MS, Alvarez OM. Epidermal Repair and the Chronic Wound. In: Rovee DT, Maibach HI, editors. The epidermis in wound healing. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 25-57.
15. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2; 341(10):738-46.
16. Kiritsy CP, Lynch AB, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5):729-60.
17. Young SR, Dyson M, Hickman R, Lang S, Osborn C. Comparison of the effects of semi-occlusive polyurethane dressings and hydrocolloid

- dressings on dermal repair: 1. Cellular changes. *J Invest Dermatol.* 1991 Sep; 97(3):586-92.
18. Hanna JR, Giacomelli JA. A review of wound healing and wound dressing products. *J Foot Ankle Surg.* 1997 Jan-Feb; 36(1):2-14; discussion 79.
 19. Clark RA. Wound repair. *Current Opinion in Cell Biology.* 1989 Oct; 1(5):1000-8.
 20. Kujath P, Michelsen A. Wounds - from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int.* 2008 Mar; 105(13):239-48.
 21. Rivera AE, Spencer JM. Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clin Dermatol.* 2007 Jan-Feb; 25(1):39-48.
 22. Strodtbeck F. Physiology of Wound Healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews.* 2001; 1(1):43-52.
 23. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008 Aug; 97(8):2892-923.
 24. Bolton L, van Rijswijk L. Wound dressings: meeting clinical and biological needs. *Dermatol Nurs.* 1991 Jun; 3(3):146-61.
 25. Sedlarik KM, Lippert H, editors. *Wundheilung und Wundauflagen.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1996.
 26. Lippert H, editor. *Wundatlas.* 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
 27. Dingman RO. Factors of clinical significance affecting wound healing. *Laryngoscope.* 1973 Sep; 83(9):1540-55.
 28. Waldorf H, Fewkes J. Wound healing. *Adv Dermatol.* 1995; 10:77-96; discussion 7.
 29. Linder R. Einfluss von Verbandmaterialien auf die Wundheilung. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998; 115:694-7.
 30. Barnett A, Berkowitz RL, Mills R, Vistnes LM. Comparison of Synthetic Adhesive Moisture Vapor Permeable and Fine Mesh Gauze Dressings for Split-Thickness Skin-Graft Donor Sites. *American Journal of Surgery.* 1983; 145(3):379-81.
 31. Helfman T, Ovington L, Falanga V. Occlusive dressings and wound healing. *Clin Dermatol.* 1994 Jan-Mar; 12(1):121-7.
 32. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962 Jan 20; 193:293-4.
 33. Winter GD, Scales JT. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature.* 1963 Jan 5; 197:91-2.
 34. Winter GD. Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds. *Nature.* 1963 Oct 26; 200:378-9.
 35. Winter GD. A note on wound healing under dressings with special reference to perforated-film dressings. *J Invest Dermatol.* 1965 Oct; 45(4):299-302.

36. Hinman CD, Maibach H. Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds. *Nature*. 1963 Oct 26; 200:377-8.
37. Alvarez OM, Mertz PM, Eaglstein WH. The Effect of Occlusive Dressings on Collagen-Synthesis and Re-Epithelialization in Superficial Wounds. *Journal of Surgical Research*. 1983; 35(2):142-8.
38. De Coninck A, Draye JP, Van Strubarq A, Vanpee E, Kaufman L, Delaey B, et al. Healing of full-thickness wounds in pigs: effects of occlusive and non-occlusive dressings associated with a gel vehicle. *J Dermatol Sci*. 1996 Dec; 13(3):202-11.
39. Agren MS, Karlsmark T, Hansen JB, Rygaard J. Occlusion versus air exposure on full-thickness biopsy wounds. *J Wound Care*. 2001 Sep; 10(8):301-4.
40. Eaglstein WH. Experiences with biosynthetic dressings. *J Am Acad Dermatol*. 1985 Feb; 12(2 Pt 2):434-40.
41. Bolton LL. Moist Wound Healing from Past to Present. In: Rovee DT, Maibach HI, editors. *The epidermis in wound healing*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 89-101.
42. Feuchte Wundheilung nach dem Vorbild der Natur. Mit Hydrokolloidverbanden Bein- und Dekubitalgeschwure erfolgreich behandeln. *Fortschr Med Suppl*. 1992; 138:1-11.
43. Koupil J, Brychta P, Smola J, Prasek J. Wundheilung im feuchten Milieu mit dem TenderWet-System im Experiment und in der klinischen Praxis. *Hartmann WundForum*. 2002; 2002(1):14-8.
44. Eaglstein WH. Effect of occlusive dressings on wound healing. *Clinics in dermatology*. 1984; 2(3):107-11.
45. Brett DW. A review of moisture-control dressings in wound care. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2006 Nov-Dec; 33(6 Suppl):S3-8.
46. Stashak TS, Farstvedt E, Othic A. Update on wound dressings: Indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2004; 3(2):148-63.
47. Baranoski S. Wound dressings: challenging decisions. *Home Healthc Nurse*. 1999 Jan; 17(1):19-25; quiz 6.
48. Jones V, Grey JE, Harding KG. Wound dressings. *BMJ*. 2006 Apr 1; 332(7544):777-80.
49. Thomas S. Wound Dressings. In: Rovee DT, Maibach HI, editors. *The epidermis in wound healing*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 215-41.
50. Ayello EA. New evidence for an enduring wound-healing concept: moisture control. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2006 Nov-Dec; 33(6 Suppl):S1-2.
51. Lawrence JC. What Materials for Dressings. *Injury*. 1982; 13(6):500-12.
52. Thomas S. The role of foam dressings in wound management. In: Turner TD, Schmidt RJ, Harding KG, Coloplast Ltd. (Huntingdon England), Welsh School of Pharmacy. *Surgical Dressings Research Unit., editors. Advances in wound management : proceedings of a symposium held at*

- the Welsh School of Pharmacy, University of Wales Institute of Science and Technology, Cardiff, 20th and 21st March 1985. Chichester [West Sussex] ; New York: J. Wiley; 1986. p. 23-9.
53. Chaote CS. Wound Dressings: A comparison of classes and their principles of use. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 1994; 84(9):463-9.
 54. Warriner R, Burrell R. Infection and the chronic wound: a focus on silver. *Advances in skin & wound care*. 2005; 18 Suppl 1:2-12.
 55. Leaper DJ. Silver dressings: their role in wound management. *Int Wound J*. 2006 Dec; 3(4):282-94.
 56. Hadad I, Johnstone BH, Brabham JG, Blanton MW, Rogers PI, Fellers C, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Nov 1; 78(3):888-96.
 57. Baschong W. Wundheilungsmodelle - Möglichkeiten und Grenzen. *Hartmann WundForum*. 1998; 98(1):16-9.
 58. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2001; 9(2):66-76.
 59. Bennett LL, Rosenblum RS, Perlov C, Davidson JM, Barton RM, Nanney LB. An in vivo comparison of topical agents on wound repair. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Sep 1; 108(3):675-87.
 60. Winter GD. Epidermal Regeneration Studied in the Domestic Pig. In: Maibach HI, Rovee DT, editors. *Epidermal Wound Healing*. San Francisco: Year Book Medical Publishers; 1972. p. 71-112.
 61. Montagna W, Yun JS. The Skin of the Domestic Pig. *J Invest Dermatol*. 1964 Jul; 42:11-21.
 62. Wang JF, Olson ME, Reno CR, Wright JB, Hart DA. The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comp Med*. 2001 Aug; 51(4):341-8.
 63. Meyer W. Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Hautarzt*. 1996 Mar; 47(3):178-82.
 64. Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000 Sep-Oct; 13(5):229-34.
 65. Healy B, Freedman A. Infections. *BMJ*. 2006 Apr 8; 332(7545):838-41.
 66. Bischoff M, Kinzi L, Schmelz A. Die komplizierte Wunde. *Unfallchirurg*. 1999 Oct; 102(10):797-804.
 67. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*. 2004 Apr; 17(2):91-6.

68. Laato M, Niinikoski J, Lundberg C, Gerdin B. Inflammatory reaction and blood flow in experimental wounds inoculated with *Staphylococcus aureus*. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*. 1988; 20(1):33-8.
69. Wells A, Yates CC, Whaley D, Babu R, Zhang JY, Krishna P, et al. The effect of multifunctional polymer-based gels on wound healing in full thickness bacteria-contaminated mouse skin wound models. *Biomaterials*. 2007 Sep; 28(27):3977-86.
70. Hof H, Dörries R, Bob A, Bob K, editors. *Medizinische Mikrobiologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
71. Müller M. *Chirurgie für Studium und Praxis*. 10. ed. Breisbach am Rhein: Medizinische Verlags- und Informationsdienste; 2010.
72. Bernatchez SF, Parks PJ, Grussing DM, Matalas SL, Nelson GS. Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. *Wound Repair Regen*. 1998 May-Jun; 6(3):223-33.
73. Manna V, Bem J, Marks R. An animal model for chronic ulceration. *Br J Dermatol*. 1982 Feb; 106(2):169-81.
74. Roy S, Biswas S, Khanna S, Gordillo G, Bergdall V, Green J, et al. Characterization of a preclinical model of chronic ischemic wound. *Physiol Genomics*. 2009 May 13; 37(3):211-24.
75. Velandar P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen*. 2008 Mar-Apr; 16(2):288-93.
76. Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, Koehler T, Fossum M, Steinau HU, et al. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC Surg*. 2008; 8:5.
77. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*. 2002 May-Jun; 10(3):141-51.
78. Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*. 2005 May; 60(1):1-7.
79. Robson MC, Mannari RJ, Smith PD, Payne WG. Maintenance of wound bacterial balance. *Am J Surg*. 1999 Nov; 178(5):399-402.
80. Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. *J Invest Dermatol*. 2010 Jan; 130(1):38-48.
81. Raahave D. New Technique for Quantitative Bacteriological Sampling of Wounds by Velvet Pads - Clinical Sampling Trial. *J Clin Microbiol*. 1975; 2(4):277-80.
82. Toy LW, Macera L. Evidence-based review of silver dressing use on chronic wounds. *J Am Acad Nurse Pract*. 2011; 23(4):183-92.

83. Krizek TJ, Robson MC. Evolution of Quantitative Bacteriology in Wound Management. *American Journal of Surgery*. 1975; 130(5):579-84.
84. Streit M, Mayer D. Infektionen chronischer Wunden. *Zeitschrift für Wundheilung*. 2009 Sep; 14(3):160-76.
85. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr; 14(2):244-69.
86. Thomson PD, Smith DJ, Jr. What is infection? *Am J Surg*. 1994 Jan; 167(1A):7S-10S; discussion S-1S.
87. Bouza E, Burillo A, Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M. Semiquantitative culture of open surgical wounds for diagnosis of surgical site infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Feb; 23(2):119-22.
88. Saymen DG, Hill EO, Holder IA, Nathan P, Macmillan BG. Infected Surface Wound - Experimental Model and a Method for Quantitation of Bacteria in Infected Tissues. *Appl Microbiol*. 1972; 23(3):509-14.
89. Mulisch M, Welsch U, editors. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
90. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, Immunoregulation, and Inducible Nitric-Oxide Synthase. *J Leukocyte Biol*. 1993 Aug; 54(2):171-8.
91. Grisham MB, Johnson GG, Gautreaux MD, Berg RD. Measurement of Nitrate and Nitrite in Extracellular Fluids: A Window to Systemic Nitric Oxide Metabolism. *Methods*. 1995; 7(1):84-90.
92. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*. 1995 Jun; 41(6 Pt 1):892-6.
93. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct; 126(1):131-8.
94. Kraft W, Dürr UM, editors. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6th ed. Stuttgart: Schattauer; 2005.
95. Smith C, Jarecki A. *Atlas of comparative diagnostic and experimental hematology*. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
96. Evans EW. Interpretation of Porcine Leukocyte Response. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, Schalm OW, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Philadelphia London: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 411-6.
97. Swindle MM. Porcine Models in Surgical Research: An Overview. In: Tumbleson ME, editor. *Swine in biomedical research*. New York: Plenum Press; 1986. p. 3 v. (xxvi, 1988 p.).
98. Agren MS, Mertz PM, Franzen L. A comparative study of three occlusive dressings in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Jan; 36(1):53-8.

99. Singer AJ, McClain SA. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med*. 2003 Oct; 10(10):1029-33.
100. Bigelman J, Mertz PM. Human and Swine Models of Epidermal Wound Healing. In: Rovee DT, Maibach HI, editors. *The epidermis in wound healing*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 113-23.
101. Vardaxis NJ, Brans TA, Boon ME, Kreis RW, Marres LM. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat*. 1997 May; 190 (Pt 4):601-11.
102. Chvapil M, Chvapil TA. Wound-Healing Models in the Miniature Yucatan Pig. In: Swindle MM, Moody DC, Phillips LD, editors. *Swine as models in biomedical research*. 1st ed. Ames: Iowa State University Press; 1992. p. xv, 312 p.
103. Archer HG, Barnett S, Irving S, Middleton KR, Seal DV. A controlled model of moist wound healing: comparison between semi-permeable film, antiseptics and sugar paste. *J Exp Pathol (Oxford)*. 1990 Apr; 71(2):155-70.
104. Kirsner RS, Martin LK, Drosous A. Wound Microbiology and the Use of Antibacterial Agents. In: Rovee DT, Maibach HI, editors. *The epidermis in wound healing*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 155-82.
105. Loebel EC, Marvin JA, Heck EL, Curreri PW, Baxter CR. The use of quantitative biopsy cultures in bacteriologic monitoring of burn patients. *The Journal of surgical research*. 1974; 16(1):1-5.
106. Breuing K, Kaplan S, Liu P, Onderdonk AB, Eriksson E. Wound fluid bacterial levels exceed tissue bacterial counts in controlled porcine partial-thickness burn infections. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Feb; 111(2):781-8.
107. Levine NS, Lindberg RB, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr. The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *J Trauma*. 1976 Feb; 16(2):89-94.
108. Sapico FL, Ginunas VJ, Thornhill-Joynes M, Canawati HN, Capen DA, Klein NE, et al. Quantitative microbiology of pressure sores in different stages of healing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1986; 5(1):31-8.
109. O'Meara S, Nelson EA, Golder S, Dalton JE, Craig D, Iglesias C. Systematic review of methods to diagnose infection in foot ulcers in diabetes. *Diabet Med*. 2006 Apr; 23(4):341-7.
110. Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, Stephens P, Wilson MJ, Harding KG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs (Abstrac). *Wound Repair Regen*. 2007 Jan-Feb; 15(1):17-22
111. Field FK, Kerstein MD. Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg*. 1994 Jan; 167(1A):2S-6S.
112. Schmidt WD, Liebold K, Fassler D, Wollina U. Contact-free spectroscopy of leg ulcers: principle, technique, and calculation of spectroscopic wound scores. *J Invest Dermatol*. 2001 Apr; 116(4):531-5.

113. Madsen SM, Westh H, Danielsen L, Rosdahl VT. Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *Apmis*. 1996 Dec; 104(12):895-9 (Abstract).
114. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog Histochem Cyto*. 2007; 42(3):115-70.
115. Robson MC, Heggors JP. Delayed wound closure based on bacterial counts. *J Surg Oncol*. 1970; 2(4):379-83.
116. Ganatra MA, Ganatra HA. Method of quantitative bacterial count in burn wound. *Pak J Med Sci*. 2007 Apr-Jun; 23(3):415-9.
117. Hutchinson JJ, Lawrence JC. Wound infection under occlusive dressings. *J Hosp Infect*. 1991 Feb; 17(2):83-94.
118. Bucknall TE. The effect of local infection upon wound healing: an experimental study. *Br J Surg*. 1980 Dec; 67(12):851-5.
119. Sen CK, Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, et al. Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res-Fund Mol M*. 2005 Nov 11; 579(1-2):172-81.
120. Hart DA, Gallant-Behm CL. Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Repair and Regeneration*. 2006 Jan; 14(1):46-54.
121. Barnett A, Dave B, Ksander GA, Vistnes LM. A concentration gradient of bacteria within wound tissues and scab. *J Surg Res*. 1986 Sep; 41(3):326-32.
122. Svensjo T, Pomahac B, Yao F, Slama J, Eriksson E. Accelerated healing of full-thickness skin wounds in a wet environment. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Sep; 106(3):602-12; discussion 13-4.
123. Harris DR, Filarski SA, Jr., Hector RE. The effect of silastic sheet dressings on the healing of split-skin graft donor sites. *Plast Reconstr Surg*. 1973 Aug; 52(2):189-90.
124. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar; 127(3):514-25.
125. Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998 Jan; 7(1):59-62.
126. Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N, Leifert C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens. *J Appl Microbiol*. 2001 Apr; 90(4):648-52.
127. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*. 2002 Aug; 7(1):1-10.
128. Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for

- an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. *Neurosci Lett*. 1995 Nov 10; 200(1):17-20.
129. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 May 15; 851(1-2):51-70.
 130. Mahoney E, Reichner J, Bostom LR, Mastrofrancesco B, Henry W, Albina J. Bacterial colonization and the expression of inducible nitric oxide synthase in murine wounds. *Am J Pathol*. 2002 Dec; 161(6):2143-52.
 131. Beam JW. Topical silver for infected wounds. *J Athl Train*. 2009 Sep-Oct; 44(5):531-3.
 132. Jorgensen B, Price P, Andersen KE, Gottrup F, Bech-Thomsen N, Scanlon E, et al. The silver-releasing foam dressing, Contreet Foam, promotes faster healing of critically colonised venous leg ulcers: a randomised, controlled trial. *Int Wound J*. 2005 Mar; 2(1):64-73.
 133. Wright JB, Lam K, Burrell RE. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *Am J Infect Control*. 1998 Dec; 26(6):572-7.
 134. Burd A, Kwok CH, Hung SC, Chan HS, Gu H, Lam WK, et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen*. 2007 Jan-Feb; 15(1):94-104.
 135. Li XZ, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol*. 1997 Oct; 179(19):6127-32.
 136. Silverstein P, Heimbach D, Meites H, Latenser B, Mozingo D, Mullins F, et al. An open, parallel, randomized, comparative, multicenter study to evaluate the cost-effectiveness, performance, tolerance, and safety of a silver-containing soft silicone foam dressing (intervention) vs silver sulfadiazine cream. *J Burn Care Res*. 2011 Nov-Dec; 32(6):617-26.
 137. Barrett S. Mepilex Ag: an antimicrobial, absorbent foam dressing with Safetac technology. *Br J Nurs*. 2009 Nov 12-25; 18(20):S28, S30-6.
 138. Cutting K, White RJ, Kingsley A. Topical antimicrobials in the control of wound bioburden. *Ostomy Wound Manag*. 2006 Aug; 52(8):26-+.
 139. Agren MS. Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds: a comparative experimental study. *Br J Plast Surg*. 1996 Mar; 49(2):129-34.
 140. Groves AR, Lawrence JC. Alginate dressing as a donor site haemostat. *Ann R Coll Surg Engl*. 1986 Jan; 68(1):27-8.
 141. Barnett SE, Varley SJ. The effects of calcium alginate on wound healing. *Ann R Coll Surg Engl*. 1987 Jul; 69(4):153-5.
 142. Lalau JD, Bresson R, Charpentier P, Coliche V, Erlher S, Ha Van G, et al. Efficacy and tolerance of calcium alginate versus vaseline gauze

- dressings in the treatment of diabetic foot lesions. *Diabetes Metab.* 2002 Jun; 28(3):223-9.
143. Vanstraelen P. Comparison of calcium sodium alginate (KALTOSTAT) and porcine xenograft (E-Z DERM) in the healing of split-thickness skin graft donor sites. *Burns.* 1992 Apr; 18(2):145-8.
 144. Rosdy M, Clauss LC. Cytotoxicity testing of wound dressings using normal human keratinocytes in culture. *J Biomed Mater Res.* 1990 Mar; 24(3):363-77.
 145. Wiegand C, Heinze T, Hipler UC. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Repair Regen.* 2009 Jul-Aug; 17(4):511-21.
 146. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 1996 Jul-Sep; 4(3):321-5.
 147. Pirayesh A, Dessy LA, Rogge FJ, Hoeksema HJ, Sinove YM, Dall'Antonia A, et al. The efficacy of a polyhydrated ionogen impregnated dressing in the treatment of recalcitrant diabetic foot ulcers: a multi-centre pilot study. *Acta Chir Belg.* 2007 Nov-Dec; 107(6):675-81.
 148. van Rossum M, Vooijs DP, Walboomers XF, Hoekstra MJ, Spauwen PH, Jansen JA. The influence of a PHI-5-loaded silicone membrane, on cutaneous wound healing in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Jul; 18(7):1449-56.
 149. Meaume S, Vallet D, Morere MN, Teot L. Evaluation of a silver-releasing hydroalginate dressing in chronic wounds with signs of local infection (Abstract). *J Wound Care.* 2005 Oct; 14(9):411-9.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die drei Schichten der Haut	2
Abb. 1.2	Die Epidermis	3
Abb. 1.3	Die drei Phasen der Wundheilung	4
Abb. 1.4	Kontamination-Infektions Kontinuum	14
Abb. 2.1	Schweineskizze (angefertigt von Frau Esther Weinknecht).....	30
Abb. 2.2	Stanze	33
Abb. 2.3	Mikrobiologische Probengewinnung	35
Abb. 2.4	Nach der Operation	37
Abb. 2.5	Operationsfeld	38
Abb. 2.6	Mikrobiologische Auswertung	42
Abb. 2.7	Methodik der histologischen Auswertung.....	44
Abb. 2.8	NaNO ₂ -Standardkurve.....	46
Abb. 3.1	Makroskopischer Wundheilungsverlauf	48
Abb. 3.2	Wundgröße der beimpften und nicht beimpften Wunden.....	49
Abb. 3.3	Wundgrößenverlauf unter Mepilex® Ag	50
Abb. 3.4	Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Alginate	51
Abb. 3.5	Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Matrix.....	52
Abb. 3.6	Wundgrößenverlauf unter Tegaderm™ Alginate Ag	53
Abb. 3.7	Bakterielle Besiedlung der beimpften und nicht beimpften Schweine	56
Abb. 3.8	Keimzahlverlauf unter Mepilex® Ag	57
Abb. 3.9	Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Alginate	58
Abb. 3.10	Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Matrix.....	59
Abb. 3.11	Keimzahlverlauf unter Tegaderm™ Alginate Ag	60
Abb. 3.12	Höhe des Granulationsgewebes der beimpften und nicht beimpften Schweine.....	64
Abb. 3.13	Granulationsgewebshöhe bei Mepilex® Ag	65
Abb. 3.14	Granulationsgewebshöhe bei Tegaderm™ Alginate.....	66
Abb. 3.15	Granulationsgewebshöhe bei Tegaderm™ Matrix.....	67
Abb. 3.16	Granulationsgewebshöhe bei Tegaderm™ Alginate Ag	68
Abb. 3.17	Nitritkonzentration im Wundsekret	70

Abb. 3.18 Leukozytenzahl im Blut72
Abb. 4.1 Histologischer Vergleich humaner und porciner Haut.....75

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Sascha Flohé, dem stellvertretenden Direktor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die jederzeit gewährte Unterstützung. Ihm und Herrn Prof. Dr. med. Joachim Windolf, dem Klinikdirektor, danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. phil. nat. Martin Scholz, der als Forschungsleiter der Klinik für Unfall- und Handchirurgie dieses Projekt mit möglich machte, möchte ich mich für die stete Hilfe, die wissenschaftliche Förderung und organisatorische Einbindung bedanken.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. med. Ulla Stumpf für die intensive, professionelle sowie freundschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit und die wertvollen Ratschläge bei der Erstellung der Dissertation. Ebenfalls danken möchte ich der Arbeitsgruppe WUTZ für die unterhaltsamen gemeinsamen Stunden in den Laboren und der Tierversuchsanlage.

Mein spezieller Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü für die ausgezeichnete statistische Beratung, die kritische Durchsicht und ihre konstruktiven Vorschläge. Frau Jutta Schneider und Frau Samira Seghrouchni danke ich herzlich für ihren unermüdlichen Einsatz, ihre tatkräftige Unterstützung und die außergewöhnlich nette Atmosphäre im zell- und molekularbiologischen Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie.

Ein besonderer Dank aufgrund der hervorragenden Kooperation gebührt Herrn Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie für sein uneingeschränktes Engagement, seine stetige Gesprächsbereitschaft und die exzellente fachliche Hilfe bei mikrobiologischen Aspekten. Darüber hinaus danke ich ihm für die Übernahme des Korreferats.

Dem Team der Tierversuchsanlage, insbesondere Frau Iris Schrey und Herrn PD Dr. med. vet. Martin Sager, möchte ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft zur Lösung vieler Probleme danken.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder aussprechen, die mir diesen Weg so selbstverständlich ermöglicht und mich jahrelang liebevoll begleitet haben. Für seine grenzenlose Unterstützung und unendliche Geduld während des gesamten Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich von Herzen bei Christian Kuske bedanken. Seiner Familie und meinen Freunden danke ich für die erholsamen Stunden zwischendurch und ihr bedingungsloses Verständnis.

Eidesstattliche Versicherung

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

(Nwaka Cynthia Gbenoba)

(Ort, Datum)